

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第40卷 VOL.40 第2期 NO.2



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 40 卷 第 2 期

2019 年 4 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊
中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊
中国科技论文统计源核心期刊
RCCSE 中国权威学术期刊
中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、
中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊
中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊
英国《动物学记录》(ZR)收录期刊
《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊
《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊
《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊
《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

研究综述

环境内分泌干扰物对鱼类脂质代谢的影响：回顾与展望 ✓孙胜香 杜震宇 (1)

研究论文

基于渔港抽样调查不同捕捞方式 CPUE 单位标准化新方法 ✓陶雅晋 冯 波 易木荣 李 波 卢伙胜 颜云榕 (15)

鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒(CMVN)的初步研究 ✓王 崇 王秀华 刘 爽 桑松文 张庆利 (25)

广东粤北地区禾花鱼的形态特征及遗传学分析 ✓马冬梅 黄樟翰 朱华平 谢 骏 (33)

基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的新安江流域温州光唇鱼群体遗传研究 ✓周华兴 胡玉婷 段国庆 凌 俊 江 河 潘庭双 (43)

半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析 ✓王双艳 王 磊 陈张帆 崔忠凯 周 茜 陈松林 (51)

温度胁迫对大鳞副泥鳅抗氧化与非特异性免疫指标的影响 ✓范耘硕 邵 蓬 贾旭颖 高金伟 窦 勇 史谢尧 周文礼 (58)

2016~2017 年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMVN)分子流行病学调查 ✓李小平 万晓媛 张庆利 黄 捷 董 宣 王秀华 邱 亮 宋增磊 程东远 (65)

中国对虾甘氨酸脱羧酶的基因克隆、表达及其与抗 WSSV 的关联分析 ✓史晓丽 张莹雪 孟宪红 孔 杰 栾 生 罗 坤 曹宝祥 曹家旺 陈宝龙 (74)

不同产地鲍鱼特征元素分析与主成分评价模型的建立 ✓陈胜军 刘先进 杨贤庆 李来好 黄 卉 吴燕燕 李春生 (83)

三角帆蚌生长和壳色性状早期复合选择的优化研究 ✓孙朝虎 白志毅 李清清 彭建庆 李家乐 (91)

短蛸的早期生长特征 ✓赵捷杰 陈四清 徐大风 常 青 张鹏飞 (98)

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP* 基因的克隆及其对温度胁迫的响应 ✓赖卓欣 刘 雅 王庆恒 郑 哲 邓岳文 (106)

紫菜养殖对养殖水体中细菌多样性分布及环境因子的影响 ✓孙藤芹 汪文俊 梁洲瑞 刘福利 孙修涛 曹 原 王飞久 (115)

养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的菌群特征及其与环境菌群相关性分析 ✓李 靖 廖梅杰 李 彬 王印庚 荣小军 张 正 范瑞用 刘安然 (122)

响应面法研究温度、盐度、pH 及磷酸盐、硝氮、氨氮对副溶血弧菌生长的影响 ✓黄梦诗 杨倩倩 张 艳 姜晓瑜 赵 俊 张旭志 丁东生 曲克明 (132)

咸干蓝点马鲛品质特征与优势菌群分析 ✓王睿迪 刘胜男 王 玉 赵延宁 薛 勇 (141)

利用虾壳清洁化生产不同脱乙酰度壳寡糖及其抗 TMV 效果研究 ✓朱 琳 付晓丹 李 丽 韩振莲 牟海津 (148)

冻融循环对南极磷虾虾肉糜滋味成分的影响 ✓潘晓炀 杨林莘 王晓燕 金银哲 程裕东 (155)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.40 No.2 April 2019

- The Effects of Environmental Endocrine Disrupting Chemicals on Lipid Metabolism in Fish: Review and Perspectives SUN Shengxiang, DU Zhenyu (1)
- A Novel Approach to Unit Standardization of CPUE for Multiple Types of Fishing Gear Based on Fishing Port Sampling Surveys TAO Yajin, FENG Bo, YI Murong, LI Bo, LU Huosheng, YAN Yunrong (15)
- Preliminary Study on the Natural Infection of *Carassius auratus* with Covert Mortality Nodavirus (CMNV) WANG Chong, WANG Xiuhua, LIU Shuang, SANG Songwen, ZHANG Qingli (25)
- Morphological Characteristics and Genetic Analysis of the Rice Flower Carp in the Northern Region of Guangdong Province MA Dongmei, HUANG Zhanghan, ZHU Huaping, XIE Jun (33)
- Population Genetic Analyses of *Acrossocheilus wenchowensis* in Xin'an Basin Based on the Mitochondrial DNA Cytochrome *b* Gene ZHOU Huaxing, HU Yuting, DUAN Guoqing, LING Jun, JIANG He, PAN Tingshuang (43)
- Cloning and Expression Analysis of the Polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) Gene in the Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) WANG Shuangyan, WANG Lei, CHEN Zhangfan, CUI Zhongkai, ZHOU Qian, CHEN Songlin (51)
- Effects of Temperature Stress on the Partial Antioxidative and Non-Specific Immunity Indices of *Paramisgurnus dabryanus* FAN Yunshuo, SHAO Peng, JIA Xuying, GAO Jinwei, DOU Yong, SHI Xieyao, ZHOU Wenli (58)
- Molecular Epidemiological Survey of Covert Mortality Nodavirus (CMNV) in Cultured Crustaceans in China in 2016–2017 LI Xiaoping, WAN Xiaoyuan, ZHANG Qingli, HUANG Jie, DONG Xuan, WANG Xiuhua, QIU Liang, SONG Zenglei, CHENG Dongyuan (65)
- cDNA Cloning of the GLDC Gene in *Fenneropenaeus chinensis* and Its Expression and Functional Analyses after WSSV Infection SHI Xiaoli, ZHANG Yingxue, MENG Xianhong, KONG Jie, LUAN Sheng, LUO Kun, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, CHEN Baolong (74)
- Analysis of Characteristic Elements and Establishment of Principal Component Evaluation Model of Abalone from Different Habitats CHEN Shengjun, LIU Xianjin, YANG Xianqing, LI Laihao, HUANG Hui, WU Yanyan, LI Chunsheng (83)
- The Optimization of Early Compound Selection for Growth Traits and Shell Color in *Hyriopsis cumingii* SUN Chaohu, BAI Zhiyi, LI Qingqing, PENG Jianqing, LI Jiale (91)
- Early Growth Characteristics of Post-Hatching *Octopus ocellatus* (Mollusca: Cephalopoda) ZHAO Jiejie, CHEN Siqing, XU Dafeng, CHANG Qing, ZHANG Pengfei (98)
- cDNA Cloning of *FBP* Gene in *Pinctada fucata martensii* and Its Response to Temperature Stress LAI Zhuoxin, LIU Ya, WANG Qingheng, ZHENG Zhe, DENG Yuewen (106)
- Effect of *Pyropia* Farming on Bacterial Communities and Marine Environmental Factors SUN Tengqin, WANG Wenjun, LIANG Zhouhui, LIU Fuli, SUN Xiutao, CAO Yuan, WANG Feijiu (115)
- The Characteristics of Culturable Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Cultured Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) During the Early Developmental Stage and its Relationship with Environmental Flora LI Jing, LIAO Meijie, LI Bin, WANG Yingeng, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong, LIU Anran (122)
- Study on the Effects of Temperature, Salinity, pH, Phosphate, Nitrate, and Ammonium on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus* Using Response Surface Methodology HUANG Mengshi, YANG Qianqian, ZHANG Yan, JIANG Xiaoyu, ZHAO Jun, ZHANG Xuzhi, DING Dongsheng, QU Keming (132)
- Analysis of Quality Characteristics and Dominant Strains of Bacteria in Dried Salted Spanish Mackerel WANG Ruidi, LIU Shengnan, WANG Yu, ZHAO Yanning, XUE Yong (141)
- Cleaner Production of Chitooligosaccharides with Different Degrees of Deacetylation from Shrimp Shells and Their Effects on TMV Resistance ZHU Lin, FU Xiaodan, LI Li, HAN Zhenlian, MOU Haijin (148)
- Effects of Freezing and Thawing Cycles on Taste Components of Minced Antarctic Krill PAN Xiaoyang, YANG Linxin, WANG Xiaoyan, JIN Yinzhe, CHENG Yudong (155)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180913001

http://www.yykxjz.cn/

孙胜香, 杜震宇. 环境内分泌干扰物对鱼类脂质代谢的影响: 回顾与展望. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 01-14
Sun SX, Du ZY. The effects of environmental endocrine disrupting chemicals on lipid metabolism in fish: Review and perspectives. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 01-14

环境内分泌干扰物对鱼类脂质代谢的影响: 回顾与展望*



孙胜香 杜震宇^①

(华东师范大学生命科学学院水生动物营养与环境健康实验室 上海 200241)

摘要 脂肪严重沉积是当前养殖鱼类普遍发生的代谢障碍病症,其原因复杂多样。近年来,已有较多研究提示,广泛存在于自然水环境中的环境内分泌干扰物(EDCs)除了对多种鱼类的生长、发育和繁殖产生持久的慢性毒理效应之外,也对鱼类脂质代谢过程造成影响,导致脂肪沉积异常,并影响养殖鱼类的品质与食用安全性。本文首次系统回顾了近年来在 EDCs 影响鱼类脂质代谢研究领域中的重要研究成果,并针对持久性有机污染物(POPs)、重金属、环境雌激素和人工合成药物 4 大类污染物,系统总结了不同 EDCs 对鱼类脂质代谢的干扰作用。辨析了不同研究中 EDCs 对鱼类暴露方式、暴露时间和暴露浓度的差异,并由此分析同种 EDC 在不同的暴露环境下对鱼类脂质代谢产生的差异影响。本文在综述已有成果的基础上,提出了本领域今后的研究重点和方向,旨在为深入研究 EDCs 对鱼类脂质代谢的影响机制提供更多参考,进一步理解鱼类脂肪沉积的原因,为绿色可持续发展的水产养殖业提供重要的理论支持。

关键词 环境内分泌干扰物; 环境污染; 脂质代谢; 鱼类; 水产养殖

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0001-14

环境内分泌干扰物(EDCs)是一类存在于自然环境中的具有类激素效应的化学物质,对生物体内源激素的合成、分泌、转运和降解过程具有干扰作用,进而损伤生物体的生殖发育、免疫、内分泌和神经系统,甚至导致其后代的内分泌代谢失衡(Cabana *et al.*, 2007; Tri *et al.*, 2016)。当前,EDCs 主要来源于工农业生产和民众日常生活产生的废气、废水和废渣,常见的包括多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)、二噁英、有机氯杀虫剂(OCPs)、雌二醇和双酚 A(BPA)以及 Cd、Pb、Hg 等重金属等。大量文献表明,当前全球主要水体中均已含有多多种 EDCs。由于水体的流动性较强,

EDCs 可以随水体流动进行长距离的扩散污染,因此,EDCs 对水生动物的暴露毒理效应已经成为一个受到广泛关注的全球性环境问题(Huang *et al.*, 2012)。相应地,EDCs 对水生动物的生态和生理毒性及其生物学机制也成为近年来学界的研究热点。目前,EDCs 对水生动物的毒理效应研究主要集中于 EDCs 对水生动物生长发育和生殖性能的损伤机制研究。已知水环境中的雌激素能够诱发鱼类性腺在发育的过程中产生畸形(Bernet *et al.*, 2008),降低鱼类的生殖能力(Milestone *et al.*, 2012),诱导雄鱼性逆转成为雌雄同体甚至是雌鱼(Baroiller *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 2007)。

* 国家“973”重点基础研究发展计划(2014CB138603)和国家自然科学基金(31472290)资助[This work was supported by the National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (2014CB138603), and National Natural Science Foundation of China (31472290)]. 孙胜香, E-mail: 13262266002@163.com

^① 通讯作者: 杜震宇, 教授, E-mail: zydu@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-13, 收修改稿日期: 2018-10-14

而 PCBs 可以诱发鱼类肾细胞形状生长异常, 肾小球毛细血管扩张, 肾小球间质水肿, 进而降低鱼体的免疫功能(Koponen *et al*, 2001)。水体沉积物中 PAHs 的浓度为 0.5~10 $\mu\text{g/g dw}$ (干重)时, 可显著降低水体中鱼类胚胎的孵化率和成活率, 降低幼鱼的生长速率, 并且造成 DNA 的损伤和破坏(Le Bihanic *et al*, 2014)。然而, 与生长发育和生殖过程相比, 人们对 EDCs 如何影响水生动物代谢过程却知之甚少。

在当前的水产养殖中, 鱼类的代谢性疾病十分普遍, 尤其体现在鱼体的脂肪过度沉积, 包括脂肪肝和腹腔脂肪严重沉积等(杜震宇, 2014)。大量研究表明, 鱼体脂肪过度沉积, 不仅对鱼体自身的生长发育产生不利的影响, 造成养殖鱼类抗应激能力下降, 同时也降低水产品品质, 增加食品安全的风险(黄春红等, 2014)。目前, 一般认为造成鱼类脂肪严重沉积的主要因素包括: 能量摄入过度、营养素摄入不均衡、鱼体的生理和物种差异、遗传和基因突变以及养殖环境中污染物的代谢干扰(杜震宇, 2014)。其中, 环境污染物影响鱼类脂质代谢的研究相对较少。然而, 近年来, 随着环境水体的污染日益严重, 养殖水体中的环境污染物对养殖鱼脂肪沉积的影响也引起了研究者的重视。当前, 研究者已经在持久性有机污染物 (POPs)、重金属和环境雌激素对鱼类脂质代谢的影响方面取得了诸多研究进展。但是, 至今尚无人对这一领域的研究进展进行综述。为了总结该领域的研究进展, 并进一步推动相关研究, 本文回顾并总结了主要的环境污染物影响鱼类脂质代谢的生理表型与可能机制, 并对本领域今后的研究方向提出了建议。

1 持久性有机污染物在鱼体中的沉积及其对鱼类脂质代谢的影响

持久性有机污染物(POPs)包括 PCBs、OCPs、二噁英、呋喃和 PAHs 等, 主要来源于工业生产和农业杀虫剂的大规模使用。POPs 在生物体内难以被降解代谢, 是一类对动物体和环境产生严重危害的天然或者人工合成的有机污染物。POPs 可以通过大气和海洋的流动进行全球性的远距离迁移, 并通过食物链产生生物放大和生物富集效应(Larsson *et al*, 1996; Wania, 2003)。目前, 全球各主要水域都已检出浓度不等的 POPs 残留。研究表明, 中国东部沿海 PCB 和滴滴涕的浓度范围分别为 1.23~16.6 ng/L 和 0.28~13.4 ng/L (Lin *et al*, 2012; Liu *et al*, 2015; Tang *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2011)。此外, 中国内陆水域中的 POPs 残留浓度为 0.395~5290 ng/L (曹秀芹等, 2016; Liu

et al, 2012; 刘艳霖, 2008; Wang *et al*, 2010)。尽管当前大部分国家已经开始针对某些 POPs 采取了强制性的限用、禁用和消除措施, 但由于 POPs 的难降解性、生物蓄积性和高毒性, 残留在水体中的 POPs 依然对水生动物造成持久而严重的危害(Trudeau *et al*, 2007)。

POPs 具有亲脂疏水特性, 主要累积在生物体的脂肪组织中, 这也是 POPs 影响鱼类脂质代谢的物质前提。研究发现, 在不同鱼种中, 体脂含量较高的大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)和鲱鱼(*Clupea harengus*)与体脂含量较少的鲈鱼(*Perca fluviatilis*)和鳕鱼(*Gadus morhua*)相比较, 前二者体内的四氯联苯和 OCPs 污染物积累较多(Ewald *et al*, 1994)。在同一鱼种中, 如大西洋鲑鱼, 在其远距离迁徙时, 体内脂肪含量会产生较大的波动, 而 PCBs 在其体内的积蓄亦会随着体脂的变化, 与体脂含量间呈现正相关性(Hamelink *et al*, 1971; Larsson *et al*, 1996; Sun *et al*, 2018)。因此, 目前学界普遍认为鱼体 POPs 积累水平与其脂肪含量, 尤其是与甘油三酯(TG)含量间密切相关(Jorgensen *et al*, 1997; Hardell *et al*, 2010; Li *et al*, 2018)。但也有少量研究表明, POPs 在鱼体中的沉积量并非完全取决于体脂含量。比如, 湖鳟(*Salvelinus namaycush*)不同亚种的肌肉脂肪含量存在显著差异, 但是不同亚种体内的 PCBs 含量却无明显差异(Miller *et al*, 1992)。同样, 处于非产卵期的鳕鱼体内脂肪含量与体内 PCBs 的沉积亦无相关性(Stow *et al*, 1997)。另有一些研究的结果表明, 鱼体中 POPs 的沉积与鱼类的营养状态有关, 并存在组织分布的特异性。比如, 当鳎目鱼(*Solea solea*)饥饿后, 虽然组织和器官中的脂肪含量降低, 但 PCBs 含量却出现上升的趋势, 且其肝脏中的 PCBs 含量比脑中的 PCBs 含量高 3~4 倍(Boon *et al*, 1985)。Bruner 等(1994)认为, 不同类型和分子大小的 POPs 与脂肪分子的结合能力存在差异, 这种差异可造成不同 POPs 在脂肪组织间分配效率的不同。Bruner 等(1994)研究表明, 不同 PAHs 种类间, 分子量较小的 PAHs 与脂肪分子的结合能力不够稳定, 比较容易在机体中被清除, 因此, 其体内浓度与体脂含量的相关性较弱。在野外水环境的环境污染物研究中发现, 水体中杀虫剂 DDTs、林丹(γ -HCH)、七氯、Aldrin 和 Endrin 的浓度与鱼体杀虫剂的累积量呈现正相关(Liu *et al*, 2012)。同样, 来自于不同水域的鱼体 POPs 沉积量亦存在差异, 如中国南海、渤海、东海和黄海中的鱼体的 PCBs 平均含量分别为 2、62.8、520 和 1008 ng/g ww (湿重)。其中, 东海和黄海中的鱼体 PCBs 沉积量显著高于南海和渤海(Liu *et al*, 2011)。

在加拿大 Detroit 河中, 蓝鳃鱼(*Lepomis macrochirus*) 体内的 PCBs 含量随着季节更替而发生变化, 在夏季, 鱼体 PCBs 沉积量逐渐增加; 在冬季, 鱼体 PCBs 含量则维持稳定状态(Mcleod *et al*, 2014)。由此可见,

水域和气候等环境因素同样影响鱼体 POPs 的沉积状态。综上, 如图 1 所示, 尽管 POPs 在大部分鱼类中的积累与体脂含量存在正相关, 但也和鱼的品种、发育阶段和营养状态等因素有关。

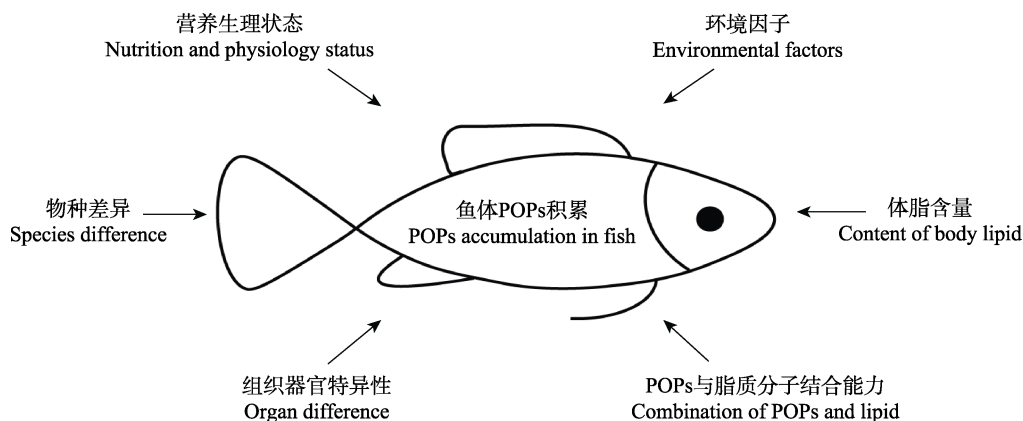


图 1 鱼体 POPs 沉积的影响因素

Fig.1 Influence factors of POPs accumulation in fish

正因为 POPs 积蓄与鱼体脂肪含量间具有相关性, 使得 POPs 对鱼体脂质代谢产生了较大的影响。一些研究发现, POPs 可对鱼体的脂质代谢过程产生干扰作用, 饲料中添加 POPs 可促进鱼体的脂肪积累。如用含有 250 mg/L Aroclor 1248 饲料分别投喂鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 7、14 和 21 d, 可显著增加鱼体 TG、总胆固醇、游离胆固醇和游离脂肪酸含量(Ito *et al*, 1974)。相应地, 在银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 和蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus thynnus*) 中发现, 以含 500 和 50 mg/kg PCBs 的饲料养殖银鲑, 体内积累的 PCBs 可显著增加鱼体肝脏中的脂质含量, 但躯壳中脂质含量与对照组相比显著降低(Leatherland *et al*, 1979; Maisano *et al*, 2016)。用含有多溴联苯醚(PBDEs)、多氯化萘(PCNs)、PCBs 和壬基酚(NP)的饲料分别养殖雌性三刺鱼 3.5 月和海鲷 (*Sparus aurata*) 21 d, 所有 POPs 处理组鱼体肝脏中均可观察到显著的脂滴积累现象, 并且上调 NP 处理组鱼体肝脏脂合成相关的脂肪酸合成酶(*fas*)和过氧化物酶增殖物激活受体 γ (*ppar\gamma*) 的基因表达(Holm *et al*, 1993; Camevali *et al*, 2017)。除了饲料暴露之外, 水体 POPs 暴露亦可对鱼体脂质代谢产生影响。如用 0.1、0.2、0.5 和 1 mg/L 杀虫剂 Aldrin 分别暴露胡子鲶 (*Clarias batrachus* L.) 12、60 和 132 h 后发现, 随着暴露浓度的增加和暴露时间的延长, 鱼血液中胆固醇的含量逐渐升高, 但肝脏中的胆固醇含量则逐渐降低。在 1 mg/L 浓度 132 h 处理组中, 胆固醇含量在血液中最高, 在肝脏中最低。由此推测, 在胡子鲶体内,

Aldrin 可显著提高胆固醇从肝脏向血液的转运效率(Bano, 1982)。在另一项类似的研究中, 分别用 2 和 8 mg/L 的 γ -BHC 有机氯杀虫剂, 以及 1 和 4 mg/L 的 Malathion 有机磷杀虫剂水体暴露胡子鲶 4 周后发现, Malathion 可提高雄性胡子鲶肝脏脂质含量, γ -BHC 则降低肝脏中磷脂合成。这 2 种杀虫剂均可抑制磷脂、脂肪酸和甘油酯从肝脏向性腺的转运功能, 且在不改变胆固醇合成的前提下, 均可降低酯化胆固醇向游离胆固醇的转化效率, 以及降低游离脂肪酸向甘油酯的转变(Lal *et al*, 1987)。综合上述研究可知, 不管是饲料暴露还是水体暴露, POPs 均能对鱼体脂质代谢造成负面影响, 往往导致体内甘油三酯的积累或磷脂含量的降低。由于脂质是鱼类性腺发育成熟过程中的重要营养素, 因此, 脂质代谢的紊乱和脂质组成的不合理, 很可能导致鱼类生殖系统发育障碍, 这或许是 POPs 造成水生动物生殖发育障碍的原因之一。

在哺乳动物的研究中, POPs 中的三丁基锡(TBT)和三苯基锡(TPT)可特异地结合细胞核受体, 如类视黄醇 X 受体(RXR)和过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ)。其中, RXRs 和 PPARs 在细胞脂质代谢中具有重要作用, POPs 与 RXRs 结合后, 促进 RXRs 下游的脂合成基因固醇调节元件结合蛋白(*srebp1*)、脂肪酸转运蛋白(*fatp*)和 *fas* 的 mRNA 表达(Grün *et al*, 2006); 而 POPs 与 PPAR γ 结合后, 通过调节 RXR-PPAR γ 通路刺激脂肪细胞 3T3 分化, 进而促进细胞内脂肪的积累和储存(Kanayama *et al*, 2004)。亦有研究表明, TBT 通过激活腺苷酸活化蛋白激酶

(AMPK)代谢通路进而调节脂质代谢(Nakatsu *et al*, 2008; Grün *et al*, 2009)。但在鱼类中, POPs 影响脂质代谢的分子机制尚未得到完全阐明。

2 重金属对鱼类脂质代谢的影响

重金属是被研究较多的环境污染物,然而,多年以来,研究者针对重金属对水生动物的毒理效应研究多集中于生殖、发育和器官畸形等方面,而重金属对鱼类内分泌与代谢,尤其是脂质代谢的影响研究则相对较少。近年来,一系列研究表明,重金属对水生动物的内分泌和代谢系统同样存在显著影响。因此,重金属也越来越多地被研究者认定为一类环境内分泌干扰物(Katti *et al*, 1984; Kopp *et al*, 1982; Richetti *et al*, 2011; Tulasi *et al*, 1992)。

2.1 Hg 在鱼体中的沉积及对鱼类脂质代谢的影响

Hg 是环境中毒性最强的重金属之一,甲基汞(MeHg)是 Hg 在水环境中主要的存在形式,同时也是对动物和人体毒性最大的汞化物。目前, Hg 已广泛存在于全球各大水体,中国东部沿海水体 Hg 含量为 0.004~2.4 $\mu\text{g/L}$ (李磊等, 2011; 张亚南等, 2013), 中国内陆淡水水域的 Hg 含量则在 0.19~36 ng/L 不等(Guo *et al*, 2008; Wang *et al*, 2013)。水产养殖中,欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)肌肉中 Hg 含量最大值可达 0.021 mg/kg ww (万慧珊等, 2017)。在关于 MeHg 暴露与 2 种印度鲶鱼(*Wallago attu*, *Mystus aor*)体脂质代谢关系的研究中发现,鱼体中富含脂肪的腹部肌肉可大量积累 MeHg; 随着鱼体脂肪含量的逐渐增加,体内腹部肌肉中 MeHg 的含量也随之提高,由此该研究提出 MeHg 在鱼体内的蓄积与鱼体脂肪含量具有显著的相关性(Pal *et al*, 2013)。但另一项对蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)的研究结论则与之相反,此研究提出 Hg 在机体中的结合位点位于蛋白质片段上,当鱼体的蛋白含量下降时,与 Hg 结合的位点亦会随着蛋白质含量的下降而减少,因此,体内的 Hg 积累量会出现下降的趋势。而此时脂肪含量的增加会产生对 Hg 积蓄浓度的稀释效应,从而可能出现鱼体中脂肪含量较高,但 Hg 积蓄量却较低的现象(Balshaw *et al*, 2008)。综合上述研究,鱼体中的 Hg 积累是否与脂肪含量相关,至今在学界尚无明确定论。但已有研究表明,水环境中 Hg 对鱼体脂质代谢的影响较大。有研究表明,在水体中用 0.2 mg/L 氯化汞分别暴露印度囊鳃鲶(*Heteropneustes fossilis*) 10、20 和 30 d, Hg 处理组鱼脑中脂肪含量下降,但肝脏和肌肉中的脂肪含量增加,尤其在暴露 20 和 30 d 时,肌肉和肝脏中的脂

肪含量分别达到最大值。此项研究中, Hg 不仅改变了印度囊鳃鲶各组织中的脂肪含量,而且随着 Hg 暴露时间的延长,鱼体各组织中的磷脂和胆固醇含量与比例均发生明显变化,鱼脑、肝脏和肌肉出现显著的脂质过氧化现象(Bano *et al*, 1989)。由于磷脂在脑中具有十分重要的地位,又是细胞膜的主要成分之一, Hg 对磷脂结构和成分的影响,以及所诱发的脂质过氧化,无疑是对鱼类脑部结构的破坏,这或许是 Hg 造成脑神经障碍的原因之一。

2.2 Pb 对鱼类脂质代谢的影响

Pb 因其熔点较低、伸展性好及抗氧化性强等特性,已被大量使用在工业和制造业上,这也使得 Pb 成为在自然界分布最为广泛的重金属之一。中国东部沿海 Pb 含量为 0.02~4.58 $\mu\text{g/L}$ (孙维萍等, 2009), 渤海和黄河的 Pb 含量平均值为 2.62 $\mu\text{g/L}$ (Kong *et al*, 2015)。Pb 不属于动物的必需金属元素,长期高量暴露能够干扰动物的正常代谢和生殖发育(Rosen, 1989; Stowe *et al*, 1971)。在 Pb 影响胡子鲶脂质代谢的研究中发现,用 5 mg/L 的硝酸铅水体暴露胡子鲶 150 d, Pb 能够显著降低精巢、卵巢和脑中的脂肪和胆固醇的含量,但肝脏中的脂肪和胆固醇含量则显著增加(Katti *et al*, 1983)。相应地,在与之类似的研究中,用 5 mg/L 硝酸铅水体暴露攀鲈(*Anabas testudineus*) 30 d 后发现, Pb 暴露降低肝脏和卵巢中的脂肪、磷脂和胆固醇含量,但提高了肝脏和卵巢中游离脂肪酸含量和脂肪酶的活性,同时,显著提高血液中总脂、磷脂、胆固醇和游离脂肪酸含量(Tulasi *et al*, 1992)。与 Hg 的影响类似,高浓度的 Pb 暴露亦可造成脂质过氧化现象。研究表明,用 50 $\mu\text{g/L}$ 的 Pb 水体暴露镜鲤(*Cyprinus carpio*) 30 d, 可导致镜鲤脑中脂质过氧化水平升高至正常水平的 225% (Shafiq Ur, 2003)。由此可见, Pb 对鱼体各组织的脂肪含量和脂质代谢稳态造成干扰,并可能通过对性腺和脑中磷脂含量的影响损害鱼体的性腺发育和脑神经功能。此外, Pb 暴露造成性腺中胆固醇含量的降低,也提示以胆固醇作为前体的鱼体激素合成与分泌会受到 Pb 暴露的影响,从而影响鱼类的生长、发育和性成熟(Singh *et al*, 1979)。

2.3 Cd 对鱼类脂质代谢的影响

环境中的 Cd 污染主要来源于有色金属开采和金属冶炼。中国东部沿海 Cd 含量为 0.001~0.6 $\mu\text{g/L}$ (方涛等, 2012; 李磊等, 2011), 而在湘江流域中检测到的 Cd 含量可达 5.21 mg/L (刘韵琴等, 2013)。黄渤

海中的舌鳎(*Cynoglossus robustus*)和蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)体内的 Cd 与其他重金属相比, 含量最高, 可达 0.2 mg/kg ww (韩丹丹等, 2018)。研究表明, Cd 暴露可影响鱼类的生长发育, 并造成组织器官损伤(Bais *et al*, 2012; Ismail *et al*, 2011)。在 Cd 对鱼类脂质代谢影响的研究中, 用 5 $\mu\text{g/L}$ 的 Cd 对欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)进行水体暴露 30 d 后发现, Cd 暴露组中, 鱼体肌肉和肝脏中的脂肪含量虽然没有发生变化, 但与脂肪合成与分解相关的酶类, 包括葡萄糖六磷酸脱氢酶(G6PD)、六磷酸葡萄糖脱氢酶(6PGD)、苹果酸酶(ME)、异柠檬酸脱氢酶(ICDH)与脂肪组织脂肪酶(ATGL), 其活性和相关基因的表达水平均显著上调。其中, 与脂质降解相关的基因 *atgl* 表达水平比正常水平上调 130 倍(Pierron *et al*, 2007), 表明较低浓度的 Cd 暴露对欧洲鳗的脂质代谢调控体系产生了显著的影响, 尤其可能增加脂肪的分解机能。在较低浓度 Cd 暴露研究中发现, 用 0.68 mg/L 的氯化镉水体暴露线鳢(*Ophiocephalus striatus*) 96 h, 可导致线鳢肝脏中的脂质总含量显著降低(Bais *et al*, 2012)。而用较高浓度 Cd 对鱼类进行水体暴露时, 则往往导致体脂增加。如用 6.8 mg/L 氯化镉暴露印度囊鳃鲶 30 d 后发现, Cd 可导致鱼体肝脏中的脂肪显著积累(Sastry *et al*, 1979); 用 50 mg/L 的氯化镉对胡子鲶进行水体暴露 135 d 后发现, Cd 导致胡子鲶肝脏中的脂肪和胆固醇的含量显著提高, 但在脑、卵巢和精巢中, 脂肪和胆固醇含量均下降(Katti *et al*, 1984)。由此可见, 不同浓度的 Cd 暴露对鱼体脂质代谢存在不同的影响。低浓度下, 短期 Cd 暴露可上调鱼体脂肪降解能力, 从而降低脂肪积累; 而高浓度长期的 Cd 暴露则增加鱼体肝脏中的脂肪积累。多项 Cd 对水生动物的毒理研究表明, 高浓度 Cd 暴露会损伤细胞线粒体的正常结构(张娜娜等, 2008)。由于线粒体是负责鱼体脂肪酸 β -氧化分解的主要细胞器(Ning *et al*, 2016), 高浓度 Cd 对鱼线粒体的破坏, 就将显著降低鱼体的脂肪分解能力, 从而导致脂肪严重积累。

2.4 Cu 对鱼类脂质代谢的影响

与前述 Hg、Pb、Cd 相比, Cu 是鱼类必需微量元素之一, 环境水体中也普遍含有 Cu 元素。中国东海海水中 Cu 含量平均值为 4.6 $\mu\text{g/L}$ (王长友等, 2009), 长江口和杭州湾进海口海水中 Cu 浓度为 0.13~2.72 $\mu\text{g/L}$ (孙维萍等, 2009)。然而, 近年来已有不少文献报道, 水体中的 Cu 亦会对鱼类脂质代谢造成显著影响。如在矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)

的研究上, 用低于 55 $\mu\text{g/L}$ 梯度浓度的 Cu 分别暴露 30 和 60 d 后发现, 在 30 d 时, Cu 可显著促进肝脏中脂肪积累, 上调脂肪合成相关的脂肪酸合成酶(FAS)、苹果酸酶、异柠檬酸脱氢酶活性与过氧化物酶增殖物激活受体 γ 基因(*ppary*)的表达, 并降低脂肪分解相关的 *atgl* 基因表达; 在 60 d 时, Cu 则通过抑制鱼体脂肪合成, 促进脂肪分解途径, 最终降低肝脏中的脂肪含量(Huang *et al*, 2014)。基于不同浓度梯度的 Cu 暴露的研究表明, 用 2、24、71 和 198 $\mu\text{g/L}$ Cu 水体暴露黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 42 d 后, 高浓度的 Cu 暴露可降低黄颡鱼肝脏脂肪合成酶活性和基因的表达, 但显著提高脂蛋白水解酶(LPL)的活性及其 mRNA 水平; 随着 Cu 暴露浓度的逐渐增加, 肝脏和腹腔脂肪组织中的脂肪含量逐渐减少(Chen *et al*, 2013)。综合上述 2 项研究结果可知, 鱼体肝脏中的脂肪含量受到水体中 Cu 浓度与暴露时间的影响, 高浓度 Cu 的长期暴露, 会严重干扰鱼体的脂肪代谢。研究也发现, 不仅水体中的 Cu 暴露可对鱼体脂质代谢造成影响, 饲料中过高的 Cu 含量亦对鱼体脂质代谢产生干扰。用含有 92.45 mg/kg 的过量 Cu 的配合饲料投喂黄颡鱼 8 周, 肝脏中脂肪酸合成酶 FAS 酶活性下降, *ppary*、*atgl* 等与脂肪合成和分解相关基因的 mRNA 表达显著下调, 同时肝脏脂肪显著降低; 而在肌肉和腹腔脂肪组织中, 高 Cu 饲料则不影响脂肪积累, 且此两组织中的脂肪生成酶活性、脂肪合成与分解基因的表达亦无明显变化差异(Chen *et al*, 2015)。综合上述水体暴露和饲料暴露 2 种不同暴露方式的研究可见, 不同 Cu 暴露方式对鱼体脂质代谢均会产生明显影响, 但其作用效果有所不同, 猜测与 Cu 经鳃、皮肤或消化道进入体内的效率差异有关, 但其真正的机制尚待进一步探索。

2.5 重金属对鱼类脂质代谢的复合干扰效应

当前, 大部分研究重金属干扰鱼类脂质代谢的工作都聚焦于单一金属的代谢干扰效应, 但是, 在自然水体中, 各类重金属是同时存在的。因此, 在真实的水域环境中, 重金属对水生动物的内分泌干扰效应必然是来自于多种物质的复合效应。在一项有关 Cu 和 Cd 对矛尾复虾虎鱼的复合内分泌干扰效应研究中, 用 Cu (77 $\mu\text{g/L}$)和 Cd (79 $\mu\text{g/L}$)复合暴露矛尾复虾虎鱼 30 d 后, 结果显示, Cu-Cd 复合暴露与单独 Cu 或 Cd 暴露相比, 前者可更大程度地提高肝脏中的脂肪积累, 并更显著地上调葡萄糖六磷酸脱氢酶、六磷酸葡萄糖脱氢酶、苹果酸酶、异柠檬酸脱氢酶与脂肪酸合成酶活性(Song *et al*, 2014)。遗憾的是, 多种重金

属对鱼类代谢的复合干扰效应研究至今仍极其匮乏,当前的研究成果仍无法真实地评估实际水体中的重金属污染对水生动物的代谢干扰效应。

3 环境雌激素对鱼类脂质代谢的影响

环境雌激素是一类具有雌激素活性的化学物质,主要包括天然雌激素和人工合成的雌激素物质。天然雌激素来源于人和家畜的排泄物,全世界70亿的人口可以排出大约30,000 kg/年的雌激素,但家畜的雌激素排放量更为惊人,可达到83,000 kg/年(Shrestha *et al.*, 2012)。这些含有大量雌激素的排泄物或直接进入废水河流中,或作为天然有机肥料在农业上使用。人工合成的雌激素包括炔雌醇(EE2)、双酚A(BPA)和壬基酚(NP)等,主要来源于杀虫剂和增塑剂等化学品的生产过程、人用和兽用激素类药物,以及人类的日常生活用品。这些天然或人工合成的雌激素通过各种途径最终汇集到水环境中,进而影响人类饮用水质量和水生动物的生长发育。在中国的31个主要城市采集到的62个饮用水样品中,检测到的17 β -E2的最高浓度可达1.7 ng/L (Fan *et al.*, 2013)。BPA在国内外主要河流中的最高浓度为21 μ g/L,在垃圾处理渗液中的浓度可达1.3~17200 μ g/L (平均为269 μ g/L) (Crain *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2001)。目前已有多项研究表明,环境中的雌激素能够通过食物链的富集作用,最终对人体健康造成严重的危害,包括诱发心血管疾病、女性乳腺癌和男性前列腺癌等(Linet, 2008; Nelles *et al.*, 2011; Wocławekpotocka *et al.*, 2013)。

在生态毒理领域,水体中的环境雌激素对水生动物生殖和发育的影响已有较多研究报道。当水中的雌激素含量在低浓度(0.3~10 ng/L)时,雄鱼精巢变小,精子数量下降(Rose *et al.*, 2013),并同时提高卵黄蛋白原(vtg)的表达量,进而影响雄鱼的生殖能力,导致雄鱼发生雌性化现象(Larsen *et al.*, 2008; Parrott *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008)。水体雌激素含量过高时,甚至可能改变水生动物种群结构,威胁种群的生存(Blanchfield *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2007)。然而,环境雌激素对水生动物脂质代谢的研究仍然较少。

在野外的生态调查中发现,加拿大圣克莱尔河中检测到的圆头红马吸口鱼(*Moxostoma macrolepidotum*)体内EE2含量与体脂含量之间存在明显的正相关(Al-Ansari *et al.*, 2010)。研究发现,用100 μ g/L的BPA暴露成年斑马鱼(*Danio rerio*)60 d,可导致斑马鱼肝脏脂肪含量显著升高(Ngo *et al.*, 2017)。用22 μ g/L的

17 β -E2暴露虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)21 d,可诱发鱼体的总脂肪及肝脏中的TG显著积累(Cakmak *et al.*, 2006)。相应地,研究壬基酚(NP)对鱼类脂质代谢的影响时发现,用低于660 μ g/L的不同梯度浓度的NP暴露虹鳟14 d, NP处理组的虹鳟肝脏中TG运输受阻,肝脏中积累大量的脂肪,导致严重的脂肪肝(Cakmak *et al.*, 2003)。以上研究表明,环境雌激素对鱼类脂质代谢产生影响,主要表现为环境雌激素可诱发鱼体组织中的脂肪发生积累。但环境雌激素对鱼类脂质代谢的机制调控研究尚未阐明,在哺乳动物的相关研究中发现,雌激素可通过与雌激素受体 α (ER α)结合激活信号传导与转录激活因子3 (STAT3)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)启动子,进而介导STAT3和AMPK下游脂肪酸代谢相关基因*fas*、硬脂酰CoA去饱和酶-1 (*scd1*)、乙酰辅酶A羧化酶(*acc*)和乙酰辅酶A酰基转移酶1 (*acaal*)的mRNA表达变化(Gao *et al.*, 2006; Palmisano *et al.*, 2017; Pedram *et al.*, 2013)。环境雌激素亦可与PPAR γ 相互作用,介导PPAR γ 下游的脂质代谢基因表达变化(Riu *et al.*, 2011)。但在水生动物中,环境雌激素影响脂质代谢的分子机制尚未得到完全阐明。

4 药物对鱼类脂质代谢的影响

越来越多的研究表明,多种药物都具有对环境生物的内分泌干扰效应。当前,随着全球药物消耗量的提高以及不恰当的处理,药物在海洋、表层水和地下水中的检出率随之增加,甚至在一些地方的饮用水中亦可检测出药物成分(Daughton *et al.*, 1999; Heberer, 2002)。水体中的药物主要来自于制药厂、医院和家庭废水,并以复合药剂或机体排出的代谢产物2种形式存在于水环境中(Bound *et al.*, 2005)。水中的主要药物包括 β 受体阻滞药、脂质调节类药、糖尿病治疗药、减轻心绞痛药以及止痛药和抗生素类药物等(Jones *et al.*, 2002)。人、家畜和鱼类同属于脊椎动物,在基因同源性、生物体的生理结构和代谢模式上具有很高的相似性,因此,水中存在的多种药物成分在鱼体上同样具有作用靶点,从而给水生动物的生理和生殖发育带来不可忽视的潜在危害风险(Fent *et al.*, 2006)。Owen等(2007)提出,鱼类对某些药物的敏感性高于哺乳动物,从而导致药物暴露可能对鱼类产生比哺乳动物更加强烈的机体反应。然而,药物对水生动物代谢的影响仍少有报道,相关数据极其匮乏。

目前,仅有的一些研究主要集中在脂质调节药物和抗生素对鱼类脂质代谢的影响上,其中,贝特类

(Fibrates)药物的研究相对较多。贝特类药物属于人用降脂药物,是 PPAR α 的激活剂,通过与 PPAR α 结合介导下游的脂肪代谢通路,从而激活过氧化物酶体和线粒体中的脂肪酸 β -氧化,促进脂肪分解(Araki *et al.*, 2018; D'costa *et al.*, 1975)。Corcoran 等(2010)研究表明,贝特药物在水中的检出率为 0.03~7 $\mu\text{g/L}$ 。在贝特类对鱼类脂质代谢的研究中发现,虹鳟分别腹腔注射环丙贝特(Ciprofibrate, 35 mg/kg 鱼重)和吉非罗齐(Gemfibrozil, 152 mg/kg 鱼重) 2~3 周,肝脏中乙酰辅酶 A 氧化酶(ACO)活性显著提高,这表明环丙贝特和吉非罗齐可增加肝脏中过氧化物酶体的脂肪酸 β 氧化效率(Scarano *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1990)。Du 等(2008)研究也发现,非诺贝特可降低草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的脂肪合成并提高脂肪酸氧化效率,从而降低血液中甘油三酯和胆固醇浓度,减少全鱼和肝脏中的脂肪和高度不饱和脂肪酸(EPA 和 DHA)的含量。然而,由于贝特类药物存在多种药型,它们在各地水体中的残留量差异较大,对不同鱼类的暴露效应也有所差异。考虑到目前临床上已有大量不同原理的血脂调节药物得到广泛使用,它们对水生动物的内分泌干扰效应仍有大量工作需要开展。

抗生素是人类在临床和动物养殖中使用最久、最广的一类药物。由于早年抗生素在临床和动物养殖中的滥用,使得抗生素在水体中的残留成为当前令人关注的全球性环境问题。然而,环境残留的抗生素对水生动物脂质代谢的影响至今尚未得到研究者的广泛关注。最近,本实验室研究表明,作为当前中国环境水体中残留的主要抗生素,氧四环素和磺胺甲恶唑在环境浓度(420、260 ng/L)以及合法水产治疗剂量(80、100 mg/kg/day)下对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和斑马鱼的 12 周水体和饲料暴露,足以造成鱼体肠道健康、免疫机能和代谢系统的损伤。其中,2 种抗生素均能下调罗非鱼体内的脂肪含量和脂肪酶活性,降低肠道和肝脏中的脂肪合成关键基因 *fas* 和脂肪酸分解关键基因 *cpt1* 的表达水平,显示这 2 种抗生素的低剂量长期暴露对鱼体的脂肪合成和降解均有抑制作用,并以此进一步影响鱼体的代谢与健康(Limbu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018)。由此可以预料,水体中普遍存在的各类抗生素残留都可能对鱼类代谢存在影响。鉴于抗生素在当前水体环境中的广泛存在,这一领域的相关研究亟待得到重视,但相关研究仍极其缺乏。

综上所述,EDCs 对鱼类脂质代谢具有显著而复杂的影响,为清晰地展示各种 EDCs 对鱼类脂质代谢表型的影响,本文将目前已知的相關影响总结于表 1 中。然而,从表 1 也可看出,大部分涉及环境污染物

对脂代谢影响的研究主要集中于生理生化表型的描述,对其真正的分子调控机制的探索仍然较少;而就大量存在的水体环境污染物种类而言,也仍有大量污染物种类,尤其是新型污染物对鱼类代谢的影响,尚无相关研究。

5 展望

5.1 全面开展各类传统和新型 EDCs 对鱼类脂质代谢的影响研究

本文综述了已有文献中关于 EDCs 对鱼类脂质代谢影响的研究,然而,这方面大部分研究仍主要集中在 PCBs、OCPs、重金属等传统环境污染物上,而对于当前的新型环境污染物研究较少。事实上,随着当前新型材料的研发与应用,水体中环境污染物的种类不断增加,比如自然界分布广泛的微塑料和纳米材料及一些新型代谢调节类药物和新型抗生素等,都开始进入毒理学家和生态学家的视野。然而,这些新型污染物对鱼类代谢的影响研究存在大量空白之处,因此,在进一步阐明传统 EDCs 对鱼类脂质代谢的作用机制的同时,后续研究也应着力关注当前新型环境污染物对鱼类脂质代谢的影响及其内分泌干扰机制,为更准确评价当前的环境健康与水生动物健康提供基础数据。

5.2 加强开展 EDCs 在低浓度下的慢性暴露和复合暴露研究

客观地说,在当前大部分 EDCs 对水生动物的生态毒理研究中,所采用的实验浓度往往远高于实际水环境中的 EDCs 浓度,采用的暴露周期也相对较短,这并不能反映实际环境的状态。在实际水环境中的 EDCs 效应,往往更多来自于低剂量的慢性暴露,然而这方面的实验室模拟研究仍相对较少。因此,基于 EDCs 的实际环境浓度开展长期慢性暴露研究需要得到研究者的重视。同时,由于环境中 EDCs 对鱼体的危害不仅仅由单个污染物引发,而往往来自多种污染物的复合效应。因此,研究者在后续研究中,也需要加强研究多种 DEC 在低浓度的慢性复合效应,以使研究成果更接近真实的生态环境。

5.3 重视开展 EDCs 影响鱼类脂质代谢与关联生理过程的分子机制研究

从本文综述可见,大部分的 EDCs 均会影响鱼体中的脂质代谢。目前的研究表明,EDCs 往往通过干扰脂肪在鱼体器官中的合成、分解效率与转运效率(Katti *et al.*, 1983、1984),最终导致肝脏、肌肉等组

表1 EDCs对鱼类脂质代谢影响
Tab.1 The effects of EDCs on fish lipid metabolism

干扰物 EDCs	品种 Species	组织器官 Tissue and organ	脂质代谢变化 Lipid metabolism	参考文献 Reference
PCBs	三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	肝脏 Liver	总脂质↑	Holm 等(1993)
	银鲑 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	肝脏 Liver 躯壳 Carcass	总脂质↑ 总脂质↓	Leatherland 等(1979)
Aldrin	胡子鲶 <i>Clarias batrachus</i> L.	肝脏 Liver 血清 Serum	胆固醇↓ 胆固醇↑	Bano (1982)
γ -BHC/ Malathion	胡子鲶 <i>Clarias batrachus</i> L.	肝脏 Liver	磷脂合成↓磷脂转运↓ 脂肪酸转运↓	Lal 等(1987)
PBDEs/PCNs	三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	肝脏 Liver	总脂质↑	Holm 等(1993)
Cd	欧洲鳗 <i>Anguilla anguilla</i>	肝脏 Liver/ 肌肉 Muscle	脂肪合成↑TG 利用↑	Pierron 等(2007)
	线鳢 <i>Ophiocephalus striatus</i>	肝脏 Liver	总脂质↓	Bais (2012)
	印度囊鳃鲶 <i>Heteropeneustes fossilis</i>	肝脏 Liver	总脂质↑	Sastry 等(1979)
	胡子鲶 <i>Clarias batrachus</i> L.	脑 Brain/精卵巢 Gonad 肝脏 Liver	脂肪↓胆固醇↓ 脂肪↑胆固醇↑	Katti 等(1984)
Pb	攀鲈 <i>Anabas testudineus</i>	血浆 Plasma 肝脏 Liver/ 卵巢 Ovary	脂肪↑磷脂↑胆固醇↑ 游离脂肪酸↑ 脂肪↓胆固醇↓磷脂↓ 脂肪酶活性↑	Tulasi 等(1992)
	镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	脑 Brain	脂质过氧化↑	Shafiq ur(2003)
Hg	囊鳃鲶 <i>Heteropeneustes fossilis</i>	脑 Brain	脂肪↓磷脂↑脂质过氧化↑	Bano 等(1989)
		肝脏 Liver	脂肪↑磷脂↑胆固醇↑ 脂质过氧化↑	
		肾脏 Kidney	脂肪↑胆固醇↑磷脂↑	
		肌肉 Muscle	脂肪↑磷脂↑胆固醇↓ 脂质过氧化↑	
Cu	矛尾复虾虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>	肝脏 Liver	(30 d)脂肪↑脂合成↑ 脂分解↓ (60 d)脂合成↓脂分解↑	Huang 等(2014)
	黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	肝脏 Liver/腹腔组织 Abdominal tissue	总脂质↓脂合成↓脂分解↑	Chen 等(2013)
Cu+Cd	矛尾复虾虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>	肝脏 Liver	脂肪↑脂合成↑	Song 等(2014)
BPA	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	肝脏 Liver	脂肪含量↑	Ngo 等(2017)
17 β -E2	虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	肝脏 Liver	TG↑	Cakmak 等(2006)
NP	虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	肝脏 Liver	脂肪含量↑TG 转运↓	Cakmak 等(2003)
环丙贝特/ 吉非罗齐	虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	肝脏 Liver	ACO 活性↑脂肪酸 β 氧化↑	Yang 等(1990) Scarano 等(1994)
非诺贝特	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	血浆 Plasma	TG↓总胆固醇↓	Du 等(2008)
		全鱼 Whole fish	脂肪↓EPA↓DHA↓	
		肝脏 Liver		
磺胺甲恶唑/ 氧四环素	罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> / 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	肝脏 Liver 肠道 Intestine	脂肪↓脂肪酶活性↓ 脂肪合成↓脂肪分解↓	Zhou 等(2017) Limbu 等(2018)

织器官中的脂肪异常积累,影响鱼体健康与食用安全(Cakmak *et al*, 2006; Ito *et al*, 1974; Pal *et al*, 2013)。但是, EDCs 在鱼类脂质代谢和能量平衡调节中的具体作用机制、关键作用靶点等尚未得到阐明,这大大限制了人们对 EDCs 作用原理的理解。此外, EDCs 对鱼类脂质代谢的影响并非仅仅影响脂质代谢本身,而更有可能介由脂质代谢异常进一步影响鱼体的生殖、发育以及抗病免疫过程等。然而,这些相关生理过程的关键连接过程、位点和作用机制均尚未阐明。因此,在今后的研究中,研究者应加强利用现代生物学技术,深入探讨 EDCs 影响脂质代谢及其关联生理过程的分子机制,这既有利于更深入地阐明鱼类代谢性疾病的发生原因,也为保障水产品的绿色安全提供重要的参考依据。

参 考 文 献

- Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, *et al*. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environmental Pollution*, 2010, 158(8): 2566–2571
- Araki M, Nakagawa Y, Oishi A, *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist pemafibrate protects against diet-induced obesity in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2148
- Bais UE, Lokhande MV. Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus* (*Channa*). *International Journal of Zoological Research*, 2012, 8(1): 23–32
- Balshaw S, Edwards JW, Ross KE, *et al*. Mercury distribution in the muscular tissue of farmed southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) is inversely related to the lipid content of tissues. *Food Chemistry*, 2008, 111(3): 616–621
- Bano Y, Hasan M. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 1989, 24(2): 145–166
- Bano YA. Effects of aidrin on serum and liver constituents of freshwater carcharias, *Clarias batrachus* L. *Proceedings: Animal Sciences*, 1982, 91(1): 27–32
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, 55(6–7): 910–931
- Bernet D, Liedtke A, Bittner D, *et al*. Gonadal malformations in whitefish from lake thun: Defining the case and evaluating the role of EDCs. *Chimia International Journal for Chemistry*, 2008, 62(5): 383–388
- Blanchfield P, Kidd K, Docker M, *et al*. Recovery of a wild fish population from whole-lake additions of a synthetic estrogen. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(5): 3136–3144
- Boon JP, Duinker JC. Kinetics of polychlorinated biphenyl (PCB) components in juvenile sole (*Solea solea*) in relation to concentrations in water and to lipid metabolism under conditions of starvation. *Aquatic Toxicology*, 1985, 7(1–2): 119–134
- Bound JP, Nikolaos V. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(12): 1705–1711
- Bruner KA, Fisher SW, Landrum PF. The role of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in contaminant cycling: I. The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of PCBs and PAHs. *Journal of Great Lakes Research*, 1994, 20(4): 725–734
- Cabana H, Jones JP, Agathos SN. Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Engineering in Life Sciences*, 2007, 7(5): 429–456
- Cakmak G, Togan I, Severcan F. 17 β -estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77(1): 53–63
- Cakmak G, Togan I, Uğuz C, *et al*. FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57(7): 835
- Cao XQ, Lv XF, Cheng L. Analysis on removal efficiency of PCBs by typical wastewater treatment process. *China Water and Wastewater*, 2016, 32(21): 114–118 [曹秀芹, 吕小凡, 程琳. 典型污水处理工艺对多氯联苯去除效果的分析. *中国给水排水*, 2016, 32(21): 114–118]
- Camevali O, Notarstefano V, Olivotto I, *et al*. Dietary administration of EDC mixtures: A focus on fish lipid metabolism. *Aquatic Toxicology*, 2017, 185: 95–104
- Chen QL, Luo Z, Pan YX, *et al*. Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper. *Aquatic Toxicology*, 2013, 136(3): 72–78
- Chen QL, Luo Z, Wu K, *et al*. Differential effects of dietary copper deficiency and excess on lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 184: 19–28
- Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40(4): 287–304
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, *et al*. An ecological assessment

- of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2): 225–239
- Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107 (Suppl 6): 907–938
- D'Costa MA, Angel A. Inhibition of hormone-stimulated lipolysis by clofibrate. A possible mechanism for its hypolipidemic action. *Journal of Clinical Investigation*, 1975, 55(1): 138–148
- Du ZY, Clouet P, Degrace P, *et al.* Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(6): 1200–1212
- Du ZY. Causes of fatty liver in farmed fish: A review and new perspectives. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1628–1638 [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考. *水产学报*, 2014, 38(9): 1628–1638]
- Rose E, Paczolt KA, Jones AG. The effects of synthetic estrogen exposure on pre mating and post mating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(8): 1160–1170
- Ewald G, Larsson P. Partitioning of ¹⁴C-labelled 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl between water and fish lipids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, 13(10): 1577–1580
- Fan Z, Hu J, An W, *et al.* Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: Comparison to the parent compounds. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47(19): 10841–10850
- Fang T, Li DJ, Tang JL, *et al.* Evaluation on distribution of heavy metal elements in sediments and bed material environment in Yangtze River Estuary and its adjacent sea. *Yangtze River*, 2012, 43(10): 68–71, 81 [方涛, 李道季, 唐静亮, 等. 长江口及近海区沉积物重金属与底质环境评价. *人民长江*, 2012, 43(10): 68–71, 81]
- Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 122–159
- Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, *et al.* Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: A possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(6): 1287–1299
- Grün F, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 304(1): 19–29
- Grün F, Watanabe H, Zamanian Z, *et al.* Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(9): 2141–2155
- Guo Y, Feng X, Li Z, *et al.* Distribution and wet deposition fluxes of total and methyl mercury in Wujiang River Basin, Guizhou, China. *Atmospheric Environment*, 2008, 42(30): 7096–7103
- Hamelink JL, Waybrant RC, Ball RC. A proposal: Exchange equilibria control the degree chlorinated hydrocarbons are biologically magnified in lentic environments. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1971, 100(2): 207–214
- Han DD, Zhao F, MU WL, *et al.* Hazard analysis and screening of the prior heavy metals of priority pollution in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 46–53 [韩丹丹, 赵峰, 牟伟丽, 等. 黄渤海鱼类优先监控重金属污染物的筛选与评价. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 46–53]
- Hardell S, Tilander H, Welfinger-Smith G, *et al.* Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and three organochlorine pesticides in fish from the Aleutian Islands of Alaska. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12396
- Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*, 2002, 131(1–2): 5–17
- Holm G, Norrgren L, Andersson T, *et al.* Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology*, 1993, 27(1–2): 33–50
- Huang C, Chen QL, Luo Z, *et al.* Time-dependent effects of waterborne copper exposure influencing hepatic lipid deposition and metabolism in javelin goby *Synechogobius hasta* and their mechanism. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155(4): 291–300
- Huang CH, Xiao TY, Hu Y, *et al.* Analysis on research status of fatty liver disease in aquaculture fish. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(7): 1715–1722 [黄春红, 肖调义, 胡毅, 等. 养殖鱼类脂肪肝研究现状分析. *动物营养学报*, 2014, 26(7): 1715–1722]
- Huang GY, Ying GG, Liu S, *et al.* Regulation of reproduction- and biomarker-related gene expression by sex steroids in the livers and ovaries of adult female western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2012, 162(1): 36–43
- Ismail A, Yusof S. Effect of mercury and cadmium on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63(5–12): 347–349
- Ito Y, Murata T. Studies on the influence of PCB on aquatic organisms-IV: Changes in serum lipid contents and formation of lipid peroxide in the tissues of carp administered with PCB orally. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1974, 40(3): 261–265
- Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 2002, 36(20): 5013–5022

- Jørgensen EH, Burkow IC, Foshaug HKB, *et al.* Influence of lipid status on tissue distribution of the persistent organic pollutant octachlorostyrene in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1997, 118(3): 311–318
- Kanayama T. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor pathway. *Molecular Pharmacology*, 2004, 67(3): 766–774
- Kang JH, Aasi D, Katayama Y. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 2007, 37(7): 607–625
- Katti SR, Sathyanesan AG. Changes in tissue lipid and cholesterol content in the catfish *Clarias batrachus* (L.) exposed to cadmium chloride. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1984, 32(4): 486–490
- Katti SR, Sathyanesan AC. Lead nitrate induced changes in lipid and cholesterol levels in the freshwater fish *Clarias batrachus*. *Toxicology Letters*, 1983, 19(1–2): 93–96
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, *et al.* Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(21): 8897–8901
- Kong P, Luo W, Lu Y, *et al.* Distribution and bioaccumulation of lead in the coastal watersheds of the Northern Bohai and Yellow Sea in China. *Environmental Geochemistry and Health*, 2015, 37(3): 491–506
- Koponen K, Myers MS, Ritola O, *et al.* Histopathology of feral fish from a PCB-contaminated freshwater lake. *Ambio*, 2001, 30(3): 122–126
- Kopp SJ, Glonek T, Perry HM, *et al.* Cardiovascular actions of cadmium at environmental exposure levels. *Science*, 1982, 217(4562): 837–839
- Lal B, Singh TP. Impact of pesticides on lipid metabolism in the freshwater catfish, *Clarias batrachus*, during the vitellogenic phase of its annual reproductive cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1987, 13(1): 13–23
- Larsen MG, Hansen KB, Henriksen PG, *et al.* Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminising effects of 17 α -ethinyloestradiol—morphological sexual characteristics do not. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87(4): 234–244
- Larsson P, Backe C, Bremle G, *et al.* Persistent pollutants in a salmon population (*Salmo salar*) of the southern Baltic Sea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(1): 62–69
- Le Bihanic F, Cl randeau C, Le Menach K, *et al.* Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(24): 13732–13743
- Leatherland JF, Sonstegard RA, Holdrinet MV. Effect of dietary Mirex and PCB's on hepatosomatic index, liver lipid, carcass lipid and PCB and Mirex bioaccumulation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1979, 63(2): 243–246
- Li J, Haffner GD, Paterson G, *et al.* Importance of growth rate on mercury and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37(6), 1655–1667
- Li L, Ping XY, Shen XQ. Spatial and temporal distribution and pollution evaluation of the dissolved heavy metals in the Changjiang Estuary. *Journal of Zhejiang University*, 2011, 38(5): 541–549 [李磊, 平仙隐, 沈新强. 春、夏季长江口溶解态重金属的时空分布特征及其污染评价. *浙江大学学报(理学版)*, 2011, 38(5): 541–549]
- Limbu SM, Zhou L, Sun SX, *et al.* Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environment International*, 2018, 115: 205–219
- Lin T, Li J, Xu Y, *et al.* Organochlorine pesticides in seawater and the surrounding atmosphere of the marginal seas of China: Spatial distribution, sources and air-water exchange. *Science of the Total Environment*, 2012, 435–436(7): 244–252
- Linnet MS. Invited commentary: Postmenopausal unopposed estrogen and breast cancer risk in the women's health initiative--before and beyond. *American Journal of Epidemiology*, 2008, 167(12): 1416–1420
- Liu L, Li H, Wang Z, *et al.* Insights into spatially and temporally co-occurring polybrominated diphenyl ethers in sediments of the East China Sea. *Chemosphere*, 2015, 123: 55–63
- Liu WX, He W, Qin N, *et al.* Residues, distributions, sources, and ecological risks of OCPs in the water from Lake Chaohu, China. *Scientific World Journal*, 2012, 897697
- Liu YL. Concentration characteristics and loading of organochlorine pesticides (OCPs) in the West River, south China. *Journal of Shenzhen Institute of Information Technology*, 2008, 6(4): 76–80 [刘艳霖. 西江流域有机氯农药含量组成特征及年通量. *深圳信息职业技术学院学报*, 2008, 6(4): 76–80]
- Liu YP, Li JG, Zhao YF, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and indicator polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine fish from four areas of China. *Chemosphere*, 2011, 83(2): 168–174
- Liu YQ, Liu YG, HU XJ, *et al.* Adsorption of Cr(VI) by modified chitosan from heavy-metal polluted water of Xiangjiang River, China. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2013, 23(10): 3095–3103 [刘韵琴, 刘云国, 胡新将, 等. 改性壳聚糖对湘江河水中重金属污染物 Cr(VI)的吸附. *中国有色金属学报(英文版)*, 2013(10): 3095–3103]
- Maisano M, Cappello T, Oliva S, *et al.* PCB and OCP

- accumulation and evidence of hepatic alteration in the Atlantic bluefin tuna, *T. thynnus*, from the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, 2016, 121: 40–48
- McLeod A, Leadley TA, Drouillard KG, *et al.* Effect of season and habitat on PCB bioaccumulation by caged bluegill sunfish deployed in a Great Lakes area of concern. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 93(1): 1–6
- Milestone CB, Orrego R, Scott PD, *et al.* Evaluating the potential of effluents and wood feedstocks from pulp and paper mills in Brazil, Canada, and New Zealand to affect fish reproduction: Chemical profiling and in vitro assessments. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(3): 1849–1858
- Miller MA, Madenjian CP, Masnado RG. Patterns of organochlorine contamination in lake trout from Wisconsin waters of the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 1992, 18(4): 742–754
- Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 230(3): 358–363
- Nelles JL, Hu WY, Prins GS. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 2011, 6(3): 437–451
- Ngo MT, Doan TT-P, Nguyen CT, *et al.* Chronic exposure of $\mu\text{g/L}$ range Bisphenol A to adult zebrafish (*Danio rerio*) leading to adipogenesis. *AIP Conference Proceedings*, 2017, 1878(1): 020028
- Ning LJ, He AY, Li JM, *et al.* Mechanisms and metabolic regulation of PPAR α activation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2016, 1861(9): 1036–1048
- Owen SF, Giltrow E, Huggett DB, *et al.* Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: Mammals versus fish. *Aquatic Toxicology*, 2007, 82(3): 145–162
- Pal M, Ghosh M. Relationship of methyl mercury accumulation with lipid and weight in two river cat fish species, *Wallago attu* and *Mystus aor*, from West Bengal, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(1): 31–37
- Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1043: 227–256
- Parrott JL, Blunt BR. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology*, 2005, 20(2): 131–141
- Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, *et al.* Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Science Signaling*, 2013, 6(276): 36
- Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, *et al.* Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology*, 2007, 81(3): 304–311
- Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, *et al.* Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, 2011, 32(1): 116–122
- Riu A, Grimaldi M, le Marine A, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(9): 1227–1232
- Rosen JF. Metabolic abnormalities in lead toxic children: Public health implications. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 1989, 65(10): 1067–1084
- Sastry KV, Gupta PK. The effect of cadmium on the digestive system of the teleost fish, *Heteropneustes fossilis*. *Environmental Research*, 1979, 19(2): 221–230
- Scarano LJ, Calabrese EJ, Kostecki PT, *et al.* Evaluation of a rodent peroxisome proliferator in two species of freshwater fish: Rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 29(1): 13–19
- Shafiq ur R. Lead-exposed increase in movement behavior and brain lipid peroxidation in fish. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 2003, 38(4): 631–643
- Shrestha SL, Casey FX, Hakk H, *et al.* Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(20): 11047–11053
- Singh AK, Singh TP. Seasonal fluctuation in lipid and cholesterol content of ovary, liver and blood serum in relation to annual sexual cycle in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Endokrinologie*, 1979, 73(1): 47–54
- Song YF, Luo Z, Pan YX, *et al.* Effects of copper and cadmium on lipogenic metabolism and metal element composition in the javelin goby (*Synechogobius hasta*) after single and combined exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 67(2): 167–180
- Stow CA, Jackson LJ, Amrhein JF. An examination of the PCB: Lipid relationship among individual fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1997, 54(5): 1031–1038
- Stowe HD, Goyer RA. Reproductive ability and progeny of F₁ lead-toxic rats. *Fertility and Sterility*, 1971, 22(11): 755–760
- Sun SX, Hua XM, Deng YY, *et al.* Tracking pollutants in dietary fish oil: From ocean to table. *Environmental Pollution*, 2018, 240: 733–744
- Sun WP, Pan JM, Lv HY, *et al.* Distribution of dissolved trace metals in summer and winter of 2006 in Changjiang River Estuary and Hangzhouwan Bay. *Journal of Marine Sciences*, 2009, 27(1): 37–43 [孙维萍, 潘建明, 吕海燕, 等. 2006年夏冬季长江口、杭州湾及邻近海域表层海水溶解态重金

- 属的平面分布特征. 海洋学研究, 2009, 27(1): 37–43]
- Tang Z, Huang Q, Yang Y, *et al.* Organochlorine pesticides in the lower reaches of Yangtze River: Occurrence, ecological risk and temporal trends. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 87: 89–97
- Tri TM, Anh DH, Hoai PM, *et al.* Emerging endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals in Vietnam: A review of environmental occurrence and fate in aquatic and indoor environments. 2016, 10.1021/bk-2016-1244.ch010
- Trudeau V, Tyler C. Endocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 153(1–3): 13–14
- Tulasi SJ, Reddy PUM, Rao JVR. Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives in the freshwater fish *Anabas testudineus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1992, 23(1): 33–38
- Wan HS, Cheng B, Song XH, *et al.* Contamination and accumulation of heavy metals in *Dicentrarchus labrax* cultured in recirculating aquatic systems. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 83–91 [万慧珊, 程波, 宋晓红, 等. 循环水养殖欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)重金属污染状况与富集分布特征. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 83–91]
- Wang B, Yu G, Huang J, *et al.* Probabilistic ecological risk assessment of OCPs, PCBs, and DLCs in the Haihe River, China. *Scientific World Journal*, 2010, 10(1): 1307–1317
- Wang CY, Wang XL, Sun BY, *et al.* Primary study on ecological criterion of heavy metals in East China Sea. *Marine Environmental Science*, 2009, 28(5): 544–548 [王长友, 王修林, 孙百晔, 等. 东海主要重金属生态基准浓度初步研究. 海洋环境科学, 2009, 28(5): 544–548]
- Wang S, Xing D, Wei Z, *et al.* Spatial and seasonal variations in soil and river water mercury in a boreal forest, Changbai Mountain, Northeastern China. *Geoderma*, 2013, 206: 123–132
- Wania F. Assessing the potential of persistent organic chemicals for long-range transport and accumulation in polar regions. *Environmental Science and Technology*, 2003 37(7): 1344–1351
- Woclawek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, *et al.* Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 650984
- Xu H, Yang J, Wang Y, *et al.* Exposure to 17 α - ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(1): 1–8
- Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, *et al.* Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere*, 2001, 42(4): 415–418
- Yang JH, Kostecki PT, Calabrese EJ, *et al.* Induction of peroxisome proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1990, 104(3): 476–482
- Zhang L, Shi S, Dong L, *et al.* Concentrations and possible sources of polychlorinated biphenyls in the surface water of the Yangtze River Delta, China. *Chemosphere*, 2011, 85(3): 399–405
- Zhang NN, Mao WP, Wei CJ, *et al.* Influence of cadmium on structure and functions of mitochondria in hepatic cells. *National Medical Journal of China*, 2008, 88(19): 1350–1353 [张娜娜, 毛伟平, 魏传静, 等. 镉对人肝细胞 WRL-68 离体线粒体结构及功能的影响. 中华医学杂志, 2008, 88(19): 1350–1353]
- Zhang YN, He Q, Chen JM, *et al.* Heavy metals' process in water and pollution risk assessment in surface sediments of the Zhujiang River Estuary. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013, 35(2): 178–186 [张亚南, 贺青, 陈金民, 等. 珠江口及其邻近海域重金属的河口过程和沉积物污染风险评价. 海洋学报, 2013, 35(2): 178–186]
- Zhou L, Limbu SM, Shen M, *et al.* Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environmental Pollution*, 2018, 235(1): 245–254

(编辑 马璀璨)

The Effects of Environmental Endocrine Disrupting Chemicals on Lipid Metabolism in Fish: Review and Perspectives

SUN Shengxiang, DU Zhenyu^①

(Laboratory of Aquaculture Nutrition and Environmental Health, School of Life Sciences,
East China Normal University, Shanghai 200241)

Abstract Metabolic diseases, which are always characterized with abnormal lipid metabolism and severe fat deposition, have been commonly observed in farmed fish. However, the causes of the abnormal lipid metabolism in fish are complicated and difficult to be identified. In recent years, several studies have shown that environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs), which are widely spread in the aquatic environment, not only have chronic toxic effects on fish development and reproduction, but also affect fish lipid metabolism and cause severe fat deposition, which would damage the quality and food safety of farmed fish. For the first time, this review systematically reviews the effects of EDCs on fish lipid metabolism. Persistent organic pollutants (POPs), heavy metals (Hg, Pb, Cd and Cu), environmental estrogens and artificially synthesized medicines (fibrates and antibiotics) are four major EDCs in water environment. In general, water or dietary exposure of these EDCs would disturb the biochemical activities and/or expressions of the enzyme proteins in the lipid metabolism pathways, including upregulating lipogenesis, inhibiting mitochondrial fatty acid β -oxidation, adipose tissue lipolysis and lipid transport cross tissues, and so on. The exposure of EDCs with high doses would also impair the functions of cellular organelles, such as mitochondria and peroxisome, which are important in the lipid metabolism. Recently, the disturbing effects of EDCs on some lipid metabolism-related nuclear receptors, such as peroxisome proliferators-activated receptors (*PPARs*) and sterol-regulatory element binding proteins (*SREBPs*), had also been found. However, it should be pointed out that among these EDCs, they also have specific mechanisms in affecting fish lipid metabolism and tissue deposition of fat. Even in the same EDC, different exposure method, duration and doses would also cause different effects in disturbing lipid metabolism in fish. In future research, more attentions should be paid on the endocrine disturbing effects of new environmental pollutants, combined effects of different EDCs, and the molecular mechanisms of EDCs effects. This review is helpful in studying EDCs in fish metabolism and also provides important theoretical supports for green and sustainable aquaculture development.

Key words Environmental endocrine disrupting chemicals; Environmental pollution; Fish; Lipid metabolism; Aquaculture

① Corresponding author: DU Zhenyu, E-mail: zydu@bio.ecnu.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180226001

http://www.yykxjz.cn/

陶雅晋, 冯波, 易木荣, 李波, 卢伙胜, 颜云榕. 基于渔港抽样调查不同捕捞方式 CPUE 单位标准化新方法. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 15-24

Tao YJ, Feng B, Yi MR, Li B, Lu HS, Yan YR. A novel approach to unit standardization of CPUE for multiple types of fishing gear based on fishing port sampling surveys. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 15-24

基于渔港抽样调查不同捕捞方式 CPUE 单位标准化新方法*



陶雅晋¹ 冯波^{1,2,3} 易木荣¹ 李波¹ 卢伙胜^{1,2,3} 颜云榕^{1,2,3,4①}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心 湛江 524088; 3. 广东省南海深远海渔业管理与捕捞工程技术研究中心 湛江 524088; 4. 广东海洋大学深圳研究院海洋渔业信息化技术化中心 深圳 518000)

摘要 本研究是在阐明传统 CPUE(Catch Per Unit Effort)单位表述多样性的基础上,分析传统 CPUE 存在的不确定性、单位不统一性以及解析与意义不完整等问题。对 24 个 CPUE 单位,首先通过通用性标准,筛选出各种捕捞方式均能适用的 8 个 CPUE 单位;再通过相似性标准,对 CPUE 单位聚类分成 2 组,并在每组中筛选出最佳单位为 kg/(kW·d)和 kg/d;最后通过稳定性筛选标准对其标准差与变异系数值计算,最终得到 CPUE 的标准单位: kg/(kW·d),并确定 CPUE 的表达形式。本研究还基于 CPUE 单位标准化进行了实证分析,对 2016 年 4 个季度南海三省区的 9 种主要作业类型渔船的生产调查数据进行了分析比较,捕捞能力大小依次为:围网>双拖>刺网>罩网>张网>单拖>拖虾>笼壶>钓具。CPUE 经单位标准化后已具备进行捕捞产量统计、评估渔船捕捞能力、衡量资源相对丰度指数、评估渔业资源利用水平等功能。

关键词 CPUE; 单位标准化; kg/(kW·d); kg/d; 捕捞能力

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0015-10

单位捕捞努力量渔获量(Catch Per Unit Effort, CPUE)是指某渔场在某一时间段内总渔获量与总捕捞努力量的比值,表示的是平均捕捞努力量所对应的渔获量(詹秉义, 1995)。CPUE 通常被假定与渔业资源量之间成正比关系,是渔业资源生物量的重要指标(朱国平等, 2016)。

渔业资源的评估对生态系统的监测与保护、渔业的科学管理、渔业政策方针的制定等方面起着重要的

基础性作用(周应其, 2014)。国外有学者很早就开始强调使用捕捞渔获物和捕捞努力量数据作为统计资源丰度的指数(Smith, 1994),早期是利用渔获量的时间变化来预测相对种群丰度的年度变化(Robson, 1961)。国内很多学者通过模型方法对 CPUE 标准化(官文江等, 2014; 许骆良等, 2015)和渔场预报(方学燕等, 2014; 汪金涛等, 2014)等方面做了大量讨论与研究。随着计算机技术的发展、先进统计软件的广泛使

* 国家自然科学基金项目(41376158)和广东省教育厅南海深远海渔业资源评估与监测(2014GKXM048)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41376158), and Assessment and Monitoring of Deep Sea Fisheries Resources in the South China Sea, Guangdong Provincial Education Department (2014GKXM048)]. 陶雅晋, E-mail: 1129230184@qq.com

① 通讯作者: 颜云榕, 教授, E-mail: yanyr@gdou.edu.cn

收稿日期: 2018-02-26, 收修改稿日期: 2018-03-28

用和各种模型的推断与应用,可以在 CPUE 标准化过程中允许更多的因素纳入,并去除相关影响(官文江等,2014)。利用渔获量和捕捞努力量数据为基础,计算丰度指数仍然是评估鱼类种群大小不可或缺的方法之一(Campbell,2004),但传统 CPUE 在表述中也存在一些明显问题:一是由于渔船的作业类型、大小、网具特征等因素的不同,传统 CPUE 的表达形式表现出多样性与复杂性;二是捕捞能力是 CPUE 标准化必须考虑的因素,传统 CPUE 无法科学量化捕捞能力大小;三是衡量整个海域的资源情况需要综合考虑各种捕捞方式共同作用的影响,传统 CPUE 因表达形式未统一而难以作为衡量整体资源密度指标;四是传统 CPUE 单位表示呈现多样化与复杂化,导致多捕捞方式之间无法比较问题。

本研究在对传统 CPUE 表述存在各种问题的背景下,提出对 CPUE 的单位进行标准化,从通用性、相似性、稳定性 3 个标准进行合理性分析并筛选,进而确定 CPUE 的单位标准化形式。单位标准化后的 CPUE 能够对多种作业方式具有适应性、兼容性,改变以往因 CPUE 单位不统一而造成渔港渔业统计不规范、数据多次加工的难题,期望在渔业生产统计与

渔业管理范围内获得最佳秩序,以促进渔业资源捕捞可持续发展的最佳效益为目标。

1 材料与方法

1.1 生产调查数据来源

2016 年春(3~4 月)、夏(8 月中下旬)、秋(9~11 月)和冬(1~2 月) 4 个季度,广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心在南海三省区的 14 个主要渔港,对南海的单拖渔船、双拖渔船、拖虾渔船、围网渔船、罩网渔船、刺网渔船、钓渔船、笼壶渔船以及张网船的生产数据进行调查收集,数据记录的内容包括:渔船的主机功率、作业天数、作业海域、船员数、渔获种类与产量等,大部分数据来自渔船各个季度的销售结算单或者是船上的生产记录本,从而保证调查数据的真实性、可靠性与完整性。

1.2 CPUE 单位收集与整理

收集国内外相关文献,整理并记录 CPUE 出现的单位表示方法,并按照渔船的作业方式对 CPUE 单位进行归纳整理(表 1),一共收集了 24 个 CPUE 的单位(表 2)。

表 1 CPUE 单位整理
Tab.1 CPUE units collected according to different fishing types

作业方式 Fishing types	CPUE 单位 CPUE units
单拖 Otter trawl	t/h(逢志伟等,2016)、kg/h(袁兴伟等,2014)、t/d(牛明香等,2010)、t/net(化成君等,2011)、g/h(刘潇等,2015)、t/(h·kn)(孙珊等,2015)、kg/net(李发凯等,2016)、kg/(kW·d)(Ulman,2016)、kg/kW(莫苑敏等,2014)
双拖 Pair trawl	kg/(kW·d)(邹建伟等,2016)、kg/h(刘桂茂等,2000)
桁杆拖网 Beam trawl	kg/(kW·d)(邹建伟等,2016)、kg/h(邹建伟等,2015)
金枪鱼围网 Tuna purse seine	t/(d·net)(王家樵等,2005)、t/d(胡奎伟等,2011)
灯光围网 Light-purse seine	t/net(王从军等,2014)、ctn/net(陈新军等,2009)、t/d(陈峰等,2011)、kg/(kW·d)(杨伯华等,2013)、kg/h(刘桂茂等,2000)
钓具 Fishing tackle	n/(l·h)(陈新军等,2006)、t/d(陈新军等,2011)、t/1000hook(陈雪冬等,2006)、n/1000hook(闫敏等,2015)、n/l(钱卫国等,2008)、n/100 hook(张衡等,2011)、kg/hook(许友伟等,2015;张魁等,2015)、kg/(kW·d)(邹建伟等,2016)
张网 Stow net	kg/net(刘尊雷等,2013)、t/kW(张魁等,2015)
灯光罩网 Falling-net	kg/(kW·d)(邹建伟等,2016)、kg/net(冯波等,2012)、kg/h(张鹏等,2016)、kg/(kW·net)(颜云榕等,2009)、t/net(李雪丁等,2008)
拖虾 Shrimp trawl	kg/(kW·d)(邹建伟等,2016)、kg/h(刘桂茂等,2000)、kg/net(宋海棠等,1997)、t/h(朱国平等,2013)、n/h(凌建忠等,2008)
刺网 Gillnet	kg/(kW·d)(邹建伟等,2016;杨伯华等,2013)、kg/h(邹建伟等,2015)、g/(100 m ² ·h)(邢彬彬等,2017)、n/(p·d)、g/(p·d)(朱建成等,2016)
笼捕 Pot	kg/h(邹建伟等,2015)、g/net·h(董天威,2015)
定置网 Setnets	kg/h(邹建伟等,2015)、kg/d(王生等,2016)、g/(net·h)(陈勇等,2014)、kg/net(张雅芝等,2009)

注: net—网次; kn—节; hook—钩; n—尾; kW—千瓦; l—线; P—片; ctn—箱,下同

Note: net—net; kn—knot; hook—hook; n—tail; kW—kilowatt; l—line; P—piece; ctn—carton, the same as below

表 2 CPUE 单位编号
Tab.2 CPUE units list

编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	编号 No.	CPUE 单位 CPUE units
1	kg/net	7	t/h	13	t/1000hook	19	kg/(kw·net)
2	kg/d	8	t/net	14	n/1000hook	20	g/net·h
3	kg/h	9	t/(h·kn)	15	n/l	21	g/(100 m ² ·h)
4	kg/(kW·d)	10	t/(d·net)	16	n/100hook	22	n/(p·d)
5	g/h	11	ctn/net	17	kg/hook	23	g/(p·d)
6	t/d	12	n/(l·h)	18	t/kW	24	kg/kW

1.3 CPUE 单位标准化方法

筛选过程: 根据通用性、相似性、稳定性 3 个筛选标准, 对 CPUE 的 24 个单位表达式逐步筛选得出 CPUE 标准化单位。由 CPUE 标准化单位确定 CPUE 标准化表达形式, 并在此基础上, 对南海区主要 9 种捕捞方式的 CPUE 进行实证分析(图 1)。

2 结果与分析

2.1 CPUE 筛选

2.1.1 通用性筛选 对已整理的 24 个 CPUE 单位进行通用性标准筛选, 通用性筛选是以能够对各种作业方式均适用原则, 首先逐一列出不具通用性的 CPUE 单位, 并阐述其原因; 最后余下的单位归类为多种渔业通用型 CPUE 单位。

经过通用性筛选, 24 个 CPUE 单位不具通用性

的有 16 个(表 3), 多种渔业通用的 CPUE 单位有 8 个(表 4)。

2.1.2 相似性筛选 将具有通用性的 8 个 CPUE 单位分为 2 类(表 5), 并且阐述其分类依据。

第 1 组 CPUE 的 5 个单位表达式表示渔获量与作业时间的比值关系。针对渔获量的表述: 克(g)是科学单位, 对其精确度要求高, 生产调查统计操作中较难实现; 吨(t)是质量的延伸单位, 对于渔获量相对较少的小型流刺网或笼壶等作业方式不适用; 在国际单位制的基本单位中, 质量的计量单位是千克(kg)。针对时间的表述: 不同作业方式渔船的工作时间不一致, 单拖渔船多是白天作业, 罩网和围网渔船是晚上作业, 刺网渔船等是根据流水情况不定期作业, 因此在作业时间方面, 选择天(d)作为多渔业作业时间统计单位最合适。所以在描述渔获量与时间关系的 CPUE 最佳统计单位为 kg/d。

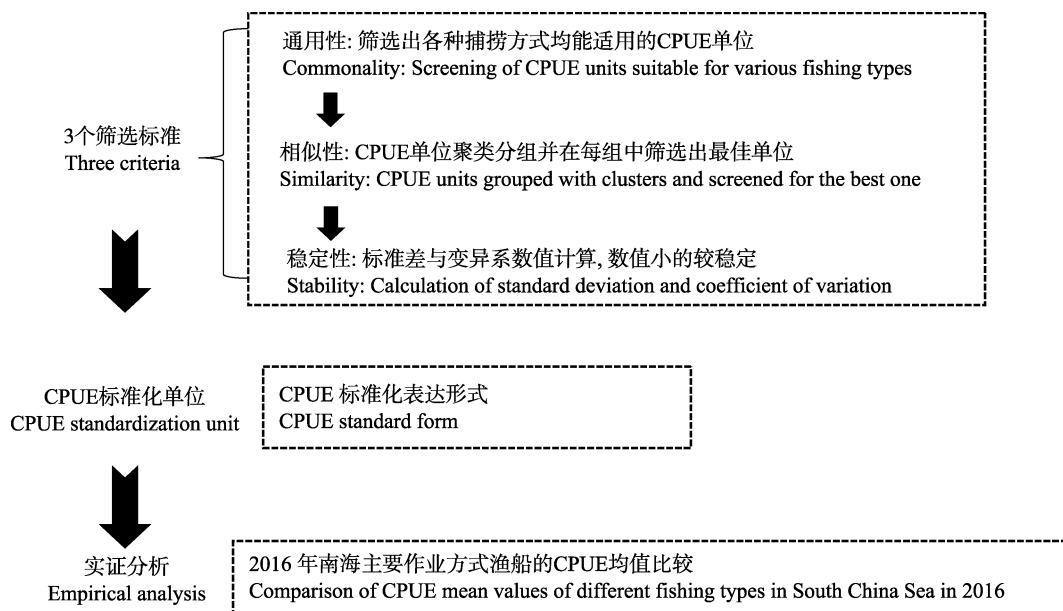


图 1 CPUE 标准化流程

Fig.1 CPUE standard process diagram

表3 不具通用性的 CPUE 单位
Tab.3 Special CPUE units

编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	原因 Reason
1	t/net	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
2	t/(h·kn)	罩网、钓渔船等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and falling-net
3	t/(d·net)	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
4	ctn/net	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
5	n/(l·h)	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
6	t/1000hook	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
7	n/1000hook	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
8	n/l	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
9	n/100hook	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
10	kg/hook	仅适用于钓具 Only apply to fishing tackle
11	kg/net	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
12	kg/(kW·net)	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
13	g/net·h	钓具、笼壶等作业方式不适用 Cannot apply to fishing tackle and pot
14	g/(100 m ² ·h)	仅适用于刺网 Only apply to gillnet
15	n/(p·d)	仅适用于刺网 Only apply to gillnet
16	g/(p·d)	仅适用于刺网 Only apply to gillnet

表4 通用的 CPUE 单位
Tab.4 Common CPUE units

编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	编号 No.	CPUE 单位 CPUE units	编号 No.	CPUE 单位 CPUE units
1	t/h	4	t/kW	7	kg/(kW·d)
2	kg/d	5	g/h	8	t/d
3	kg/h	6	kg/kW		

表5 CPUE 单位相似性分组
Tab.5 CPUE units group by similarity

分组 Groups	CPUE 单位 CPUE units	分组依据 Basis for grouping
1	t/h、kg/h、g/h、t/d、kg/d	渔获量与时间的比值 Ratio of catch to time
2	t/kW、kg/kW、kg/(kW·d)	渔获量与渔船功率、时间的比值 Ratio of catch to fishing power and time

第2组 CPUE 的3个单位表述的是渔获量与渔船功率和作业天数之间的关系。同样,吨(t)是质量的延伸单位,在生产调查中应选择 kg 作为产量单位。比较 kg/kW 与 kg/(kW·d): kg/kW 表示1个周期内渔船每 kW 的渔获量;kg/(kW·d)表示的是平均每天每千瓦渔船的渔获量。考虑到周期的不确定性,所以第二组 CPUE 的最佳单位表达式: kg/(kW·d)。

通过相似性筛选,CPUE 仅留下2个单位: kg/d 和 kg/(kW·d)。

2.1.3 稳定性筛选 依据 CPUE 这2个单位的统计方法,对2016年夏季南海区9种不同捕捞方式之间的 CPUE 统计,计算并比较各自统计上的变异系数值

(表6)。

通过比较发现,利用 CPUE 单位 kg/(kW·d)计算的变异系数值比单位 kg/d 计算出的结果小,莫苑敏等(2014)通过这2种方法分别估计2007年夏季北部湾底拖网渔业产量:通过单船平均产量估算总产量的变异系数为14.65%,而通过每 kW 平均产量估算总产量的变异系数仅为1.13%,这表明在对生产数据捕捞效率的统计方面,CPUE 单位 kg/(kW·d)比单位 kg/d 更稳定。所以,在统计的稳定性方面,CPUE 单位 kg/(kW·d)比单位 kg/d 计算的结果更稳定,且估计的总产值更准确。

通过稳定性筛选,CPUE 仅留下单位 kg/(kW·d)。

表 6 2016 年夏季不同捕捞方式的 CPUE 计算稳定性差异比较
Tab.6 Comparison of stability differences based on CPUE between different fishing types in summer 2016

作业方式 Fishing types	单位 Unit (kg/d)			单位 Unit [kg/(kW·d)]		
	平均值 AVG	标准差 SD	变异系数 CV	平均值 AVG	标准 SD	变异系数 CV
单拖 Otter trawl	784.11	2537.94	3.24	4.42	6.17	1.39
双拖 Pair trawl	3698.78	3053.69	0.83	11.48	9.02	0.79
刺网 Gillnet	510.66	554.59	1.09	3.84	2.77	0.72
围网 Seine	3103.60	2473.94	0.80	19.29	17.93	0.93
拖虾 Shrimp trawl	330.41	141.75	0.43	2.30	0.93	0.40
钓具 Fishing tackle	300.26	245.56	0.82	3.04	2.60	0.85
张网 Stow net	113.04	15.83	0.14	6.99	0.98	0.14
罩网 Falling-net	743.65	820.01	1.10	7.08	8.13	1.15
笼壶 Pot	44.25	31.97	0.72	4.42	3.17	0.72

2.2 CPUE 标准化表达式

经过 3 个筛选步骤, 最终确定 CPUE 标准化单位为: kg/(kW·d)。

此单位值的计算路径为: 某渔船以千克为单位的总产量除以获取产量的作业天数与渔船以千瓦为单位的主机功率乘积之商。所述总产量是指某捕捞渔船捕获的不以价值为取向的所有种类的总质量。所述作业天数是指某捕捞渔船扣除停港、航行、避风时间后以天为整数的捕获总产量的所有时间的总和, 包含航次内作业周期期间的间歇和故障处理时间。所述主机功率是指某捕捞渔船驱动航行动力的总功率。

2.3 实证分析

根据 2016 年春、夏、秋及冬 4 个季度南海区三省主要渔港的 9 种捕捞方式的生产调查数据, 结合 CPUE 标准化表达形式计算和比较不同作业方式 CPUE 的均值情况(图 2), 结果显示, 单拖、双拖、拖虾、罩网、刺网、钓具、笼壶、张网和围网对应的 CPUE 平均值依次为 3.95、8.77、3.11、4.81、4.96、2.35、3.08、4.73 和 29.57 kg/(kW·d), 根据 CPUE 均值的大小排序顺序为 CPUE_{围网}>CPUE_{双拖}>CPUE_{刺网}>CPUE_{罩网}>CPUE_{张网}>CPUE_{单拖}>CPUE_{拖虾}>CPUE_{笼壶}>CPUE_{钓具}。去掉最大值和最小值, 不同作业方式渔船

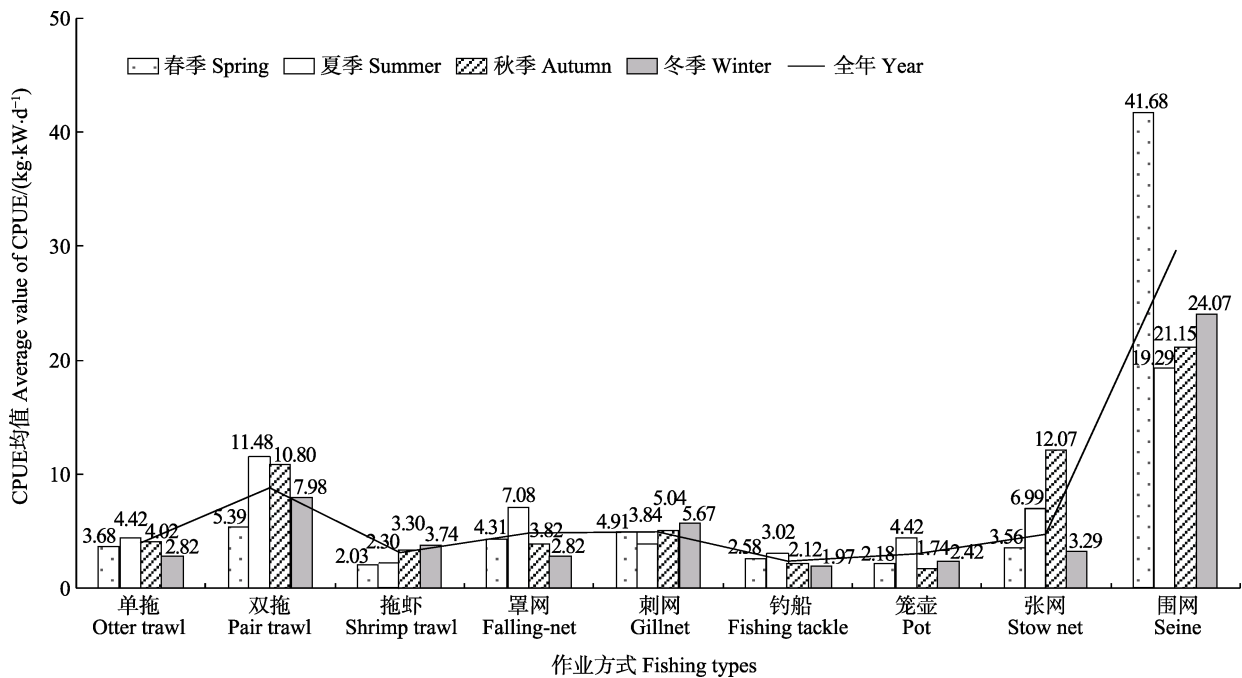


图 2 2016 年全年不同作业方式之间 CPUE 比较
Fig.2 Comparison of CPUE between different fishing types in 2016

的 CPUE 平均值为 $4.77 \text{ kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 。

3 讨论

3.1 CPUE 单位筛选与单位标准化合理性讨论

在 CPUE 的单位筛选环节, 首先通过通用性标准, 筛选出各种捕捞方式均能适用的 8 个 CPUE 单位; 再通过相似性标准分组筛选, 得到 2 组 CPUE 最佳单位, 分别为 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 和 kg/d ; 最后通过稳定标准, 将这 2 个单位, 通过一捕捞实例计算其标准差与变异系数值, 最终确定稳定性最好的 CPUE 单位为 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 。筛选的方法多样, 不仅限于本研究提出的这 3 种方法, 例如, 对 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 和 kg/d 单位筛选, 可以根据它们的技术表示效果(即技效性): kg/d 表示渔船每天的产量; 而 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 表示渔船每千瓦天的产量, 即表示某种渔具在一定时间与资本的投入下的产出情况。假设 2 艘不同功率的渔船的作业海域、作业时间和渔获量都相同, 通过 kg/d 与 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 分别计算 2 艘船的 CPUE 值大小, 会出现“相同”与“不相同”2 种相反的结果, 但二者真实捕捞能力是不一样的。所以, 从技效性筛选方面, 筛选出的结果与通用性筛选的结果是一致的。筛选的最终目的, 是在众多 CPUE 单位中筛选出一个对不同捕捞方式都适用、参数简单且在实际渔港调查中容易获取、并能体现其捕捞能力的最佳表达式。

本研究是将渔船功率和作业时间的乘积作为捕捞努力量单位表达形式, 一方面, 是因为渔具可能有详细数据, 但不及渔船的吨位和功率资料完善; 另一方面, 渔船的大小以及渔船的吨位与渔船的功率相关性较强, 且网具规模和尺寸的增大也需要主机功率随之增大, 渔船功率的大小一定程度上可以反映捕捞能力的大小; 莫苑敏等(2014)在研究中指出, 单船每 kW 估算产量可以平抑不同渔船之间由于渔况、天气、渔船性能和渔民技术熟练程度等造成的产量差异, 明显缩小各层内的样本方差。所以本研究将渔船功率与时间的乘积(即 $\text{kW}\cdot\text{d}$)作为捕捞努力量的单位表达形式, 并确定多钟渔业 CPUE 单位标准化表达形式为 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 。

单位标准化后的 CPUE 可以对不同作业类型的渔船捕捞效率进行量化, 可以对其进行大数据统计、分析与比较。在日常捕捞生产渔港调查中, 按照渔船功率段分层抽样的方法进行调研, 可以大大提高估计精度, 减少人力、成本等。CPUE 单位统一化后可以实现对不同捕捞方式之间统一、规范的调查统计工作, 从而可以进行不同渔业之间的比较分析, 认识与

了解渔船的捕捞努力量与渔获量之间存在的规律; 可以反映不同渔业 CPUE 在数值上的长期变动情况, 进而分析、研究该现象的变动趋势, 综合分析和评价不同渔业之间的关系; 可以比较相同时间、同样油耗情况下渔获量的情况, 反映不同捕捞方式之间的捕捞效率, 体现不同作业类型渔船的自动化程度、机械化水平及其科技的运用等。

3.2 实证分析 CPUE 随捕捞方式变化

CPUE 单位标准化后, 对 2016 年 4 个季度不同作业方式的均值比较: $\text{CPUE}_{\text{围网}} > \text{CPUE}_{\text{双拖}} > \text{CPUE}_{\text{刺网}} > \text{CPUE}_{\text{罩网}} > \text{CPUE}_{\text{张网}} > \text{CPUE}_{\text{单拖}} > \text{CPUE}_{\text{拖虾}} > \text{CPUE}_{\text{笼壶}} > \text{CPUE}_{\text{钓具}}$, 对应的 CPUE 平均值依次为 29.57、8.77、4.96、4.81、4.73、3.95、3.11、3.08 和 2.35 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$, 对此现象分析, 主要是由于不同作业方式具有不同的捕捞原理、作业特征和捕捞对象所致。围网渔船捕捞对象主要是集群性的中上层鱼类, 如鲈鱼、眼镜鱼、蓝圆鲀、竹筴鱼、沙丁鱼、鳀等, 具有生产规模大, 网次产量高的特点(刘维等, 2012), 因此, 围网的 CPUE 均值最高, 但其生产技术水平要求也高。双拖是渔获产量最高的捕捞方式, 需要 2 艘渔船共同操作, 渔船功率较大, 具有拖速快、作业范围广、产量高等特点, 双拖渔船的 CPUE 均值仅次于围网渔船。刺网具有渔具结构简单、操作方便、对渔船动力要求较低、作业范围广、选择性好等特点, 因此, 刺网的 CPUE 均值也相对较高。而钓具和笼壶 CPUE 均值最低的原因是, 钓具一钩一线, 笼壶依靠捕捞对象生活习性进行诱捕, 他们的选择性较强、渔获物相对较少。

邹建伟等(2016)在 2015 年北部湾北部沿岸伏季休渔效果评价中对桁杆拖网、灯光罩网、刺网、钓具、笼壶的捕捞努力量($\text{kW}\cdot\text{d}$)和捕捞产量(kg)等进行了统计, 基于此数据计算 CPUE 值依次为: 2.88、2.65、3.55、0.82、4.58 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$; 本研究中单拖、罩网、刺网、钓具、笼壶 CPUE 均值依次为 3.11、4.81、2.35、3.08、4.73 $\text{kg}/(\text{kW}\cdot\text{d})$ 。除钓具差异较大外, 其他作业类型的 CPUE 值近似, 分析钓具差异的原因可能是, 由于北部湾近岸经常受高强度捕捞(付奕奕, 2012), 导致钓具对北部湾近岸鱼类选择性比南海海域少。分析本研究中围网船 CPUE 均值异常高的原因, 捕捞努力量在功率方面仅考虑了渔船的主机功率, 忽略了作业集鱼灯的功率影响(南海区三省调查的围网渔船都是灯光作业渔船), 其作业方式有别于其他作业类型网具, 它是靠渔船灯光的诱集进行围捕, 若引入灯光功率作为捕捞努力量的一部分, 可以缩小与其他捕捞方式 CPUE 之间的差异。

通过实证分析表明, CPUE 标准化后具有统计功能, 对不同作业方式均适用, 且可以进行不同作业方式之间捕捞能力的初步比较。根据 CPUE 均值大小比较 9 种作业方式之间捕捞能力的大小依次为: 围网>双拖>刺网>罩网>张网>单拖>拖虾>笼壶>钓具。

4 展望

传统 CPUE 存在不确定性和计算单位不统一性, 以及解析与意义不完整等问题, 本研究中 CPUE 经单位标准化后弥补了传统 CPUE 的不足, 并具备了评估不同渔船之间的捕捞效率、初步衡量资源相对丰度指数、评估渔业资源利用水平和进行捕捞产量统计等功能。该标准化方法一定程度上达到预期的效果, 简化与规范了渔业生产调查中的统计参数, 但也存在明显的不足: CPUE 单位标准化后仅考虑了时间和渔船功率参数的影响, 忽略了渔船人数、船长、船龄、捕捞技术、先进的探鱼设备等其他影响 CPUE 的重要因素 (Salthaug *et al.*, 2001); CPUE 值还无法直接代表渔业资源的丰度状况, 需要结合捕捞海域的环境、年与月的效应、区域性等因素, 运用模型的思想, 去除相关因素的影响, 重构资源与 CPUE 之间的正比关系。因此, 在下一步的工作中, 将继续探寻 CPUE 标准化的创新方法, 逐渐完善对海洋捕捞的 CPUE 标准化过程, 选择更加合理的参数加入到标准化公式中来, 达到生产统计与科研探究双赢的效应。此外, 广东海洋大学渔业资源监测与评估中心已收集到最新的南海区渔船的生产数据, 利用 CPUE 来分析不同捕捞方式之间的生产与效率情况, 结合多种捕捞渔具和历史数据, 分析 CPUE 长期的波动趋势, 来综合分析南海渔业资源长期的变化情况和资源的丰度状态, 进而为政府提供基础性数据和政策性参考建议。

参 考 文 献

- Campbell RA. CPUE standardisation and the construction of indices of stock abundance in a spatially varying fishery using general linear models. *Fisheries Research*, 2004, 70(2-3): 209-227
- Chen F, Lei L, Mao ZH, *et al.* Fishery forecasting for chub mackerel (*Scomber japonicus*) in summer in the East China Sea based on water quality from remote sensing. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(3): 56-62 [陈峰, 雷林, 毛志华, 等. 基于遥感水质的夏季东海鲈鱼渔情预报研究. 广东海洋大学学报, 2011, 31(3): 56-62]
- Chen XJ, Qian WG, Tian SQ. Resource density and distributions of *Symlectoteuthis oualaniensis* in open seas of northern Arabian Sea. *Advances in Marine Science*, 2006, 24(3): 90-94 [陈新军, 钱卫国, 田思泉. 阿拉伯海北部公海海域鳶乌贼资源密度及其分布. 海洋科学进展, 2006, 24(3): 90-94]
- Chen XJ, Cao J, Liu BL, *et al.* Stock assessment and management of *Ommastrephes bartramii* by using a Bayesian Schaefer model in the Northwestern Pacific Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1572-1581 [陈新军, 曹杰, 刘必林, 等. 基于贝叶斯 Schaefer 模型的西北太平洋柔鱼资源评估与管理. 水产学报, 2011, 35(10): 1572-1581]
- Chen XD, Cui XS. Application study on relationship between bigeye tuna fishing grounds and environment in the eastern and central Pacific Ocean by satellite remote sensing. *Remote Sensing Information*, 2006(1): 25-28 [陈雪冬, 崔雪森. 卫星遥感在中东太平洋大眼金枪鱼渔场与环境关系的应用研究. 遥感信息, 2006(1): 25-28]
- 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]
- Dong TW. Preliminary evaluation of artificial reef around Rizhao Qiansan Island on the enhancement of fishery resources. Master is thesis of Ocean University of China, 2015 [董天威. 日照前三岛人工鱼礁渔业资源增殖效果初步评价. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Fang XY, Chen XJ, Ding Q. Optimization fishing ground prediction models of *Dosidicus gigas* in the high sea off Chile based on habitat suitability index. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(4): 67-73 [方学燕, 陈新军, 丁琪. 基于栖息地指数的智利外海茎柔鱼渔场预报模型优化. 广东海洋大学学报, 2014, 34(4): 67-73]
- Feng B, Xu YX, Lu HS. Fishing survey by light falling net and tuna longline in the waters of Nansha Islands. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(4): 54-58 [冯波, 许永雄, 卢伙胜. 南沙北部灯光罩网与金枪鱼延绳钓联合探捕. 广东海洋大学学报, 2012, 32(4): 54-58]
- Fu YY. Studies on food web structure and energy flows of offshore ecosystem, Guangxi. Is thesis of Xiamen University, 2012: 4-6 [付奕奕. 广西近海生态系统食物网结构及能量流动研究. 硕士研究生学位论文厦门大学, 2012: 4-6]
- Guan WJ, Chen XJ, Gao F, *et al.* Comparisons of regression tree and GLM performance in CPUE standardization. *Journal of Shanghai University*, 2014, 23(1): 123-130 [官文江, 陈新军, 高峰, 等. GLM 模型和回归树模型在 CPUE 标准化中的比较分析. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 123-130]
- Guan WJ, Tian SQ, Wang XF, *et al.* A review of methods and model selection for standardizing CPUE. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 852-862 [官文江, 田思泉, 王学昉, 等. CPUE 标准化方法与模型选择的回顾与展望. 中国水产科学, 2014, 21(4): 852-862]

- Hu KW, Zhu GP, Wang XF, *et al.* Spatio-temporal distribution of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) abundance and its relationship with sea surface temperature in Western and Central Pacific Ocean. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 417–422 [胡奎伟, 朱国平, 王学昉, 等. 中西太平洋鲣鱼丰度的时空分布及其与表温的关系. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 417–422]
- Hua CJ, Zhang H, Fan W. Spatial-temporal patterns of fishing grounds and resource of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*) in the Southeast Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(19): 5676–5681 [化成君, 张衡, 樊伟. 东南太平洋智利竹筴鱼资源和渔场的时空变化. *生态学报*, 2011, 31(19): 5676–5681]
- Li FK, Tanaka E, Iwata S, *et al.* Stock assessment of hairtail *Trichiurus lepturus* in the East China Sea and Yellow Sea using age structured production model. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2016, 35(2): 91–98 [李发凯, 田中荣次, 岩田繁英, 等. 应用年龄结构产量模型评估东黄海带鱼资源. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2016, 35(2): 91–98]
- Li XD, Shang SL, Lu ZB. Monthly variation of the catch ability of chub mackerel and round scad in the southern Taiwan Strait. *Journal of Marine Sciences*, 2008, 26(3): 18–24 [李雪丁, 商少凌, 卢振彬. 台湾海峡南部鲈鲷鱼类资源的时空分布. *海洋学研究*, 2008, 26(3): 18–24]
- Ling JZ, Li HY. Analysis on status of shrimp stocks of shrimp beam trawling at East China Sea region in 2007. *Modern Fisheries Information*, 2008, 23(2): 13–16 [凌建忠, 李惠玉. 2007 年东海区杆桁拖虾资源状况分析. *现代渔业信息*, 2008, 23(2): 13–16]
- Liu GM, Chen CR. Preliminary assessment on achievements of summer fishing moratorium in south China Sea. *Marine Fisheries*, 2000, 22(1): 5–7 [刘桂茂, 陈楚荣. 南海区首次伏季休渔成效的初步评估. *海洋渔业*, 2000, 22(1): 5–7]
- Liu W, Zhang YX, Chen JM, *et al.* Preliminary analysis of fish resources in the Nansha Islands waters survey using light-purse seiner in spring season. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(1): 105–109 [刘维, 张羽翔, 陈积明, 等. 南沙群岛春季灯光围网渔业资源调查初步分析. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(1): 105–109]
- Liu X, Zhang CL, Ren YP, *et al.* Spatiotemporal variation in the distribution and abundance of *Chaeturichthys stigmatias* in the Yellow River estuary and adjacent waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 791–798 [刘潇, 张崇良, 任一平, 等. 黄河口及邻近水域矛尾虾虎鱼资源丰度的时空分布. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 791–798]
- Liu ZL, Yan LP, Yuan XW, *et al.* Stock assessment of small yellow croaker in the East China Sea based on multi-source data. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1039–1049 [刘尊雷, 严利平, 袁兴伟, 等. 基于多源数据的东海小黄鱼资源评估与管理. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 1039–1049]
- Lu HJ, Chen XJ, Cao J. CPUE Standardization of *Illex argentinus* for Chinese Mainland squid-jigging fishery based on generalized linear Bayesian models. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(17): 5375–5384 [陆化杰, 陈新军, 曹杰. 基于 GLBM 模型的中国大陆阿根廷滑柔鱼鱿钓渔业 CPUE 标准化. *生态学报*, 2013, 33(17): 5375–5384]
- Mo YM, Gong C, Feng B, *et al.* Estimation of trawler catch in Beibu Gulf by stratified sampling. *Fishery Information and Strategy*, 2014, 29(3): 211–214 [莫苑敏, 龚超, 冯波, 等. 应用分层抽样技术估计北部湾底拖网渔业产量. *渔业信息与战略*, 2014, 29(3): 211–214]
- Niu MX, Li XS, Xu YC. Effects of spatiotemporal and environmental factors on the fishing ground of *Trachurus murphyi* in Southeast Pacific Ocean based on generalized additive model. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(4): 1049–1055 [牛明香, 李显森, 徐玉成. 基于广义可加模型的时空和环境因子对东南太平洋智利竹筴鱼渔场的影响. *应用生态学报*, 2010, 21(4): 1049–1055]
- Pang ZW, Li XS, Zhu JC, *et al.* Spatiotemporal patterns of central fishing ground of pelagic fishes in the sea area of central Eastern Central Atlantic. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(11): 3072–3079 [逢志伟, 李显森, 朱建成, 等. 中东大西洋中部海域中上层鱼类中心渔场的时空变化. *生态学杂志*, 2016, 35(11): 3072–3079]
- Qian WG, Chen XJ, Zheng B, *et al.* Study on the resource density distribution of *Dosidicus gigas* and marine environment in the high sea waters off Chile. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(1): 98–103 [钱卫国, 陈新军, 郑波, 等. 智利外海茎柔鱼资源密度分布与渔场环境的关系. *上海水产大学学报*, 2008, 17(1): 98–103]
- Robson DS. Estimation of the relative fishing power of individual ships. *ICNAF Research Bulletin*, 1961, 2: 5–14
- Salthaug A, Godø OR. Standardisation of commercial CPUE. *Fisheries Research*, 2001, 49(3): 271–281
- Smith TD. *Scaling fisheries: The science of measuring the effects of fishing, 1855–1955.* Oxford City: Cambridge University Press, 1994
- Song HT, Ding TM. The present state of shrimp trawling fishery and suggestions on building up no shrimp-trawling season in East China Sea. *Journal of Zhejiang College of Fisheries*, 1997, 16(4): 12–17 [宋海棠, 丁天明. 东海北部拖虾渔业的现状与设立拖虾休渔期的建议. *浙江水产学院学报*, 1997, 16(4): 12–17]
- Sun S, Li XS, Zhao WW, *et al.* Effects of temporal, spatial and environmental factors on distribution of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) in 2013 based on generalized additive model. *Fisheries Science*, 2015, 34(10): 609–615 [孙珊, 李显森, 赵文武, 等. 基于广义可加模型分析时空和环境因子对 2013 年南极磷虾资源分布的影响. *水产科学*, 2015, 34(10): 609–615]
- Ulman A, Pauly D. Making history count: The shifting baselines of Turkish fisheries. *Fisheries Research*. 2016, 183: 74–79
- Wang CJ, Zou LJ, Li G, *et al.* Analysis of the inter-annual variation of chub mackerel abundance in the East China Sea and Yellow Sea during 1999–2011. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 56–64 [王从军, 邹莉瑾, 李纲, 等.]

- 1999–2011 年东、黄海鲈资源丰度年间变化分析. 水产学报, 2014, 38(1): 56–64]
- Wang JQ, Xu LX, Zhu GP, *et al.* Analysis of temporal and spatial fluctuations on purse seine fishery in the Western and Central Pacific Ocean based on GIS technology. *Marine Fisheries*, 2005, 27(4): 292–297 [王家樵, 许柳雄, 朱国平, 等. 利用 GIS 分析中西太平洋金枪鱼围网渔场的时空变动. 海洋渔业, 2005, 27(4): 292–297]
- Wang JT, Gao F, Lei L, *et al.* Modeling of fishing grounds for *Dosidicus gigas* based on BP neural network in southeast Pacific. *Marine Fisheries*, 2014, 36(2): 131–137 [汪金涛, 高峰, 雷林, 等. 基于神经网络的东南太平洋茎柔鱼渔场预报模型的建立及解释. 海洋渔业, 2014, 36(2): 131–137]
- Wang S, Duan XB, Chen WJ, *et al.* Status and changes of fish resources in the Hukou area of Poyang Lake. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(6): 50–55 [王生, 段辛斌, 陈文静, 等. 鄱阳湖湖口鱼类资源现状调查. 淡水渔业, 2016, 46(6): 50–55]
- Xing BB, Guo R, Li XS, *et al.* Fishing capacity comparison of different types of gillnet in the Liaodong Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 24–30 [邢彬彬, 郭瑞, 李显森, 等. 辽东湾不同型刺网捕捞性能的比较. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 24–30]
- Xu LL, Chen XJ, Wang JT, *et al.* Stock assessment and management of *Dosidicus gigas* in the Southeast Pacific Ocean with Schaefer model. *Acta Oceanologica Sinica*, 2015, 37(10): 49–58 [许骆良, 陈新军, 汪金涛, 等. 基于 Schaefer 模型的东南太平洋茎柔鱼资源评估和管理. 海洋学报, 2015, 37(10): 49–58]
- Xu YW, Zhang K, Chen ZZ. Stock assessment for the albacore fishery in the Southern Atlantic Ocean base on CEDA and ASPIC programs. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 46–54 [许友伟, 张魁, 陈作志. 基于 CEDA 和 ASPIC 软件的南大西洋长鳍金枪鱼渔业资源评估研究. 海洋湖沼通报, 2015(3): 46–54]
- Yan M, Zhang H, Fan W, *et al.* Spatial-temporal CPUE profiles of the albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and their relations to marine environmental factors in the South Pacific Ocean. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(11): 3191–3197 [闫敏, 张衡, 樊伟, 等. 南太平洋长鳍金枪鱼渔场 CPUE 时空分布及其与关键海洋环境因子的关系. 生态学杂志, 2015, 34(11): 3191–3197]
- Yan YR, Feng B, Luo HS, *et al.* Analysis on fishing capability of two light attracting commercial fishing methods around Zhongsha and Xisha Islands sea areas, South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(6): 59–64 [颜云榕, 冯波, 卢伙胜. 中、西沙海域 2 种灯光作业渔船的捕捞特性及其技术效率分析. 南方水产, 2009, 5(6): 59–64]
- Yang BH, Zhou JW. Assessment on achievements of summer fishing moratorium in South China Sea in 2012—Based on the comparison of fishing production among trawling, seines, gill nets. *Chinese Fisheries*, 2013(2): 73–75 [杨伯华, 邹建伟. 2012 年南海伏季休渔效果评价——基于拖网、围网、刺网渔船生产对比. 中国水产, 2013(2): 73–75]
- Yuan XW, Yan LP, Liu ZL, *et al.* A performance comparison of stock density estimation of *Larimichthys polyactis* in the East China Sea using different models based on bottom trawl survey. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 20–26 [袁兴伟, 严利平, 刘尊雷, 等. 基于底拖网调查的东海区小黄鱼资源密度不同估算方法差异比较. 南方水产科学, 2014, 10(6): 20–26]
- Zhan BY. *Fisheries resources assessment*. Beijing: China Agricultural Press, 1995, 59–74 [詹秉义. 北京: 渔业资源评估. 中国农业出版社, 1995, 59–74]
- Zhang H, Fan W, Cui XS. Relationship of distribution of albacore *Thunnus alalunga* longline fishery grounds and sea surface temperature in the North Pacific Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(6): 1–6 [张衡, 樊伟, 崔雪森. 北太平洋长鳍金枪鱼延绳钓渔场分布及其与海水表层温度的关系. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 1–6]
- Zhang K, Chen ZZ. Using Bayesian state-space modelling to assess *Trichiurus japonicus* stock in the East China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1015–1026 [张魁, 陈作志. 应用贝叶斯状态空间建模对东海带鱼的资源评估. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1015–1026]
- Zhang K, Liu Q, Liao BC. Risk assessment and management for the Southern Atlantic Albacore (*Thunnus alalunga*) fishery based on bayes method. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2015, 45(6): 51–56 [张魁, 刘群, 廖宝超. 基于贝叶斯方法的南大西洋长鳍金枪鱼渔业的风险评估与管理. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(6): 51–56]
- Zhang P, Zhang J, Li Y, *et al.* An exploratory fishing survey of light falling-net fisheries in the central and southern South China Sea in autumn. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(2): 67–74 [张鹏, 张俊, 李渊, 等. 秋季南海中南部海域的一次灯光罩网探捕调查. 南方水产科学, 2016, 12(2): 67–74]
- Zhang YZ, Huang LM. A study on fish species diversity and community structure in eastern waters of Xiamen. *Journal of Tropical Oceanography*, 2009, 28(2): 66–76 [张雅芝, 黄良敏. 厦门东海域鱼类的群落结构及种类多样性研究. 热带海洋学报, 2009, 28(2): 66–76]
- Zhu GP, Wang R. Catch per unit effort of Antarctic krill (*Euphausia superba*) fishery and its suitability to abundance estimation. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1072–1079 [朱国平, 王芮. 南极磷虾渔业 CPUE 及其丰度估算适用性. 水产学报, 2016, 40(7): 1072–1079]
- Zhu GP, Zhu XY, Meng T, *et al.* The variation and impacting factors in CPUE index of Antarctic krill fishery around Livingston Island during fall–winter of 2012. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(4): 399–405 [朱国平, 朱小艳, 孟涛, 等. 2012 年秋冬季利文斯顿岛南极磷虾渔业 CPUE 指标变动及其影响因素. 大连海洋大学学报, 2013, 28(4): 399–405]
- Zhu JC, Li XS, Du SJ, *et al.* Studies on parameter optimization of *Scomberomorus niphonius* big-mesh drift gillnet. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 64–73 [朱建成, 李显森, 都松军, 等. 蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)大网目流刺网参数优化研究. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 64–73]

- Zhou YQ. Thoughts on conservation of fishery resources and ecological system related. Symposium on water Environment Rehabilitation, 2014 [周应祺. 渔业资源与生态系统养护的思考. 水域生态环境修复学术研讨会, 2014年10月23日]
- Zou JW, Wang QZ, Huang JX, *et al.* Assessment on achievements of summer fishing moratorium in the continental shelf of northern south China Sea, 2016. Fisheries Science and Technology Information, 2016, 43(6): 318–323 [邹建伟, 王强哲, 黄俊秀, 等. 南海北部大陆架渔场 2016 年伏季休渔效果评价. 水产科技情报, 2016, 43(6): 318–323]
- Zou JW, Huang JX, Wang QZ. Assessment on achievements of summer fishing moratorium in coastal fishing grounds in northern Beibu Gulf, 2015. Fishery Information and Strategy, 2016, 31(2): 132–138 [邹建伟, 黄俊秀, 王强哲. 北部湾北部沿岸渔场 2015 年伏季休渔效果评价. 渔业信息与战略, 2016, 31(2): 132–138]
- Zou JW, Wang QZ, Lin PW, *et al.* Assessment of impact of summer fishing moratorium on shrimp fishing in northern Beibu Gulf. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 88–93 [邹建伟, 王强哲, 林丕文, 等. 伏季休渔对北部湾北部虾类捕捞的影响及评价. 南方水产科学, 2015, 11(6): 88–93]

(编辑 江润林)

A Novel Approach to Unit Standardization of CPUE for Multiple Types of Fishing Gear Based on Fishing Port Sampling Surveys

TAO Yajin¹, FENG Bo^{1,2,3}, YI Murong¹, LI Bo¹, LU Huosheng^{1,2,3}, YAN Yunrong^{1,2,3,4①}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Center of South China Sea Fisheries Resources Monitoring and Assessment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 3. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center of Far Sea Fisheries Management and Fishing of South China Sea, Zhanjiang 524088; 4. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Marine Fisheries Information Technique of South China Sea, Shenzhen 518000)

Abstract Traditional CPUE (catch-per-unit-effort) units show diversity and complexity due to the different types of fishing methods, sizes of vessels, and characteristics of fisheries on which they are based, leading to problems with data incomparability among multiple fishing gear types. To assess the fish stocks in a specific areas of the sea, the impact of various different fishing types needs to be considered, but using traditional CPUE data makes it difficult to assess these stocks because of variations in the units used. We reviewed the relevant literature and screened out 24 types of CPUE units. The following processes were then carried out to standardize CPUE units across multiple fishing types. First, eight CPUE units appropriate for different fisheries were selected based on general criteria. Those CPUE units were then divided into two groups based on overall similarities and differences. The two main applicable CPUE units of kg/(kW·d) and kg/d were identified at this stage. Finally, the coefficient of variation (CV) of each of these two selected CPUE units was calculated. The smaller the value of the CV was, the more stable the unit was concluded to be. The optimum unit was determined to be kg/(kW·d) based on this stability criterion. The landings of nine major fishing types in the South China Sea in each of the four seasons of 2016 were then analyzed using this optimal CPUE unit. The results of this analysis showed that the fishing capacity of different gear types were arranged in the following order: Seine > Pair trawl > gillnet > falling-net > stow net > otter trawl > shrimp trawl > pot > fishing tackle, corresponding to mean values of 29.57, 8.77, 4.96, 4.81, 4.73, 3.95, 3.11, 3.08, and 2.35 kg/(kW·d), respectively. After catch data are standardized by the optimal novel CPUE unit developed in this study, comparisons and analyses of fishing capacity among gear types, relative abundance and utilization levels of different fisheries resources, and fisheries catch statistics could be conducted with greater accuracy than was previously possible.

Key words CPUE; Unit standardization unit.; kg/(kW·d); kg/d; Fishing ability

① Corresponding author: YAN Yunrong, E-mail: yanyr@gdou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420006

http://www.yykxjz.cn/

王崇, 王秀华, 刘爽, 桑松文, 张庆利. 鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒(CMNV)的初步研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 25-32

Wang C, Wang XH, Liu S, Sang SW, Zhang QL. Preliminary study on the natural infection of *Carassius auratus* with covert mortality nodavirus (CMNV). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 25-32

鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒 (CMNV)的初步研究*



王崇^{1,2} 王秀华^{1,2} 刘爽^{1,2} 桑松文^{1,2} 张庆利^{1,2①}

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾病毒性偷死病(Viral covert mortality disease, VCMD)是由偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)引起的一种新发疫病,近年来使中国对虾养殖业遭受了严重的经济损失。为筛查对虾池塘养殖系统中CMNV的自然宿主种类,本研究在山东潍坊一个发生VCMD的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场排水渠中采集了野生鲫鱼(*Carassius auratus*)样品,对其携带和感染CMNV的情况进行了系统分析。逆转录套式PCR检测结果显示,鲫鱼样品的总RNA能扩增出与预期大小一致的CMNV RNA依赖的RNA聚合酶目标基因片段。组织病理和原位杂交分析显示,鲫鱼脑部神经组织空泡化严重,脑皮层锥体细胞和二叠体颗粒细胞核固缩明显,心肌呈现典型的溶解样坏死病理变化,脑和心肌组织的病变部位均可见淡紫色CMNV探针杂交信号。透射电子显微镜观测显示,鲫鱼脑中可见神经组织空泡化,心肌组织坏死严重,CMNV样病毒颗粒占据了心肌细胞内大部分区域。本研究表明,CMNV在自然条件下能够跨越物种障碍、感染对虾养殖池塘排水渠中的野生鲫鱼,并导致靶组织明显的病理损伤,同时也提示,CMNV感染其他鱼类尤其是淡水鱼类的风险值得高度关注。

关键词 病毒性偷死病(VCMD); 偷死野田村病毒(CMNV); 自然感染; 宿主跳跃; 鲫鱼
中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0025-08

对虾偷死病(Covert mortality disease, CMD)是近年来严重危害中国对虾养殖业的一种新发疫病(章秋虎, 2004; 邢华, 2004; 徐志进等, 2009; Zhang *et al*, 2014)。2003年或更早的时候,海南、广西等地高密度池塘养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)

出现“偷死”现象,2008~2009年该病在中国南方多省市的养殖凡纳滨对虾中大规模暴发,2010年后开始传播到山东、河北和天津等地(Zhang *et al*, 2017)。发病对虾主要在池底深水区陆续死亡,不容易被观察到,因此,被称为“偷死病”或“死底症”(邢华, 2004;

*国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)、国家自然科学基金面上项目(31672695)和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(20603022015003)共同资助[This work was supported by the National R&D Program of China (2017YFC1404503), National Natural Science Foundation of China (31672695), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022015003)]. 王崇, E-mail: 1834142471@qq.com

① 通讯作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-05-02

徐志进等, 2009; Zhang *et al.*, 2014)。患病个体表现出肝胰腺颜色变浅、萎缩, 空肠空胃, 生长缓慢等症状, 很多时候还可见病虾腹节肌肉不透明或局部发白。患病对虾在水温较高(28℃以上)时, 死亡率升高, 累计死亡率可达 80%(Zhang *et al.*, 2014)。

Zhang 等(2014)研究证实, CMD 是由“偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)”引起的一种病毒性疾病。为了说明该疫病的病原学特征, CMD 又被称为病毒性偷死病(Viral covert mortality disease, VCMD)。CMNV 属于野田村病毒科 α 野田村病毒属(Nodaviridae, *Alphanodavirus*), 是一种单链 RNA 病毒, 病毒粒子为球形(二十面体), 无囊膜, 蔗糖密度梯度离心纯化的病毒粒子直径约为 32 nm。CMNV 主要感染养殖虾类, 目前尚未见有感染鱼类的报道。

对 2013~2015 年间在中国沿海 11 省市 145 个采样点收集的发病虾类样品开展的分子流行病学研究显示, 养殖凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中均可检测到 CMNV 阳性, 其中, 日本对虾的 CMNV 阳性检出率高达 60%, 中国明对虾和罗氏沼虾的检出率较低, 分别为 22%和 24%; 2013、2014 和 2015 年样品的 CMNV 阳性检出率分别为 45.9%、27.9%和 20.9%; 来自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西和海南的虾类样品均可检测到 CMNV 阳性, 其中, 以广东和海南的检出率最高, 达 52.6%和 50.8%, 而辽宁、天津等地的检出率最低, 为 10%和 9.9%; CMNV 的检出率基本呈现华南高于华东和华北的趋势(Zhang *et al.*, 2017)。2015 年, 本实验室在来自越南、厄瓜多尔和墨西哥的发病养殖对虾样品中检出 CMNV。2016 年, Thitamadee 等(2016)利用套式 RT-PCR 检测技术在泰国当地发病对虾中检测到 CMNV, 且检出率很高; Pooljun 等(2016)研究发现, 泰国南部养殖池塘凡纳滨对虾中疑似 VCMD 个体的 CMNV 阳性检出率分别为 30.4%和 37.7%。CMNV 在全球主要对虾养殖地区传播的风险已经引起广泛关注。

2017 年 8 月山东潍坊一个养殖场的凡纳滨对虾疑似 VCMD, 本实验室在该养殖场的池塘内采集了发病对虾和浮游动物样品, 同时也对养殖场排水渠中野生的鲫鱼(*Carassius auratus*)等样品进行了采集和固定保存。分子生物学分析结果显示, 患病对虾、养殖池塘共生生物和鲫鱼样品均呈现 CMNV 阳性。

本研究采用逆转录套式 PCR(RT-nPCR)、组织病理学、组织原位杂交和透射电子显微镜(TEM)技术, 分析了鲫鱼脑和心肌组织中 CMNV 的存在、感染情

况以及 CMNV 感染鲫鱼所导致的病理变化, 以期从不同角度确认该鲫鱼是否被 CMNV 所感染, 是否为 CMNV 的新宿主。

1 材料与方法

1.1 样品采集

鲫鱼样品采集于山东潍坊一养殖场的排水渠中, 体长为 8~10 cm, 取每尾个体的脑和心肌组织, 将组织样品切分为 1 式 3 份, 分别固定于 RNA Later 固定液(天根)、4%多聚甲醛固定液[配制方法参见 Chen 等(2014)]和戊二醛固定液[配制方法参见 Graham 等(2007)]中, 用于后续分子生物学、组织学和超微结构分析。保存在 4%多聚甲醛中的样品固定 24 h 后, 转移到 70%乙醇中贮存。

1.2 组织总 RNA 提取

将 30 mg 鲫鱼心肌及脑组织置于 500 μ l TRIzol 中, 用电动匀浆器将其快速破碎匀浆, 然后, 按照 RNA 快速提取试剂盒(百泰克)说明书, 提取组织样品的总 RNA, 最后, 用超微量分光光度计 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国)测定所制备 RNA 的浓度和纯度。

1.3 逆转录套式 PCR(RT-nPCR)检测

取 1 μ l (100 ng/ μ l)鲫鱼组织总 RNA, 加入 1 μ l 10 mmol/L 的 Noda-R1 引物[引物序列参见 Zhang 等(2014)]和 4 μ l 无 RNA 酶水后, 混匀, 70℃预变性 5 min, 冰浴 2 min, 然后, 依次加入 2 μ l 5 \times M-MLV 逆转录酶缓冲液、0.5 μ l dNTP (10 mmol/L)、0.25 μ l RNA 酶抑制剂(40 U/ μ l)、0.5 μ l M-MLV 逆转录酶(200 U/ μ l)和 0.75 μ l 无 RNA 酶水后, 混匀, 42℃逆转录 1 h, 70℃变性 5 min, 即获得 cDNA 模板。

按照 Zhang 等(2014)报道的方法进行 RT-nPCR 的第一轮扩增反应; RT-nPCR 的第二步 PCR 采用 TaKaRa Premix TaqTM (Ex TaqTM 2.0)进行, 25 μ l 反应体系: 12.5 μ l 预混合 Taq, 1 μ l 正向引物(Noda-F1: 5'-AAATACGGCGATGACG-3', 10 μ mol/L), 1 μ l 反向引物 (Noda-R2: 5'-GGCGGTGAGATGGATTTT-3', 10 μ mol/L), 1 μ l 第一步 RT-PCR 产物和 9.5 μ l ddH₂O。第二步 PCR 的反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s 和 72℃延伸 50 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min。通过第二步 PCR 扩增, 可得到 CMNV 中依赖 RNA 的 RNA 聚合酶基因(*RdRp*) (GenBank 登录号 KM112247)中长度为 207 bp 的扩增产物。RT-nPCR 检测过程中, 同时对阳性对照、阴性

对照 RNA 进行逆转录和第一轮及第二轮 PCR 扩增。

1.4 组织病理学分析

采用 Bell 等(1988)和 Lightner(1996)报道的方法, 对保存在 70%乙醇中的样品进行脱水、石蜡包埋等处理。每份样品制备 4 张厚度为 3 μm 的石蜡切片, 对第 1 张切片进行苏木精和伊红(HE)染色, 用于组织病理学观察(参考上述 Lightner 报道的方法), 第 2 张切片用于地高辛(DIG)标记的 RNA 探针进行 CMNV 组织原位杂交, 第 3、4 张切片用于随机探针和无探针的原位杂交作为阴性和空白对照。利用 Nikon Eclipse E80i 显微镜对组织切片进行观察和拍照。

1.5 组织原位杂交分析

根据 Zhang 等(2017)报道的方法, 利用带有限制性内切酶识别位点的引物对 *RdRp* 基因上一段长为 244 bp 的片段进行扩增, 将扩增所得目标片段克隆到 pBluescript II SK(+)载体中, 用限制性内切酶 *Pst* I 将重组后的载体线性化; 以线性化的载体为模板, 采用 T7 RNA 聚合酶转录出 DIG 标记的 RNA 探针。利用上述探针, 根据前人报道的方法(Nuovo *et al.*, 1999; Piette *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014)对切片进行原位杂交, 杂交后的切片进行核固红复染着色。利用 Nikon Eclipse E80i 显微镜观察原位杂交切片并拍照。

1.6 透射电子显微镜分析

将保存在戊二醛固定液中、对应编号呈原位杂交检测阳性的样品, 送青岛大学医院电镜中心进行固定、包埋、切片和染色, 操作流程参照 Graham 等(2007), 稍加修改后具体步骤包括: 1%锇酸(0.1 mol/L 甲次磷酸盐缓冲液配制, pH 值为 7.3)固定 3 h, 蒸馏水浸泡 10 min; 接着依次在 50%、70%和 90%乙醇中脱水 20 min, 在无水乙醇中脱水 4 次, 10 min/次; 先用 1:1 的树脂酒精包埋液处理 30 min, 再用 3:1 的树脂酒精包埋液处理 60 min, 然后用纯树脂包埋 3 d, 制备厚度为 0.5 μm 的超薄切片; 切片用醋酸铀和柠檬酸铅进行染色, 用透射电子显微镜(Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd., 日本)观察、拍照。

2 实验结果

2.1 RT-nPCR 检测结果

RT-nPCR 扩增产物的电泳图片显示, 来自鲫鱼样品的 cDNA 经过二轮 PCR, 扩增获得了与预期的 207 bp 大小一致的目标基因片段(图 1), 并且和阳性

对照的扩增片段在相同位置。根据该结果初步判断鲫鱼样品中存在或感染了 CMNV。



图 1 鲫鱼样品的 CMNV 逆转录套式 PCR 第二轮扩增产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of the amplification products from the second step of CMNV RT-nPCR test for the sample of *C. auratus* naturally infected with CMNV

M: Marker DL2000; P: 阳性对照;

1 和 2: 鲫鱼样品; C: 阴性对照

M: Marker DL2000; P: Positive control; 1 and 2: Samples of *C. auratus*; C: Negative control

2.2 鲫鱼组织病理变化及组织原位杂交

鲫鱼脑神经组织病理图显示, 鲫鱼脑组织二叠体内颗粒细胞层中可见明显的神经组织空泡化, 二叠体内颗粒细胞排列混乱、无序, 细胞核固缩明显(图 2a 和图 2b)。组织原位杂交图(图 2c 和图 2d)显示, 鲫鱼脑组织颗粒细胞层中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 2e 和图 2f)。

鲫鱼脑皮层组织病理图显示, 鲫鱼脑皮层组织空泡化严重, 组成神经元的锥体细胞呈现明显空泡化, 较高比例的细胞核出现固缩变形(图 3a 和图 3b)。该样品的组织原位杂交图显示(图 3c 和图 3d), 呈现坏死部位的神经元周围存在明显浅紫色的 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 3e 和图 3f)。

鲫鱼心肌组织病理图显示, 心肌组织中肌纤维呈现溶解样坏死, 肌细胞空泡化明显, 间隙可见血细胞浸润, 肌细胞的细胞核固缩明显(图 4a 和图 4b)。组织原位杂交图(图 4c 和图 4d)显示, 心肌组织坏死部位出现浅紫色的 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 4e 和图 4f)。

2.3 鲫鱼组织超微结构病理变化

鲫鱼脑组织超薄切片透射电镜分析结果显示, 脑组织空泡化病变严重, 神经组织坏死明显, 有髓神经

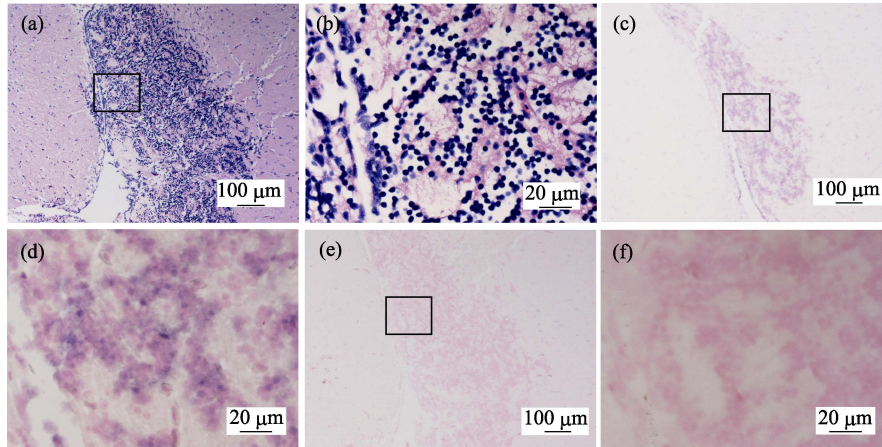


图 2 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑神经组织病理和原位杂交图

Fig.2 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for brain nerve tissue of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑组织病理学 HE 染色图; (b): (a) 中黑框内区域的放大图, 可见明显的神经组织空泡化和颗粒细胞核固缩; (c): 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑的组织原位杂交图; (d): (c) 中黑框内区域的放大图, 颗粒细胞中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号; (e): 无 CMNV RNA 探针的脑组织原位杂交图; (f): (e) 中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for brain of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of nerve and karyopyknosis of the granular cells; (c): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c), visible intense hybridization signal at the granular cells; (e): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

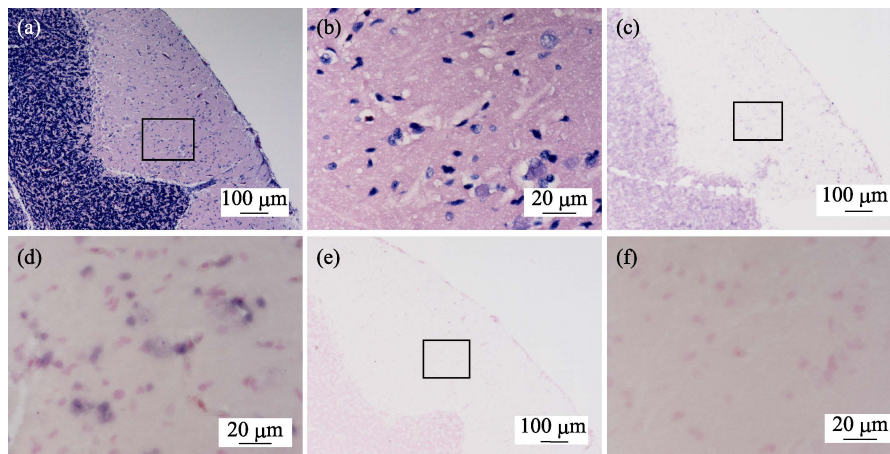


图 3 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑皮层组织病理和原位杂交图

Fig.3 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for brain cortical tissue of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 鲫鱼脑组织病理学 HE 染色图; (b): (a) 中黑框内区域的放大图, 可见组成脑皮层的锥体细胞的空泡化和细胞核固缩; (c): 自然感染 CMNV 鲫鱼脑的组织原位杂交图; (d): (c) 中黑框内区域的放大图, 坏死的锥体细胞中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号; (e): 无 CMNV RNA 探针的自然感染 CMNV 鲫鱼的脑组织原位杂交图; (f): (e) 中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for brain of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of pyramidal cells and karyopyknosis of pyramidal cells in cortical tissue;

(c): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c), visible intense CMNV probe hybridization signal at the necrotic neuron; (e): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

纤维出现脱髓鞘现象, 细胞核固缩变形明显, 但镜下未见明显的 CMNV 样病毒颗粒, 也未观测到其他已知病原体(图 5a 和图 5b)。

鲫鱼心肌组织超薄切片透射电镜分析结果显示, 心肌组织坏死严重, 肌细胞中大面积区域被 CMNV 样病毒颗粒所占据(图 6a 和图 6b); 高放大倍数下可

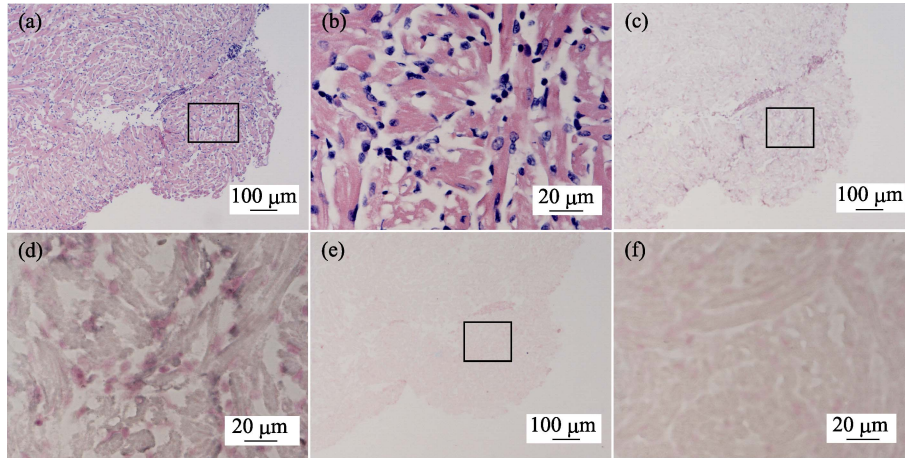


图 4 自然感染 CMNV 的鲫鱼心肌组织病理和组织原位杂交图

Fig.4 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for cardiac muscle of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 鲫鱼心肌组织病理学 HE 染色图; (b): (a)中黑框内区域的放大图; (c): 自然感染 CMNV 鲫鱼心肌组织原位杂交图; (d): (c)中黑框内区域的放大图; (e): 无 CMNV RNA 探针的自然感染 CMNV 鲫鱼的心肌组织原位杂交图; (f): (e)中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for cardiac muscle of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible dissolved myoneme of myocyte; (c): Micrographs of ISH for cardiac muscle of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c); (e): Micrographs of ISH for cardiac muscle of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

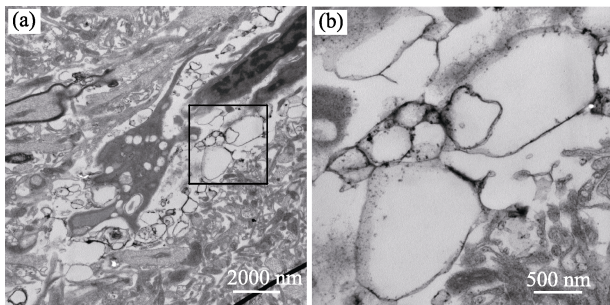


图 5 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑组织超薄切片的透射电镜图

Fig.5 Micrographs of ultrathin section for brain of *C. auratus* visualized by transmission electron microscopy (TEM)

(a): 鲫鱼脑组织的超薄电镜图; (b): (a)中黑框内区域的放大图, 可见脑组织中神经空泡化明显

(a): TEM micrographs for the brain; (b): Showed the magnified zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of nerve

见心肌细胞内大量清晰的、直径约为 30 nm 的 CMNV 样病毒颗粒(图 6c)。

3 讨论

研究发现, CMNV 的宿主范围广泛, 该病毒除了感染中国主要养殖甲壳类如凡纳滨对虾、中国明对虾、日本对虾、斑节对虾和罗氏沼虾外, 还可以感染对虾养殖池塘中的桡足类(*Parathemisto gaudichaud*)、

螺赢蜚(*Corophium sinense* Zhang)、寄居蟹(*Diogenes edwardsii*)和细长脚虫戎(*Parathemisto gaudichaldi*)等种类(Zhang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018)。CMNV 可侵染多种甲壳类的肝胰腺和肌肉组织, 在肝胰腺小管和淋巴器官上皮细胞和肌肉细胞内形成嗜酸性的包涵体, 导致肝胰腺小管萎缩及肌肉纤维溶解样、凝固状坏死(Zhang *et al.*, 2014、2017)。Liu 等(2017)通过人工感染实验证明, CMNV 可通过脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)亲体的雄性生殖细胞或雌性生殖细胞传递至子代, 实现从亲代到子代的垂直传播。

为了筛查 CMNV 可感染的水生动物种类, 本研究对山东潍坊一发生 VCMD 对虾养殖场排水渠中野生的鲫鱼进行了采样和分析, 鲫鱼心肌组织的分子生物学检测呈 CMNV 阳性, 初步判断鲫鱼可携带或感染 CMNV。进一步的组织病理学和组织原位杂交分析结果显示, 鲫鱼样品脑组织出现了较为严重的病理变化, 包括脑皮层和二叠体内神经组织空泡化、组织排列疏松, 脑皮层锥体细胞和二叠体颗粒细胞层细胞核明显固缩等, 说明 CMNV 在自然条件下感染鲫鱼能够导致其脑组织发生明显病变。对鲫鱼样品心肌组织的超微结构分析结果显示, CMNV 可侵染鲫鱼的心脏, 导致心肌组织大面积坏死; CMNV 颗粒占据了心肌细胞内大部分区域, 部分肌肉纤维溶解并为 CMNV 颗粒所取代。上述研究结果证实, CMNV 在自然条件下可感染野生鲫鱼, 并导致其脑和心肌发生明显的病理损伤。

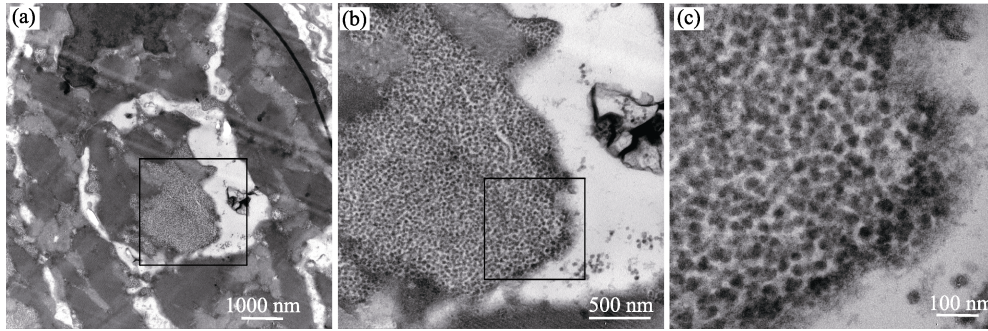


图6 自然感染 CMNV 的鲫鱼心脏组织超薄切片的透射电镜图

Fig.6 Micrographs of ultrathin section for heart of *C. auratus* visualized under transmission electron microscopic (TEM)

(a)~(c): 心脏肌肉组织的超薄电镜图; (b)和(c): 分别为(a)和(b)图中黑框内放大区域, 可见心肌组织中大量散在的 CMNV 样病毒颗粒

(a)~(c) TEM micrographs for the cardiac muscle of the heart: (b) and (c): Showed the magnified zone in the black frame in (a), visible scattering CMNV-like particles in necrotic myocardial cell

由于 CMNV 在分类上归为 α 野田村病毒属, 其与 β 野田村病毒属相关病毒的感染特征可能类似。为了排除上述鲫鱼样品中 β 野田村病毒共感染的可能性, 本研究采用由世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)推荐的、针对 β 野田村病毒的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法, 检测了鲫鱼脑组织的 RNA, 结果显示, 在本研究中鲫鱼样品中没有 β 野田村病毒属已知株系的阳性检出(结果未展示), 从而证实本研究鲫鱼样品中不存在 β 野田村病毒的感染。

通常来讲, 病毒具有强烈的宿主专一性和严格的物种屏障(Wang *et al*, 2004; Kuiken *et al*, 2006; Tang *et al*, 2006)。 α 野田村病毒属内除了野田村病毒(Nodamura virus, NoV)和兽棚病毒(Flock house virus, FHV)外, 多数病毒的宿主范围似乎都仅限于各种昆虫(Selling *et al*, 1990; Stock *et al*, 2009)。作为野田村病毒科的代表种, NoV 病毒的宿主范围较为独特, 除了能够感染昆虫外, 还对哺乳动物宿主具有致病性(Bailey *et al*, 1973、1975)。研究证实, NoV 能够感染猪, 可以被蚊子传播, 会对乳鼠(*Mus musculus*)和仓鼠(*Mesocricetus auratus*)产生致死性(Ball *et al*, 1999; King *et al*, 2011)。FHV 分离自褐新西兰肋翅鳃角金龟(*Costelytra zealandica*) (Scotti *et al*, 1983), 但能够在植物中复制产生感染性病毒粒子(Selling *et al*, 1990)。上述研究均表明, NoV 和 FHV 具有跨宿主传播的能力。相比之下, β 野田村病毒属的宿主范围仅限于不同种的鱼类(Scotti *et al*, 1983; Furusawa *et al*, 2007; Bigarré *et al*, 2009; Souto *et al*, 2015)。迄今为止, 尚未见报道表明 α 野田村病毒具有感染鱼类的能力。前期研究发现, 发生 VCMD 的凡纳滨对虾养殖池塘中, CMNV 除了感染养殖对虾外, 也可感染池塘中共生的鲮虾虎

鱼(*Mugilogobius abei*)(另文发表), 结合本研究所揭示的 CMNV 能够感染野生鲫鱼, 可以发现, CMNV 作为一种虾类新发疫病病毒性病原, 能跨越物种障碍在自然条件下感染鱼类, 实现跨宿主传播。

池塘养殖系统, 除了养殖池塘本身外, 还包括排水渠、废水处理池等设施, 池塘中养殖对虾发病后, 养殖水体会经排水渠向外排放或排入废水处理池中。由于目前中国大部分对虾养殖地区对养殖废水外排管理不严格, 多数养殖场一般将养殖废水就近直接外排至沟渠或近海中, 造成养殖池塘中病原向外扩散的风险。本研究中的养殖场养殖用水来源为近岸河口, 从发病对虾养殖池塘外排水渠的鲫鱼样品中检测到 CMNV 感染, 证实该养殖场暴发 VCMD 疫情后, 其池塘中 CMNV 可能会经排水设施向外传播扩散。同时, CMNV 可在自然状态下感染淡水鱼类——鲫鱼这一事实, 一方面为 CMNV 跨越宿主界限感染鱼类提供了更多证据, 另一方考虑到鲫鱼是淡水或半咸水鱼类, 加之 CMNV 可感染半咸水养殖的罗氏沼虾, CMNV 感染其他鱼类尤其是淡水养殖动物种类的风险值得高度关注。

鲫鱼是一种淡水鱼类, 分类上归属于辐鳍鱼纲、鲤形目、鲤科鲫属, 主要分布于欧亚地区的淡水水域中, 部分沿海近岸的淡咸水中也有少量分布。中国境内, 鲫鱼分布广泛, 各地水域常年均有生产, 是中国一种重要的经济鱼类(谢忠明, 1999; 郁桐炳等, 2004)。本研究证实, CMNV 能够在自然条件下感染鲫鱼导致其脑和心肌组织产生明显病理变化, 说明 CMNV 对鲫鱼具有一定的致病性, 因此, CMNV 危害养殖鲫鱼的风险不容忽视。但对于 CMNV 感染鲫鱼的致死率、主要靶组织等问题, 尚需深入研究。

参 考 文 献

- Bailey L, Newman JFE, Porterfield JS. The multiplication of Nodamura virus in insect and mammalian cell cultures. *Journal of General Virology*, 1975, 26: 15–20
- Bailey L, Scott HA. The pathogenicity of Nodamura virus for insects. *Nature*, 1973, 241(5391): 545
- Ball LA, Johnson KL. Reverse genetics of nodaviruses. *Advances in Virus Research*, 1999, 53: 229–244
- Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1988
- Bigarré L, Cabon J, Baud M, *et al.* Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(8): 667–673
- 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
- Furusawa R, Okinaka Y, Uematsu K, *et al.* Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77(2): 119–125
- Graham L, Orenstein JM. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nature Protocols*, 2007, 2(10): 2439–2450
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, *et al.* Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2011
- Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, *et al.* Host species barriers to influenza virus infections. *Science*, 2006, 312(5772): 394–397
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996
- Liu S, Li JT, Tian Y, *et al.* Experimental vertical transmission of covert mortality nodavirus in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of General Virology*, 2017, 98(4): 652–661
- Liu S, Wang XH, Xu TT, *et al.* Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 29–36
- Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, *et al.* *In situ* detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12754–12759
- Piette D, Hendrickx M, Willems E, *et al.* An optimized procedure for whole-mount *in situ* hybridization on mouse embryos and embryoid bodies. *Nature Protocols*, 2008, 3(7): 1194–1201
- Pooljun C, Direkbusarakom S, Chotipuntu P, *et al.* Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for detection of covert mortality nodavirus (CMNV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 2016, 464(1): 445–450
- Scotti PD, Dearing S, Mossop DW. Flock house virus: A nodavirus isolated from *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeida). *Archives of Virology*, 1983, 75(3): 181–189
- Selling BH, Allison RF, Kaesberg P. Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(1): 434–438
- Souto S, Lopez-Jimena B, Alonso MC, *et al.* Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(1–2): 53–61
- Stock SP, Vandenburg J, Glazer I, *et al.* Insect pathogens: Molecular approaches and techniques. Cambridge, MA: CAB International, 2009
- Tang Q, Maul GG. Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins. *Journal of Virology*, 2006, 80(15): 7510–7521
- Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 2016, 452: 69–87
- Wang F, Ma Y, Barrett JW, *et al.* Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nature Immunology*, 2004, 5(12): 1266–1274
- Xie ZM. High quality crucian carp breeding technology. Beijing: China Agriculture Press, 1999 [谢忠明. 优质鲫鱼养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 1999]
- Xing H. Discussion of the control measures for the “bottom death” (covert mortality disease) of Pacific white shrimp. *China Fisheries*, 2004(4): 88–89 [邢华. 南美白对虾“死底症”(偷死病)的控制措施探讨. *中国水产*, 2004(4): 88–89]
- Xu ZJ, Ji F. Comprehensive control of the covert mortality disease of Pacific white shrimp. *Fishery Guide to be Rich*, 2009(1): 60–61 [徐志进, 纪富. 南美白对虾偷死病的综合防治. *渔业致富指南*, 2009(1): 60–61]
- Yu TB, Ge XP. Cultivation of high quality crucian carp. Beijing: China Agriculture Press, 2004 [郁桐炳, 戈贤平. 巧养名优鲫鱼. 北京: 中国农业出版社, 2004]
- Zhang QH. To be cautious of “bottom death” in the intensive farming of Pacific white shrimp. *Inland Aquatic Product*, 2004, 29(10): 48–49 [章秋虎. 南美白对虾高密度养殖谨防“死底症”发生. *内陆水产*, 2004, 29(10): 48–49]
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 2014, 95(12): 2700–2709
- Zhang QL, Xu TT, Wan XY, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Research*, 2017, 233(2): 113–119

Preliminary Study on the Natural Infection of *Carassius auratus* with Covert Mortality Nodavirus (CMNV)

WANG Chong^{1,2}, WANG Xiuhua^{1,2}, LIU Shuang^{1,2}, SANG Songwen^{1,2}, ZHANG Qingli^{1,2①}

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

Abstract Viral covert mortality disease (VCMD) is an emerging disease caused by covert mortality nodavirus (CMNV). VCMD recently resulted in severe economic losses in China due to shrimp aquaculture infections. To identify the natural hosts of CMNV in the pond culture system, samples of *Carassius auratus* were collected for testing purposes from the drainage channel of a shrimp farm affected by VCMD. The results of CMNV reverse transcription nested PCR showed that the RNA of *C. auratus* sample could be amplified and produced the expected target gene fragment. Histopathological analysis showed that CMNV infection in *C. auratus* caused brain nervous tissue vacuolation. Obvious karyopyknosis occurred in the corpora bigemina granular cells and cortical pyramidal cells. *In situ* hybridization analysis showed CMNV positive signals in regions of the brain and cardiac muscle with pathological damage. Transmission electron microscopy analysis verified the brain nervous tissue vacuolation and the presence of CMNV particles in the cardiac muscle. The results of the present study indicate that CMNV can cross the species barrier to infect fish and cause pathological damage in the target tissues. Our findings emphasize the need for paying close attention to the high risk of CMNV infections in other fish species, especially freshwater fishes.

Key words Viral covert mortality disease (VCMD); Covert mortality nodavirus (CMNV); Natural infection; Host jump; *Carassius auratus*

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180126002

http://www.yykxjz.cn/

马冬梅, 黄樟翰, 朱华平, 谢骏. 广东粤北地区禾花鱼的形态特征及遗传学分析. 渔业科学进展, 2018, 40(2): 33–42
Ma DM, Huang ZH, Zhu HP, Xie J. Morphological characteristics and genetic analysis of the rice flower carp in the northern region of Guangdong Province. Progress in Fishery Sciences, 2018, 40(2): 33–42

广东粤北地区禾花鱼的形态特征及遗传学分析*

马冬梅 黄樟翰 朱华平^① 谢 骏

(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 本研究从粤北地区具有代表性的养殖基地随机取禾花鱼 67 尾, 对其形态进行拍照测量和统计分析, 依据形态比例数据可将目前养殖的禾花鱼分为偏向修长型和偏向团圆型两类, 与目前已有报道的 6 种鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的形态学数据进行主成分分析。结果显示, 在以总体体型为特征的第 1 主成分中, 长体型禾花鱼与兴国红鲤(*C. carpio* var. *Xingguonensis*)、镜鲤(*C. carpio* var. *specularis*)和建鲤(*C. carpio* var. *Jian*)聚在一起, 而与和瓯江彩鲤(*C. carpio* var. *color*)、荷包红鲤(*C. carpio* var. *wuyuannensis*)聚在一起的团圆体型禾花鱼区分开; 在以头部形态为特征的第 2 主成分中, 长体型禾花鱼与团圆体型禾花鱼聚在一起, 而与镜鲤和瓯江彩鲤区分开。形态学聚类分析结果显示, 长体型禾花鱼与兴国红鲤、镜鲤、黄河鲤和建鲤聚合为一支, 荷包红鲤与瓯江彩鲤聚为另一支, 而团圆体型的禾花鱼介于两支之间。CO II 基因测序及聚类分析结果表明, 禾花鱼为鲤属鲤种的一个群体, 2 种体型禾花鱼的 CO II 多态位点比例仅为 0.33%。以上研究结果可为禾花鱼的下一步选育提供参考资料。

关键词 禾花鱼; 鲤; 形态特征; CO II 基因; 聚类分析

中图分类号 S962.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0033-10

禾花鱼泛指在华南地区稻田养殖的温水性鲤鱼(*Cyprinus carpio*), 因为鱼食禾花后, 鱼肉具有禾花香味而得名。稻田养殖鲤鱼这种稻鱼共生的农业生产模式在我国具有悠久的历史和文化传承, 稻渔产业化水产养殖是具有稳粮、促渔、增收、提质、环境友好、发展可持续等多种生态系统功能的稻、渔结合的种养模式(马达文等, 2016; Xie *et al.*, 2011)。稻田养鱼模式在保护环境和保证水稻增产的同时, 增加了水产养殖的产量, 是目前水产养殖的研究热点之一(Hu *et al.*, 2013)。广东地区的禾花鱼养殖业已成为发展农村经济的一条重要途径, 但对目前广东地区禾花鱼的形态学研究和种质调查才刚刚起步。根据广东省乳源

瑶族自治县养殖户反映, 当地的禾花鱼养殖品种形态变异大, 品种混杂, 其中的‘石鲤’体型为典型的团圆体型, 而‘柴鲤’为典型的长体型。分析其原因, 一方面可能是经过长期的养殖驯化过程, 不同地区的鲤鱼因受到不同的自然环境的选择和人工选择, 在遗传和形态上已发生了不同方向的分化(Xu *et al.*, 2014)。另一方面, 可能是因为不同鲤鱼种内(刘淑琴等, 1990)和种间(谢洪民, 1985)的杂交, 导致鲤鱼养殖品种非常混杂, 形态各异。

在自然界中, 生物体的形态特征是生物体的遗传结构与生活环境长期相互作用的结果, 是物种多样性最直观的表现形式(Endler, 1986; 顾志敏等, 2008)。

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZC04)和国家自然科学基金项目(31001107)共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZC04), and the National Natural Science Foundation of China (31001107)]. 马冬梅, E-mail: mdm@prfri.ac.cn

^① 通讯作者: 朱华平, 研究员, E-mail: zhhp2000@163.com

收稿日期: 2018-01-26, 收修改稿日期: 2018-03-01

而在农业生产中的生物种群会在自然环境和人工选择压力下形成明显不同于自然生态系统的种群或者类群(Hall, 2004; Clutton-Brock, 1999)。无论是在自然生态系统中, 还是农业生产系统中, 鱼类形态特征的变化与生理机能和生活习性的变化相比, 更为具体、易于比较观察, 是鱼类分类学的重要依据(曹文宣等, 1981)。鱼类形态特征中的可数可量性状不仅是鱼类分类的依据, 也是鱼类人工选择育种时的基本选择指标, 即优良品种选择时的重要依据(闫学春等, 2007)。所以, 对鱼类形态学的研究是经济鱼类研究的基础。

以世代生活在广东地区的稻鱼养殖系统中的禾花鱼为研究对象, 将传统的形态学研究方法与几何形态学研究方法相结合, 分析具有代表性的稻田养殖禾花鱼的形态学特征, 并与其他鲤鱼品系的形态学分析数据进行比较。同时, 通过对禾花鱼线粒体 COII 基因序列的扩增与分析, 确定广东粤北地区稻田养殖禾花鱼在遗传学上的分类地位。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用禾花鱼取自广东省韶关乳源瑶族自治县的稻田养鱼基地, 为当年的禾花鱼鱼苗, 在鱼苗长至平均全长约为 5 cm 时放入稻田中进行养殖, 养殖期为 5 个月, 期间不投喂人工配合饲料, 仅以稻田中的杂草、田螺和昆虫等天然饵料为食。

1.2 形态观察与测量

从稻田里随机取 67 尾体重在 10 g 以上的禾花鱼, 用麻醉剂麻醉后, 快速测量体宽 W_B (Body width), 并用相机拍照, 将照片导入本研究室自主研制开发的鱼类外部形态测量软件 1.0, 测量每尾鱼的全长 L_T (Total length)、体长 L_S (Soma length)、体高 D_B (Body depth)、头长 L_H (Head length)、头高 H_H (Head height)、吻长 L_M (Snout length)、眼径 D_E (Eye diameter)、尾柄长 L_{CP} (Length of caudal peduncle)、尾柄高 D_{CP} (Depth of caudal peduncle) 和尾鳍长 L_C (Caudal fin length) 共 11 个生长性状。同时, 取鳍条放入无水乙醇中, -20°C 保存备用。

1.3 数量性状分析和统计

在对上述测量的生长性状进行统计时, 为消除由于鱼的体型大小不同而引起的对数据可靠性的影响, 分析时用头部形态测量值除以头长, 尾部形态测量值除以尾柄高, 分别计算头高/头长(H_H/L_H)、吻长/头长(L_M/L_H)、眼径/头长(D_E/L_H)、尾柄高/尾柄长(D_{CP}/L_{CP})、

尾鳍长/尾柄长(L_C/L_{CP}), 其他的形态测量值除以体长, 如全长/体长(L_T/L_S)、头长/体长(L_H/L_S)、体高/体长(D_B/L_S)、体宽/体长(W_B/L_S)、尾柄长/体长(L_{CP}/L_S)。

采用 Microsoft Excel 软件分析禾花鱼的形态测量数据及其比值, 然后使用 SPSS 11.0 对 10 个比值进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、主成分分析和聚类判别分析(张文彤, 2002)。

1.4 禾花鱼与其他 6 种鲤鱼形态学比较分析

按照郭梁等(2017)的方法从 CNKI 数据库(<http://www.cnki.net>)中查找鲤属(*Cyprinus*)鱼类的生长性状测量值, 用取平均值的方法将不同文献所报道的同种鱼的相同部位形态测量数据进行合并, 去掉测量部位数据少的品种, 得到黄河鲤(*Cyprinus carpio*)、荷包红鲤(*C. carpio* var. *wuyuannensis*)、兴国红鲤(*C. carpio* var. *Xingguonensis*)、建鲤(*C. carpio* var. *Jian*)、镜鲤(*C. carpio* var. *specularis*)和瓯江彩鲤(*C. carpio* var. *color*) 6 种鲤鱼的 7 个生长形态性状比值: 全长/体长(L_T/L_S)、体高/体长(D_B/L_S)、体宽/体长(W_B/L_S)、尾柄高/尾柄长(D_{CP}/L_{CP})、头长/体长(L_H/L_S)、头高/头长(H_H/L_H)和眼径/头长(D_E/L_H)(表 1)。统计分析方法参照 1.3。

1.5 利用 COII 基因分析禾花鱼的进化地位

根据鲤的线粒体上的细胞色素氧化酶亚基 II (Cytochrome oxidase subunit II, COII) 基因序列(序列号: JN105352.1)设计引物, 引物序列为: COII F: 5'-TAATGGCACACCCAACGCAAC-3', COII R: 5'-AGCTTCCTAGCGAGGCGTCTT-3', 由金唯智生物科技有限公司合成(苏州)。禾花鱼鳍条基因组 DNA 的提取采用天根生化科技(北京)有限公司的“血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒”, 具体方法参考试剂盒说明书。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和纯度, -20°C 保存备用。PCR 扩增禾花鱼 COII 基因, PCR 产物在 ABI 3500 全自动测序仪上进行测序, 测序结果用 ClustalW 软件进行比较分析。统计 38 尾禾花鱼 COII 基因序列, 将数目最多的 TA 基因型 COII 基因序列与鲤科(Cyprinidae)鲤属鲤种的 5 个群体(建鲤 COII 基因序列未见报道), 如黄河鲤(KU050703.1)、兴国红鲤(KU146530.1)、镜鲤(KU146531.1)、荷包红鲤(KF856964.1)和瓯江彩鲤(KP993136.1)及鲤科鲤属的三角鲤(*Cyprinus multitaeniata*) (KU373073.1)和鲤科 *Danio* 属的斑马鱼(*Danio rerio*) (KM244705.1) COII 基因序列进行比对, 再用 Mega 7.0 软件, 采用最大似然法构建进化树, 并用 Bootstrap 法进行检验, 参数设置为 999 次。

表 1 6 种鲤鱼的 7 个形态性状比值平均值

Tab.1 The mean values of seven morphological characteristics from six common carp populations

鲤鱼群体 Population	全长/体长 L_T/L_S	体高/体长 D_B/L_S	体宽/体长 W_B/L_S	尾柄高/尾柄长 D_{CP}/L_{CP}	头长/体长 L_H/L_S	头高/头长 H_H/L_H	眼径/头长 D_E/L_H	参考文献 Reference
黄河鲤 <i>C. carpio</i>	1.206	0.29	0.163	0.694	0.271	0.798	0.192	明俊超等(2009); 刘晓敏等(2015); 郑水平等(1998)
荷包红鲤 <i>C. carpio</i> var. <i>wuyuannensis</i>	1.282	0.458	0.275	1.426	0.330	0.869	0.172	明俊超等(2009); 马仲波等(1981); 长江水产研究所(1976); 吕迅(1983); 刘筠等(1979); 张建森(1985a,b); 林明雪等(2015)
兴国红鲤 <i>C. carpio</i> var. <i>Xingguonensis</i>	1.266	0.35	0.213	0.788	0.279	0.824	0.198	明俊超等(2009); 林明雪等(2015); 陈道印等(2008); 郑远刚等(1981)
建鲤 <i>C. carpio</i> var. Jian	1.255	0.313	0.169	0.680	0.281	0.804	0.198	明俊超等(2009); 于春然等(1995)
镜鲤 <i>C. carpio</i> var. <i>specularis</i>	1.24	0.394	0.205	0.867	0.291	0.954	0.231	吕迅(1983); 郑远刚等(1981); 于春然等(1995); 刘明华等(1993); 李池陶等(2009、2016)
欧江彩鲤 <i>C. carpio</i> var. <i>color</i>	1.265	0.358	0.231	1.298	0.308	0.708	0.424	刘志国等(2003); 吕耀平等(2008); 朱丽艳等(2013)

2 结果与分析

2.1 稻田养殖禾花鱼的形态观察与数据测量

目前, 广东地区典型的稻田养殖禾花鱼体型从长而侧扁到困而体厚的均可见。鱼体颜色各异, 有些个体鱼体背部为青灰色, 有些个体鱼通体为金红色, 有些个体鱼体背部为浅灰色, 鳍为浅灰色略带红色或鳍为黄色桔黄至浅黄色。随机取 67 尾禾花鱼进行测量, 体重范围为 10~44 g, 变化范围较大。计算其测量数据的平均值及方差(表 2)。

2.2 稻田养殖禾花鱼形态的聚类分析

根据 67 尾禾花鱼的头高/头长(H_H/L_H)、吻长/头长(L_M/L_H)、眼径/头长(D_E/L_H)、尾柄高/尾柄长(D_{CP}/L_{CP})、尾鳍长/尾柄长(L_C/L_{CP})、全长/体长(L_T/L_S)、头长/体长(L_H/L_S)、体高/体长(D_B/L_S)、体宽/体长(W_B/L_S)和尾柄长/体长(L_{CP}/L_S)10 个形态学比例指标, 用 SPSS

11.0 软件进行聚类分析表明, 67 尾鲤鱼可以分为体型偏向修长型和偏向团圆型两大类。

2.3 稻田养殖禾花鱼形态的主成分分析

对同一稻田养殖环境的 67 尾禾花鱼的 10 个形态学比例指标进行主成分分析, 得到 3 个主成分, 累积贡献率为 73.5%, 基本可以反映综合指标所概括的信息, 每个比例性状在各主成分的载荷量见表 3。第 1 主成分中起最主要作用的是尾柄高/尾柄长和尾鳍长/尾柄长, 可以解释为鱼体的尾部特征; 第 2 主成分中起主要作用的是头高/头长、吻长/头长和眼径/头长, 可以解释为鱼体的头部特征; 第 3 主成分中起主要作用的是头高/头长和体高/体长, 也可以解释为鱼体的总体特征。

将上述聚类分析得到的体型偏向修长型和偏向团圆型 2 组鱼每个个体的主成分值绘制散点图(图 2), 在第 1 主成分上, 2 组体型不同的禾花鱼区分明显, 在尾柄高/尾柄长、尾鳍长/尾柄长和体高/体长这 3 个

表 2 禾花鱼的形态测量平均值及其标准差

Tab.2 The mean value and standard deviation of the morphological traits of rice flower carp

生长性状 Traits	体重 W	全长 L_T	体长 L_S	体高 D_B	体宽 W_B	头长 L_H	头高 H_H	吻长 L_M	眼径 D_E	尾柄长 L_{CP}	尾柄高 D_{CP}	尾鳍长 L_C
平均值 Mean	21.88	11.12	8.76	3.66	1.68	2.86	2.53	0.92	0.60	1.26	1.24	2.44
标准差 SD	2.76	2.71	2.30	1.08	0.34	0.67	0.65	0.10	0.12	0.34	0.38	0.51

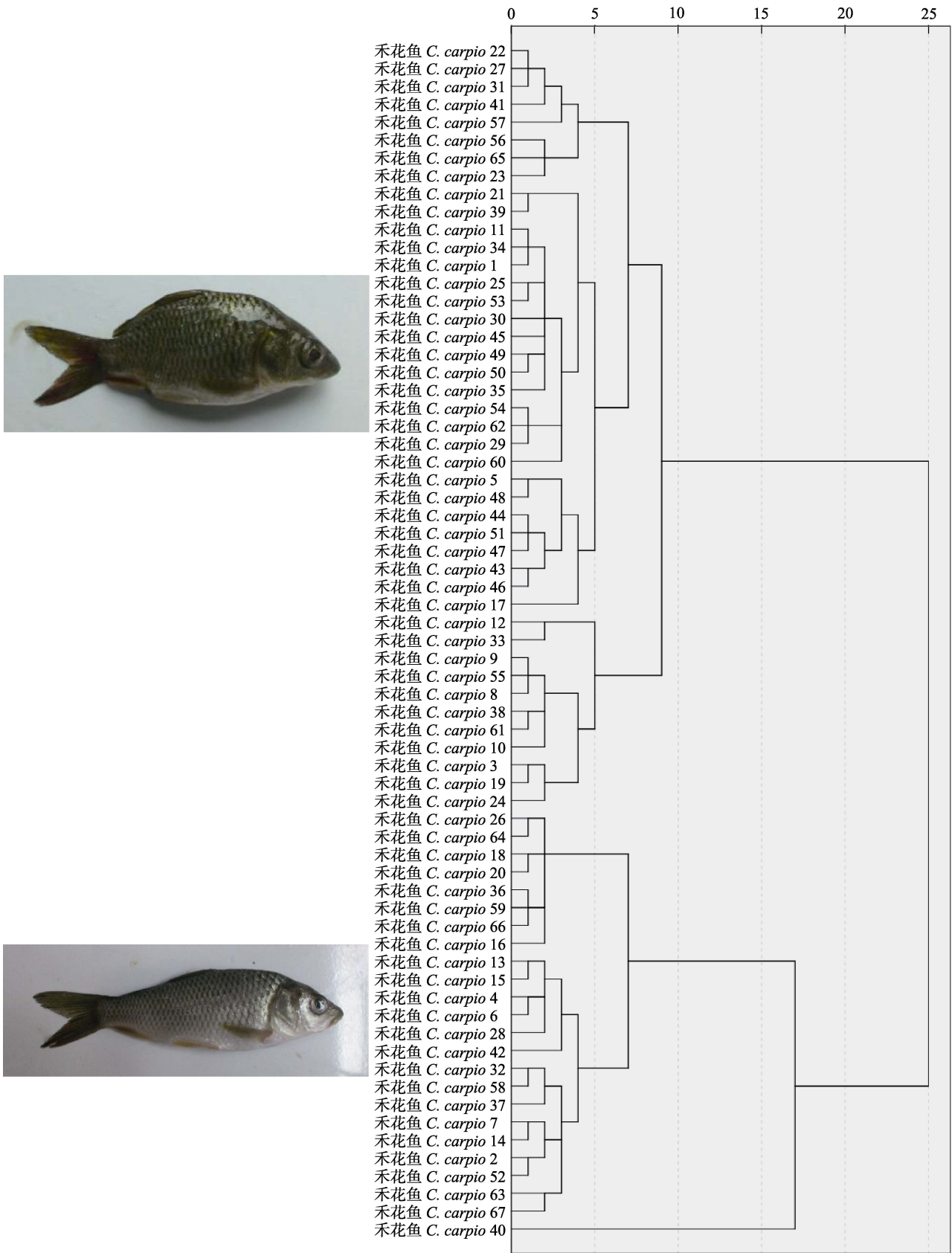


图 1 同一禾花鱼群体内不同个体的形态聚类关系

Fig.1 Cluster analysis of the common carp individuals cultured in paddy field according to morphological characteristics

表 3 禾花鱼 10 个形态特征变量的主成分载荷
Tab.3 Loading of principal components (PC) for 10 morphometric characteristics of rice flower carp

主成分 PC	比例性状 Morphometric ratios										贡献率 Contribution (%)	累积贡献率 Cumulative contribution (%)
	H_H/L_H	L_M/L_H	D_E/L_H	D_{CP}/L_{CP}	L_C/L_{CP}	L_T/L_S	L_H/L_S	D_B/L_S	W_B/L_S	L_{CP}/L_S		
第 1 主成分 PC1	0.070	0.334	-0.234	0.887	0.900	0.496	0.603	0.806	0.674	-0.778	40.868	40.868
第 2 主成分 PC2	-0.594	-0.542	0.659	-0.279	0.043	0.492	0.427	-0.031	0.448	0.274	17.509	58.377
第 3 主成分 PC3	0.755	-0.323	0.397	0.082	0.140	0.413	-0.591	0.253	0.124	0.239	15.142	73.520

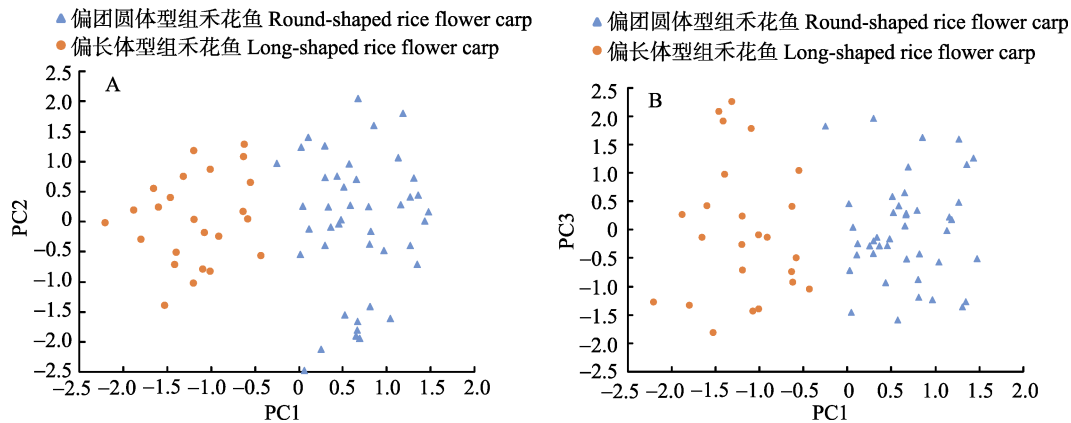


图 2 禾花鱼依据形态特征数据分组后的主成分分析散点图
Fig.2 Scatter diagram for the principal component analysis of the rice flower carps grouped according to morphological characteristics

比值中, 偏长体型组鱼的平均值分别为 0.78、1.57 和 0.37, 偏团圆体型组鱼的平均值为 1.07、2.08 和 0.44, 均呈极显著差异($P < 0.01$); 在第 2 主成分上, 2 组体型不同的禾花鱼部分重合, 区分不明显, 在头高/头长、吻长/头长和眼径/头长 3 个比值中, 偏长体型组鱼的平均值分别为 0.85、0.27 和 0.25, 偏团圆体型组鱼的平均值为 0.86、0.31 和 0.23, 除吻长/头长值有显著差异($P < 0.05$)外, 头高/头长和和眼径/头长值无显著差异($P > 0.05$); 在第 3 主成分上, 2 组体型不同的禾花鱼完全重合, 头高/头长在 2 组禾花鱼中无显著差异。

2.4 稻田养殖禾花鱼与其他几种鲤鱼的形态比较分析

用可以查询到的 6 种鲤鱼的 7 个生长性状比值, 与偏长体型和偏团圆体型 2 组禾花鱼各自相对应的生长性状比值的平均值进行主成分分析, 结果见表 4。得到 2 个主成分, 其累积贡献率为 82.7%, 主成分分析结果基本可反映综合指标所隐含的信息, 第 1 主成分中起主要作用的是体高/体长和尾柄高/尾柄长, 以及头长/体长、体宽/体长和全长/体长, 可解释为鱼体的总体体型特征; 第 2 主成分中起主要作用的是头高/头长, 可解释为鱼体的头部特征。

表 4 2 种体型禾花鱼与其他 6 种鲤鱼 7 个形态特征变量的主成分载荷
Tab.4 Loading of principal components (PC) for 7 morphometric characteristics of rice flower carp and other six common carp populations

主成分 PC	比例性状 Morphometric ratios							贡献率 Contribution (%)	累积贡献率 Cumulative contribution (%)
	H_H/L_H	D_E/L_H	D_{CP}/L_{CP}	L_T/L_S	L_H/L_S	D_B/L_S	W_B/L_S		
第 1 主成分 PC1	0.160	0.189	0.903	0.847	0.896	0.930	0.861	57.196	57.196
第 2 主成分 PC2	0.914	-0.861	-0.294	-0.020	0.059	0.339	-0.080	25.553	82.749

从依据第 1 主成分和第 2 主成分绘制的散点图(图 3)可以看出,无论是长体型禾花鱼还是团圆体型禾花鱼的主成分值均介于兴国红鲤和荷包红鲤之间,且在第 1 主成分上,长体型禾花鱼与兴国红鲤、镜鲤和建鲤聚在一起,而与和瓯江彩鲤和荷包红鲤聚在一起,团圆体型禾花鱼区分开;在第 2 主成分上,长体型禾花鱼与团圆体型禾花鱼聚在一起,再与荷包红鲤、兴国红鲤、建鲤和黄河鲤聚在一起,而与镜鲤和瓯江彩鲤区分开。

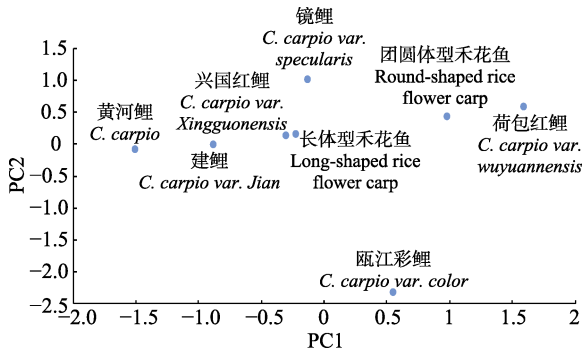


图 3 2 种体型禾花鱼与其他 6 种鲤鱼 7 个生长性状比值的第 1 主成分、第 2 主成分散点图
Fig.3 Scatter plot of PC1 versus PC2 extracted from 7 morphometric characteristics of rice flower carp with two shapes and another six common carp populations

将 2.1 中聚类分析得到的偏长体型组鱼和偏团圆体型组鱼生长性状比值的平均值与 6 种其他鲤鱼的生长性状比值进行聚类分析,结果表明,偏长体型禾花鱼与兴国红鲤聚合在一起,再与镜鲤聚合在一起,再与黄河鲤、建鲤聚为一支,荷包红鲤与瓯江彩鲤聚为另一支,偏团圆体型的禾花鱼介于两支之间(图 4)。

2.5 禾花鱼线粒体 COII 基因的克隆与进化分析

对测序得到的 38 尾禾花鱼的 COII 基因(606 bp, 图 5)进行比较,结果表明,仅有 2 个多态位点,一个位于+31,为颠换位点 A-T(4: 34),另一个位于+597,为转换位点 A-G(28: 10),共 4 种基因型(AA : AG : TG : TA=3 : 1 : 9 : 25),其中,TA 基因型个体数目最多,占总数的 65.8%,而多态位点数仅占序列长度的 0.33%。经分析,这 4 种基因型与体型特征之间没有对应关系,不能区分长体型禾花鱼和团圆体型禾花鱼。

用 TA 基因型禾花鱼 COII 部分基因序列与 7 种已知的鲤科鱼类 COII 基因序列进行比对,结果表明,禾花鱼与鲤科鲤属的 5 种鱼 COII 基因同源性均在 99%以上,与斑马鱼 COII 基因的同源性仅为 79%。从构建的进化树可以看出(图 6),禾花鱼与荷包红鲤的 COII 基因同源性最高,其次为兴国红鲤,而斑马

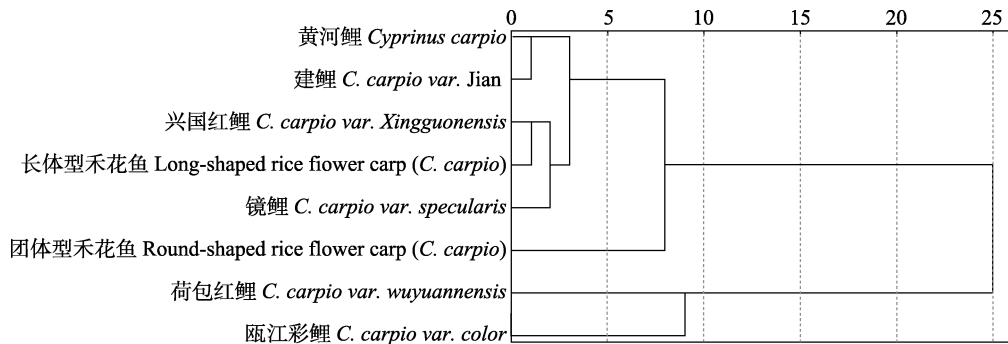


图 4 2 种体型的禾花鱼与其他 6 种鲤鱼的形态学聚类分析
Fig.4 Dendrogram of rice flower carps with two shapes and another six common carp populations by cluster analysis

1 TAATTGTGCTCCTAATTAGCACTTTAGTGTA/TATATATTACTGCAATGGTATCAACTAACTACTAATAAATATATT 80
 81 CTAGACTCCCAAGAAATCGAAATCGTATGAACCATCTACCGCGTCATTTTAGTACTAATCGCCCTGCCCTCCCTACG 160
 161 CATCTGTACTTTATAGACGAAATTAACGACCTCACCTGACAATTAAGCAATAGGACACCAATGATACTGAAGTTACG 240
 241 AGTATACAGACTATGAAATCTAGGATTCGACTCCTATATAGTACCAACCAAGACCTTGCCCGCGACAATCCGACTT 320
 321 CTGAAACAGACACCGAATAGTTGTCCAATAGAATCCCGAGTCCGTGCTAGTATCTGCTGAAGACGTGTACATTC 400
 401 TTGAGCTGTTCCATCCCTGGCGTAAAAATGGAGCAGTCCAGGACGACTAAATCAAGCCGCTTTATTGCTCACGCC 480
 481 CAGGGGTGTTTACGACAATGCTCTGAAATTTGTGGAGCTAATCACAGCTTTATACCAATTGTAGTTGAAGCAGTACCT 560
 561 CTCGAACACTTCGAAACTGATCCTCATAATACTAA/GAAGACGCGCT 606

图 5 禾花鱼的 COII 基因部分序列
Fig.5 The partial sequence of COII gene from rice flower carp

加粗字表示多态位点
Bold shows the polymorphic sites

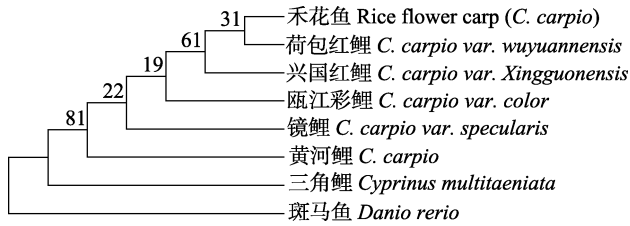


图 6 禾花鱼和 7 种鲤科鱼的 COII 基因进化树分析

Fig.6 Phylogenetic tree of COII genes from rice flower carp and seven carp populations within Cyprinidae

鱼 COII 基因是聚类分析的外群, 可以确定禾花鱼为鲤属鲤种的一个群体。

3 讨论

广东粤北地区养殖户反映目前禾花鱼养殖品种形态变异大, 其中, 团圆体型的“石鲤”在稻田养殖过程中不易逃走, 而且肉厚、骨软、成活率高, 而长体型的“柴鲤”易逃走, 且肉少、骨硬、成活率低。为了进一步对该禾花鱼养殖品种进行选育, 本研究用形态学统计聚类分析的描述方法, 将禾花鱼依据形态分为体型偏团圆型和偏修长型两大类, 并揭示了两类禾花鱼的形态差异主要表现在尾柄高/尾柄长、尾鳍长/尾柄长和体高/体长这 3 个比例性状上。而这 3 个比例性状, 特别是“体高/体长和尾柄高/尾柄长”, 是鲤鱼选育的重要考量指标, 如对荷元鲤的选育研究表明, 荷元鲤的体长/体高为 2.35~2.55 之间, 可获得单位体长的最好增重效果(Ma *et al.*, 1981; 张建森, 1985)。对广东地区传统稻田养殖禾花鱼生长形态学的统计、描述和分类, 可为禾花鱼的下一步选育工作奠定形态学研究基础。

禾花鱼在养殖过程中没有投喂人工饵料, 所以, 生长较为缓慢, 在形态数据测定时, 其个体体重仅在 10~44 g 范围内, 而与其相比较的其他种类的鲤鱼规格在 100 g 以上(郑水平等, 1998; 明俊超等, 2009), 有些甚至达到 2 kg(郭梁等, 2017)。有研究表明, 不同生长阶段、雌雄差异、饲料和养殖环境等都会对鱼类的形态特征产生影响(王兰梅等, 2017; 岳亮等, 2016; 沈伟良等, 2017)。但从本研究对禾花鱼的形态数据聚类分析结果可以看出, 兴国红鲤、荷包红鲤、镜鲤、黄河鲤和建鲤的聚合分析结果与之前的鲤鱼形态聚类结果相吻合(明俊超等, 2009; 郭梁等, 2017)。长体型禾花鱼与兴国红鲤、镜鲤、黄河鲤、建鲤聚合在一起, 而荷包红鲤与瓯江彩鲤聚在一起, 偏团圆体型的禾花鱼的形态性状处于长体型鲤与团圆体型鲤的中间类型。分析结果与观察得到的结果相似, 说明

禾花鱼 1 龄前已显示出初步的形态特征, 与其他鲤鱼品种进行形态比较结果较为准确, 可为其他规格差异较大种群形态学比较研究提供参考依据。另外, 从目前的研究结果可以看出, 粤北地区的偏团圆体型的禾花鱼形态与荷元鲤的形态相似, 但对荷元鲤的形态学研究数据不足, 限制了禾花鱼与其进行比较(Ma *et al.*, 1981; 张建森, 1985)。此外, 对另 2 种稻田养殖鲤鱼——“青田稻田鱼”和“从江稻田鱼”的形态学聚类分析发现, 这 2 种田鱼在形态上已明显区别于兴国红鲤、黄河鲤和建鲤等 8 种鲤鱼种群(郭梁等, 2017)。而本研究中的稻田养殖禾花鱼形态学聚类分析表明, 禾花鱼的形态仍具有明显的鲤鱼特征, 虽然已经经过多年的传统稻田养殖, 但还不能从形态上将其从鲤鱼群体中区分出来。从上述比较结果还可以看出, 目前, 广东地区禾花鱼品种较为混杂, 需要以形态学为基础, 进一步建立家系进行选育。

稻田养殖鲤鱼在不同地区的品种有所不同, 包括很多个地方种, 如广东地区主要养殖的禾花鱼为华南鲤(*Cyprinus carpio rubrofusca*), 广西地区主要养殖的禾花鱼为乌鲤(*Procypris merus*)等。COII 基因作为鲤鱼品种的遗传标记已有大量的报道, 包括 25 种鲤科鱼类(凌去非等, 2006)、中国红鲤(*Cyprinus flammans*)(王成辉等, 2004)、瓯江彩鲤(吕耀平等, 2009)及锦鲤(*Cyprinus carpio*)、瓯江彩鲤和长鳍鲤(*Cyprinocirrhites polyactis*)之间的亲缘关系(Wang *et al.*, 2004)。在上述研究的基础上, 本研究对禾花鱼的 COII 基因序列进行了分析, 确定了禾花鱼为鲤科、鲤属、鲤种的一个群体。在研究 5 种体色 20 尾瓯江彩鲤 COII 基因(604 bp)中发现, 多态位点百分率为 1.49%, 而本研究 38 尾禾花鱼的 COII 基因(606 bp)多态位点仅占 0.33%, 远低于鲤鱼种间 3.79% 的水平(吕耀平等, 2009)。虽然禾花鱼体型差异较大, 但根据 COII 基因多样性的判别, 远没有达到种间的水平。

本研究对粤北地区典型稻田养殖基地的禾花鱼进行了形态学分析和初步的遗传学分析, 用科学的方法阐释了生产实践观察到的禾花鱼形态多样性丰富的现象, 根据测量数据对 2 种体型的禾花鱼进行了分类, 并用分子手段确定了地方养殖品种的分类地位, 为禾花鱼接下来的育种工作奠定了基础。

参 考 文 献

- Cao WX, Chen YY, Wu YF, *et al.* The origin and evolution of *Schizothorax chongi* and the relationship with the uplift of the Qinghai Tibet Plateau. Beijing: Science Press, 1981,

- 118–130 [曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原隆起的关系. 北京: 科学出版社, 1981, 118–130]
- Chen DY, Li D. Comparative study on genetic characters of distant hybridization crucian (*Carassius auratus cuvieri* ♀ × *Cyprinus carpio* var. *singuanensis* ♂) and its parents. *Biotechnology*, 2008, 18(3): 24–26 [陈道印, 李达. 远缘鲫(白鲫♀ × 兴国红鲤♂)与其亲本若干遗传性状比较. 生物技术, 2008, 18(3): 24–26]
- Clutton-Brock J. A natural history of domesticated mammals. 2nd Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
- Endler JA. Natural selection in the wild. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1986
- Gu ZM, Jia YY, Ye JY, et al. Studies on morphological characteristics and genetic analysis of the hybrid F₁, *Erythroculter ilishaeformis* ♂ × *Megalobrama amblycephala* ♀. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(4): 533–544 [顾志敏, 贾永义, 叶金云, 等. 翘嘴红鲌(♀) × 团头鲂(♂)杂种 F₁ 的形态特征及遗传分析. 水产学报, 2008, 32(4): 533–544]
- Guo L, Ren WZ, Hu LL, et al. Morphological traits of indigenous field carps maintained in traditional rice-based farming systems. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(2): 665–672 [郭梁, 任伟征, 胡亮亮, 等. 传统稻鱼系统中“田鲤鱼”的形态特征. 应用生态学报, 2017, 28(2): 665–672]
- Hall SJG. Livestock Biodiversity: Genetic resources for the farming of the future. Oxford: Blackwell, 2004
- Hu LL, Ren WZ, Tang JJ, et al. The productivity traditional rice-fish co-culture can be increased without increasing nitrogen loss to the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2013, 177: 28–34
- Li CT, Ge YL, Hu XS, et al. Germplasm analysis of scattered mirror carp found in areas of Heilongjiang Province and Changjiang River Basin. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(1): 24–28 [李池陶, 葛彦龙, 胡雪松, 等. 黑龙江和长江散鳞镜鲤群体的种质差异分析. 水产学杂志, 2016, 29(1): 24–28]
- Li CT, Zhang YY, Jia ZY, et al. Comparative studies on measurable characters and the number of scales in Songpu mirror carp and German mirror carp selection strain F₄. *Chinese Journal of Fisheries*, 2009, 22(2): 53–55 [李池陶, 张玉勇, 贾智英, 等. 松浦镜鲤与德国镜鲤选育系(F₄)的可量性状、鳞片数比较. 水产学杂志, 2009, 22(2): 53–55]
- Lin MX, Wang J, Wang J, et al. Applicability of molecular population genetics methods in analyzing common carp morphological data. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 769–778 [林明雪, 王剑, 王军, 等. 分子群体遗传学方法处理鲤形态学数据的适用性. 水产学报, 2015, 39(6): 769–778]
- Ling QF, Li SF. Mitochondrial cytochrome oxidase unit II gene variability and phylogenetic relationships among 25 species of Cyprinidae. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(6): 747–752 [凌去非, 李思发. 鲤科 25 种鱼类线粒体 CO II 基因序列差异及其系统进化关系. 水产学报, 2006, 30(6): 747–752]
- Liu MH, Shen JB, Wang Q, et al. Genetic and economic characters of Songpu mirror carp [(Scattered carp × Germany carp)F₁]. *Chinese Journal of Fisheries*, 1993, 6(1): 19–25 [刘明华, 沈俊宝, 王强, 等. 松浦镜鲤[(散鳞镜鲤 × 德国镜鲤)F₁]主要经济性状及遗传特性. 水产学杂志, 1993, 6(1): 19–25]
- Liu SQ, Wen XR, Xia DM. The test reports of tri-hybrids of [(*Cyprinus carpio* mirror carp ♀ × *Cyprinus carpio wuyuanensis* ♂) ♀ × *Cyprinus carpio* Germany mirror carp ♂]. *Fisheries Science*, 1990(4): 6–12 [刘淑琴, 闻秀荣, 夏大明. 三杂交鲤[(镜鲤♀ × 荷包红鲤♂)♀ × 德国镜鲤♂]试验报告. 水产科学, 1990(4): 6–12]
- Liu XM, Shi Y. Effects of morphological traits on body weight of F₁ generation of common carp in the Yellow River. *Fisheries Science & Technology Information*, 2015, 42(6): 324–327 [刘晓敏, 石英. 黄河鲤 F₁ 代形态性状对体质量的影响. 水产科技情报, 2015, 42(6): 324–327]
- Liu Y, Chen SQ, Wang YX, et al. The study on the hybrids of *Cyprinus carpio wuyuanensis* ♂ × Xiangjiang wild carp ♀ and the application of F₁ hybrids in production. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 1979, 2(2): 1–14 [刘筠, 陈淑群, 王义铤, 等. 荷包红鲤♂ × 湘江野鲤杂交一代的研究及其在生产上的应用. 湖南师范大学自然科学学报, 1979, 2(2): 1–14]
- Liu ZG, Cai WQ, Wang CH. The preliminary study on the morphological characteristics and growth of *Cyprinus carpio* var. *color* Japanese Koi and their reciprocal hybrids of F₁ generation. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2003, 12(4): 289–292 [刘治国, 蔡完其, 王成辉. 浦江彩鲤与日本锦鲤及其正反杂交 F₁ 形态特征和生长初步研究. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 289–292]
- Lü X. The study on the morphological characteristics and main traits of *Cyprinus carpio wuyuanensis* (♂), mirror carp (♀) and their F₁ hybrids. *Fisheries Science*, 1983, 2(3): 1–5 [吕迅. 荷包红鲤(♂)、镜鲤(♀)及其杂种一代的形态特点和主要性状分析. 水产科学, 1983, 2(3): 1–5]
- Lü YP, Hu ZH, Xiao JZ, et al. Intraspecific DNA sequence polymorphism and genetic markers in the mitochondrial CO II gene from five color patterns of Oujiang color carp. *Journal of Zhejiang University (Sciences Edition)*, 2009, 36(3): 323–327 [吕耀平, 胡则辉, 肖建中, 等. 5 种体色浦江彩鲤线粒体 COII 基因的序列差异和遗传标记研究. 浙江大学学报(理学版), 2009, 36(3): 323–327]
- Lü YP, Lin ZH, Lei YZ. Sexual dimorphism in morphological traits and female individual fecundity of Oujiang color common carp, *Cyprinus carpio* var. *color*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(2): 284–288 [吕耀平, 林植华, 雷焕宗, 等. 浦江彩鲤形态特征的两性

- 异形和雌性个体生育力. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 284–288]
- Ma DW, Qian J, Liu JS, *et al.* Development strategy for integrated rice field aquaculture. *Engineering Sciences*, 2016(3): 96–100 [马达文, 钱静, 刘家寿, 等. 稻渔综合种养及其发展建议. 中国工程科学, 2016(3): 96–100]
- Ma ZB, Zhang XZ, Qiu QR, *et al.* The analysis of the economical characteristics of a hybrid from two ecological types of carps. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(3): 187–198 [马仲波, 张兴忠, 仇潜如, 等. 元江鲤与荷包红鲤的生态类型及其杂交后代(荷元鲤)经济性状的分析. 水产学报, 1981, 5(3): 187–198]
- Ming JC, Dong ZJ, Liang ZY, *et al.* Analysis of morphological variation in six common carp (*Cyprinus carpio*) populations. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2009, 29(6): 1–6 [明俊超, 董在杰, 梁政远, 等. 6个不同鲤群体的形态差异分析. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 1–6]
- Shen WL, Wu XF, Shentu JK, *et al.* The effects of different diets and culture environments on the morphological variations in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 70–77 [沈伟良, 吴雄飞, 申屠基康, 等. 不同饵料及养殖环境对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态差异的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 70–77]
- Wang CH, Li SF. Genetic variability and relationships in mitochondrial DNA CO II gene sequence of red common carps in China. *Journal of Genetics and Genomics*, 2004, 31(11): 1226–1231 [王成辉, 李思发. 中国红鲤线粒体CO II基因的遗传变异和亲缘关系. 遗传学报, 2004, 31(11): 1226–1231]
- Wang CH, Li SF. Phylogenetic relationship of ornamental (Koi) carp, Oujiang color carp and long fin carp revealed by mitochondrial DNA CO II gene sequences and RAPD analysis. *Aquaculture*, 2004, 131: 83–91
- Wang LM, Zhu WB, Dong ZJ, *et al.* Differential analysis on growth of FFRC strain common carp (*Cyprinus carpio*) selection families at various culture stages. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(1): 43–49 [王兰梅, 朱文彬, 董在杰, 等. 福瑞鲤选育家系不同养殖阶段的生长差异分析. 南方水产科学, 2017, 13(1): 43–49]
- Xie HM. The value of hybrids of *Carassius auratus gibelio* and *Cyprinus carpio* in fishery. *Freshwater Fisheries*, 1985(6): 41–42 [谢洪民. 银鲫与鲤鱼杂交种的渔业价值. 淡水渔业, 1985(6): 41–42]
- Xie J, Hu LL, Tang JJ, *et al.* Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish co-culture system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 1381–1387
- Xu P, Zhang XF, Wang XM, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, 2014, 46: 1212–1219
- Yan XC, Liang LQ, Cao DC, *et al.* Comparison of the morphological characteristics between two types of backcross progenies from the common and crucian carp. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(6): 797–800 [闫学春, 梁利群, 曹顶臣, 等. 鲤鲫杂交两种回交子代鱼的形态特征比较. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 797–800]
- Yangtze River Fisheries Research Institute. *Cyprinus carpio wuyuanensis* ♀ and *Cyprinus carpio yuankiang* ♂ cross breeding and its application in production. *Freshwater Fisheries*, 1976(7): 17–19 [长江水产研究所. 红荷包鲤♀与元江鲤♂的杂交育种及其生产应用. 淡水渔业, 1976(7): 17–19]
- Yu CR, Li YH, Zheng GL, *et al.* Comparison of morphological characteristics and flesh rate of several common carp varieties and hybrids in our province. *Fisheries Science*, 1995, 14(4): 13–14 [于春然, 李越红, 郑亘林, 等. 我省几种鲤品种和杂交种形态特征和含肉率的比较. 水产科学, 1995, 14(4): 13–14]
- Yue L, Wang XA, Ma AJ, *et al.* Comparison of the morphological traits between male and female individuals of *Takifugu rubripes*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 30–35 [岳亮, 王新安, 马爱军, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)雌、雄个体的形态特征比较. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 30–35]
- Zhang JS. Heyuan hybrid carp (*Cyprinus carpio wuyuanensis* ♀ × *Cyprinus carpio yuankiang* ♂) backcross experiment and its economic profits research. *Fisheries Science & Technology Information*, 1985a, 12(3): 17–19 [张建森. 荷元鲤(荷包红鲤♀ × 元江鲤♂)回交试验及其经济效益的研究. 水产科技情报, 1985a, 12(3): 17–19]
- Zhang JS. The reciprocal and backcross hybrids of *Cyprinus carpio wuyuanensis* × *Cyprinus carpio yuankiang* and the economic benefit analysis of F₂. *Journal of Fisheries of China*, 1985b, 9(4): 375–382 [张建森. 荷包红鲤与元江鲤正反杂交、回交及F₂经济效益的研究. 水产学报, 1985b, 9(4): 375–382]
- Zhang WT. SPSS 11 statistical analysis tutorial. Beijing: Beijing Hope Electronic Press, 2002, 27–31 [张文彤. SPSS11 统计分析教程. 北京: 北京希望电子出版社, 2002, 27–31]
- Zheng SP, Wang Q, Wang HL, *et al.* Comparison of the external morphological characteristics of the hybrids and their parents of the Yellow River carp. *Journal of Hydroecology*, 1998(5): 22–24 [郑水平, 王权, 王焕来, 等. 黄河鲤杂交一代与亲本外部形态特征比较. 水利渔业, 1998(5): 22–24]
- Zheng YG, Wu WX, Lin LA, *et al.* Furong carp and its parents [Scattered mirror carp (♀), Xingguo red carp (♂)] morphological test report. *Current Fisheries*, 1981(4): 7–13 [郑远刚, 吴维新, 林临安, 等. 芙蓉鲤及其亲本[散鳞镜鲤(♀)、兴国红鲤(♂)]形态特征测试报告. 内陆水产, 1981(4): 7–13]

Zhu LY, Ma YQ, Xiang SP, *et al.* Observation and analysis of growth dynamics in Oujiang color common carp with different pigmentation types. *Journal of Shanghai Ocean*

University, 2013, 22(3): 341–348 [朱丽艳, 马玉清, 项松平, 等. 不同体色瓯江彩鲤生长动态的观察与分析. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(3): 341–348]

(编辑 冯小花)

Morphological Characteristics and Genetic Analysis of the Rice Flower Carp in the Northern Region of Guangdong Province

MA Dongmei, HUANG Zhanghan, ZHU Huaping^①, XIE Jun

(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)

Abstract In order to investigate the germplasm of rice flower carp cultured in the paddy fields of the northern region of Guangdong Province, 67 rice flower carp individuals were chosen at random. After measuring their morphological traits and calculating their morphological ratios, the rice flower carp were divided into two clusters according to shape. One cluster tended to have an elongated shape, and the other had a rounded shape. There were highly significant differences in the ratios D_{CP}/L_{CP} (depth of caudal peduncle to length of caudal peduncle), L_C/L_{CP} (length of Caudal fin to length of caudal peduncle), and D_B/L_S (body depth to soma length) between the long-shaped and round-shaped fish groups. The results suggested that the differences between the two groups were dependent on these three parameter values. Principal component analysis of the morphological characteristics of these rice flower carp and of six common populations reported previously was carried out. The results showed that in the PC1, which characterized the shape of the whole body, the long-shaped flower carp was similar to *Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*, *C. carpio* var. *specularis*, and *C. carpio* var. *Jian*, and distinguished from the round-shaped rice flower carp, which clustered with *C. carpio* var. *color* and *C. carpio* var. *wuyuannensis*. In the PC2, which characterized the shape of the head, the rice flower carp of both shapes clustered together and were distinguished from *C. carpio* var. *specularis* and *C. carpio* var. *color*. The cluster analysis suggested that the long-shaped rice flower carp was similar to *C. carpio* var. *xingguonensis*, *C. carpio* var. *specularis*, and *C. carpio* var. *Jian* within one cluster, and *C. carpio* var. *wuyuannensis* and *C. carpio* var. *color* in another cluster. The round-shaped rice flower carp was positioned between the two clusters. These results indicate that rice flower carp are mixed strains. It is necessary to carry out family-wise selection on the basis of morphology. Furthermore, polymorphism analysis of a partial sequence (606 bp) of the *CO II* gene from rice flower carp showed that there were two polymorphic sites that formed four genotypes, where the proportion of polymorphic sites was only 0.33%. Compared with the seven species from *Cyprinus*, the phylogenetic tree based on the *CO II* gene sequences indicated that rice flower carp is one population of *C. carpio*. These results of the polymorphic investigation and genetic analysis in the present study lay the foundation for further breeding research on rice flower fish.

Key words Rice flower fish; Carp; Morphological characteristics; *CO II* gene; Cluster analysis

① Corresponding author: ZHU Huaping, E-mail: zhaping2000@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180226002

http://www.yykxjz.cn/

周华兴, 胡玉婷, 段国庆, 凌俊, 江河, 潘庭双. 基于线粒体细胞色素**b**基因序列的新安江流域温州光唇鱼群体遗传研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 43–50

Zhou HX, Hu YT, Duan GQ, Ling J, Jiang H, Pan TS. Population genetic analyses of *Acrossocheilus wenchowensis* in Xin'an Basin based on the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 43–50

基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的新安江流域 温州光唇鱼群体遗传研究*



周华兴^① 胡玉婷 段国庆 凌俊 江河 潘庭双

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

摘要 为了解新安江流域温州光唇鱼(*Acrossocheilus wenchowensis*)的群体遗传变异规律, 本研究采集 6 个不同地理群体共 170 个体, 采用线粒体基因组细胞色素 *b*(mtDNA Cyt *b*)测序方法, 研究群体遗传结构以及群体变化的历史动态。研究显示, 温州光唇鱼不同地理群体间的遗传多样性差异较大, 整体遗传多样性水平较低。群体间检测到了不同程度的遗传分化, 但由于分化时间较短(上新世晚期), 分子遗传变异主要来自于群体内。温州光唇鱼约于 335 万年前发生过群体扩张事件。群体扩张时, 全球处于末次冰川时期的早期, 群体的扩张并未受到低温的影响, 因此, 推测新安江流域可能是潜在的冰期避难所。祖籍地重建分析结果表明, 新安江流域温州光唇鱼起源于率水上游和练江上游, 经过一系列的群体扩散-隔绝-分化事件, 形成现今的分布。原种的鉴定为新安江流域光唇鱼群体保育工作提供理论依据。

关键词 新安江流域; 温州光唇鱼; mtDNA Cyt *b*; 群体遗传分析

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0043-08

新安江源于黄山南麓, 流域上游多为山间溪流, 地势复杂, 水流湍急。下游东入浙江省西部, 经淳安至建德与兰江汇合后为钱塘江。温州光唇鱼(*Acrossocheilus wenchowensis*)隶属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、光唇鱼属(*Acrossocheilus*)(Nelson *et al.*, 2016), 是新安江流域中上游栖息的淡水型鱼类, 在浙江、广东、福建境内也有分布。因其成鱼常栖息于石缝间, 体侧具有多条鲜艳的黑色横斑而被地方称为“石斑鱼”。由于温州光唇鱼肉质细嫩、体色鲜艳, 具有较高的食用和观赏价值, 深受消费者的青睐(冀德伟

等, 2009)。近年来, 受水质污染、栖息地破坏、过度捕捞等人类活动的影响, 新安江流域温州光唇鱼的野生资源急剧减少, 其分布范围日益减缩, 资源数量逐渐下降, 个体规格也越来越小(胡玉婷等, 2017)。因此, 开展新安江流域温州光唇鱼群体遗传结构研究和保育工作已迫在眉睫。

由于具有高突变率、低重组率及严格的母系遗传等特征, 线粒体基因序列一直是群体遗传学和系统发生学研究中的理想标记(Cann *et al.*, 1987)。马春艳等(2009)采用线粒体细胞色素 *b* 基因(Cyt *b*)对鲴属 3 种鱼类系统进

* 安徽省农业科学院院长青年基金(17B0510)、安徽省科技重大专项(17030701009)和安徽省水产产业技术体系(2016-84)共同资助 [This work was supported by Youth Foundation of President of Anhui Academy of Agricultural Science (17B0510), Anhui Science and Technology Major Project (17030701009), and Earmarked Fund for Anhui Fishery Research System (2016-84)]

① 通讯作者: 周华兴, E-mail: hxzhou1987@126.com

收稿日期: 2018-02-26, 收修改稿日期: 2018-04-01

化关系进行分析, 提出银鲴(*Pampus argenteus*)是3种鲴属鱼类中较早分化出的种, 而刺鲴(*Psenopsis anomala*)则是鲴属鱼类的原始类群的观点。李大命等(2017)利用线粒体 *Cyt b* 和细胞色素氧化酶亚基 I (*CO I*) 基因作为分子标记, 分析洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) 40 个个体的序列多态性, 提出该群体可能经历种群扩张事件, 且单倍型未出现遗传分化。张争世等(2017)基于线粒体 *Cyt b* 基因探讨齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)野生群体的遗传多样性和遗传结构, 长江上游4个齐口裂腹鱼野生群体未经历过种群扩张, 且群体间和群体内存在显著的遗传分化。

本研究采用线粒体 *Cyt b* 基因, 探讨新安江流域

的6个不同温州光唇鱼地理群体的遗传结构, 并重建其群体进化历史, 以期为该鱼种的保育和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验所用的温州光唇鱼样本于2016年10月~2017年8月采集自新安江流域。6个自然群体分别采自毕村(BC)、杞梓里(QZL)、南塘(NT)、上丰(SF)、北岸(BA)、朱家坑(ZJK), 共170个个体(表1, 图1)。样本采集后做好标记, 保存于95%的酒精中固定。

表1 温州光唇鱼样本采集信息
Tab.1 Sampling information of *A. wenchowensis*

群体 Populations	样本采集地 Sampling site	所属支流 Streams	采集样本数 Sampling number	经度/E Longitude	纬度/N Latitude
BC	毕村 Bicun	率水中游 Shuaishui midstream	30	118°5'43.8"	29°39'24.48"
QZL	杞梓里 Qizili	昌溪 Changxi	30	118°44'53.88"	30°0'10.8"
NT	南塘 Nantang	横江 Heng River	25	118°7'14.16"	29°54'1.08"
SF	上丰 Shangfeng	练江 Lian River	27	118°21'11.88"	29°59'33"
BA	北岸 Bei'an	锦溪 Jinxi	28	118°34'14.16"	29°54'12.96"
ZJK	朱家坑 Zhujiakeng	率水上游 Shuaishui upstream	30	117°42'54"	29°37'10.2"

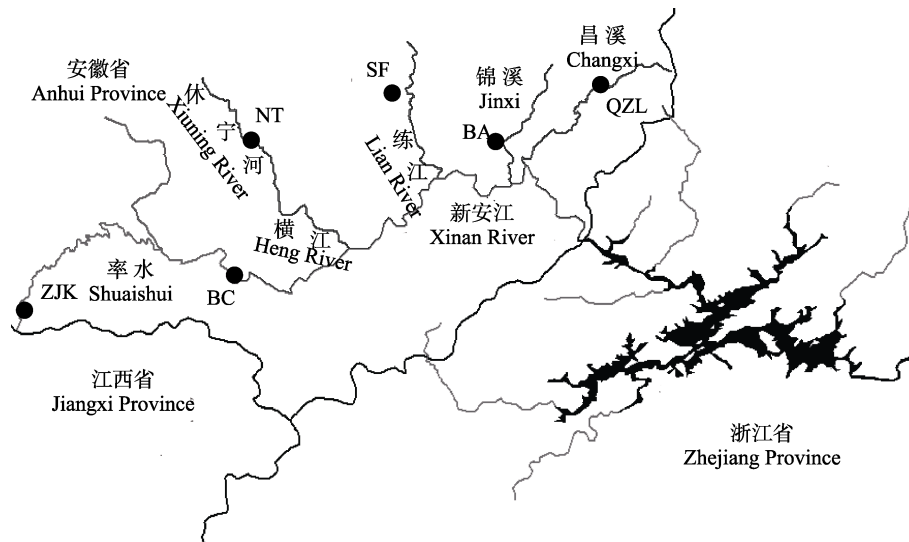


图1 温州光唇鱼6个群体样本采集点

Fig.1 Sampling sites of 6 populations of *A. wenchowensis*

BC: 毕村; QZL: 杞梓里; NT: 南塘; SF: 上丰; BA: 北岸; ZJK: 朱家坑。下同
BC: Bicun; QZL: Qizili; NT: Nantang; SF: Shangfeng; BA: Bei'an; ZJK: Zhujiakeng. The same as below

1.2 基因组DNA提取

取样本背部肌肉组织, 采用 Sambrook 法提取基因组DNA(Sambrook *et al.*, 1989)。

1.3 PCR扩增及测序

Cyt b 基因的扩增和测序引物为H15915(5'-CTC CGATCTCCGGATTACAAGAC-3') 和 L14724(5'-GAC

TTGAAAAACCACCGTTG-3')(Xiao *et al.*, 2001)。

PCR 反应体系: 200 ng 的模板 DNA, 10×Buffer 缓冲液(TaKaRa) 5 μ l, dNTP(2.5 mmol/L) 3 μ l, MgCl₂ (2.5 mol/L) 4 μ l, 上下游引物(5 μ mol/L)各 2 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U, 补充无菌超纯水至 50 μ l。

PCR 反应条件: 96°C 预变性 1 min; 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托生工生物工程(上海)有限公司双向测序。

1.4 数据分析

所得序列通过 Seqman 软件(Burland, 2000)辅助人工进行拼接组装, 获得完整的 mtDNA Cyt *b* 基因。序列集通过 MAFFT v.7(Katoh *et al.*, 2013)在线比对, 并辅以人工校正。采用 DNAsp 5.0(Librado *et al.*, 2009)计算多态位点、单倍型数目、错配分布(Mismatch distribution)、单倍型多样性(Haplotype diversity, H_d)和核苷酸多样性(Nucleotide diversity, P_i)。使用 Network 5 绘制单倍型网络关系图。通过 MrBayes 3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2003)采用贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建单倍型系统进化树。使用 MEGA 6(Tamura *et al.*, 2013)(Kumara2-parameter)计算种群遗传距离, 并通过 Arlequin 3.11(Excoffier *et al.*, 2005)计算种群遗传分化指数(F-statistics, F_{st})并进行分子变异分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)。使用 Beast 1.6 软件包(Drummond *et al.*, 2007)进行贝叶斯天际线(Bayesian skyline plot, BSP)分析, 检测种群变化的历史动态。基于聚类树的拓扑学结构, 使用 RASP 3.0 软件(Yu *et al.*, 2015)重建温州光唇鱼祖先种群起源地, 追溯其原种群。

2 结果与分析

2.1 序列特征和遗传多样性分析

测序获得的 170 条温州光唇鱼 mtDNA Cyt *b* 序列已上传至 NCBI 数据库, 登录号为 MH141624~MH141793。经过同源比对后, 用于下游分析的基因片段全长 1039 bp, 共检测到 69 个突变位点, 突变率 6.6%, 包含简约信息位点(Parsimony-informative sites) 31 个, 单突变位点(Singleton sites) 38 个。序列中 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 27.8%、27.3%、14.8% 和 30.1%, 遵循 A+T>G+C 的规律。编码序列出现了明显的反 G 偏倚(Anti-G bias)现象, 尤其体现在第 3 位密码子 G 的含量(7%)上。Saccone 等(1999)认为这种偏倚现象与线粒体基因组的进化趋势相关, 物种由低等向高等进化过程中, 反 G 偏倚会逐渐弱化, 在

鸟类和哺乳类动物线粒体中 G 的含量达到最高。

温州光唇鱼 6 个群体共 170 条序列定义了 28 个单倍型, 其中, 群体间共享单倍型 9 个, 包含 148 个个体, 占总样本数的 87.06%; 特有单倍型 19 个, 包含 22 个个体, 占总样本数的 12.94%。

各群体的单倍型多样性为 0.308~0.876, 核苷酸多样性为 0.00112~0.00838。其中, BC 群体定义 13 条单倍型, 单倍型多样性最高; NT 群体检测到 38 个多态位点, 核苷酸多样性最高(表 2)。

表 2 温州光唇鱼 6 个群体遗传多样性参数
Tab.2 Population genetic diversity of 6 populations of *A. wenchowensis*

群体 Populations	样本数 Sampling number	单倍型数 Number of haplotypes	多态位点数 Polymorphic sites	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 P_i (%)
BC	30	13	22	0.876	0.635
QZL	30	4	16	0.402	0.328
NT	25	10	38	0.787	0.838
SF	27	5	30	0.396	0.336
BA	28	9	21	0.757	0.594
ZJK	30	5	10	0.308	0.112
整体 Total	170	28	69	0.799	0.631

2.2 群体遗传结构分析

单倍型系统发生分析选择光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)(登录号: KF781289)作为外群, 构建进化树。如图 2 所示, 28 个单倍型形成了 4 个支系, 其中

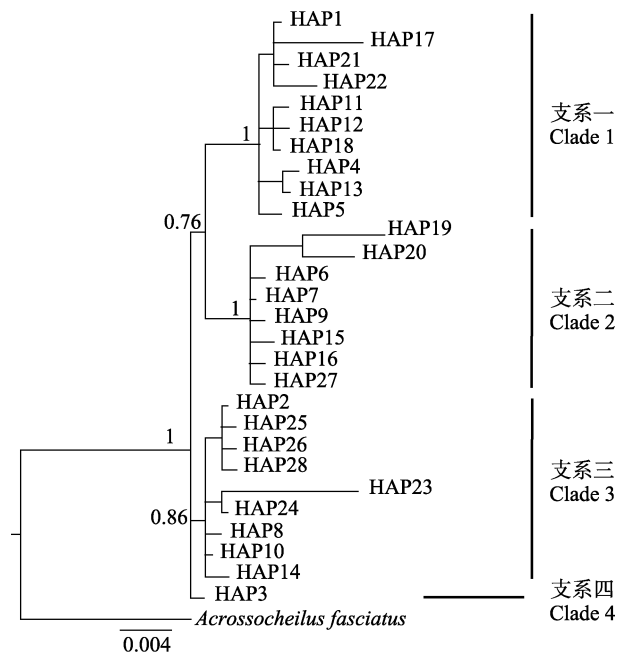


图 2 基于贝叶斯法构建的 28 个单倍型系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree for 28 haplotypes constructed based on BI method

HAP1、4、5、11、12、13、17、18、21、22聚为支系一，HAP6、7、9、15、16、19、20、27聚为支系二，HAP2、8、10、14、23、24、25、26、28聚为支系三，HAP3聚为支系四。

采用中介网络理论(Median joining, MJ)绘制的单倍型网络图中，28个单倍型也形成了4个支系。不同支系内出现了多个主体单倍型(支系一为HAP1，支

系二为HAP7，支系三为HAP2)，其他单倍型呈辐射状环绕在主体单倍型周围(图3)。

将温州光唇鱼6个不同地理种群设定为同一族群，执行AMOVA分析(表3)，估算种群间和种群内个体间变异率。结果表明，新安江温州光唇鱼整体的变异主要来自于群体内，变异比例为66.85%，而种群间的变异仅占33.15%。

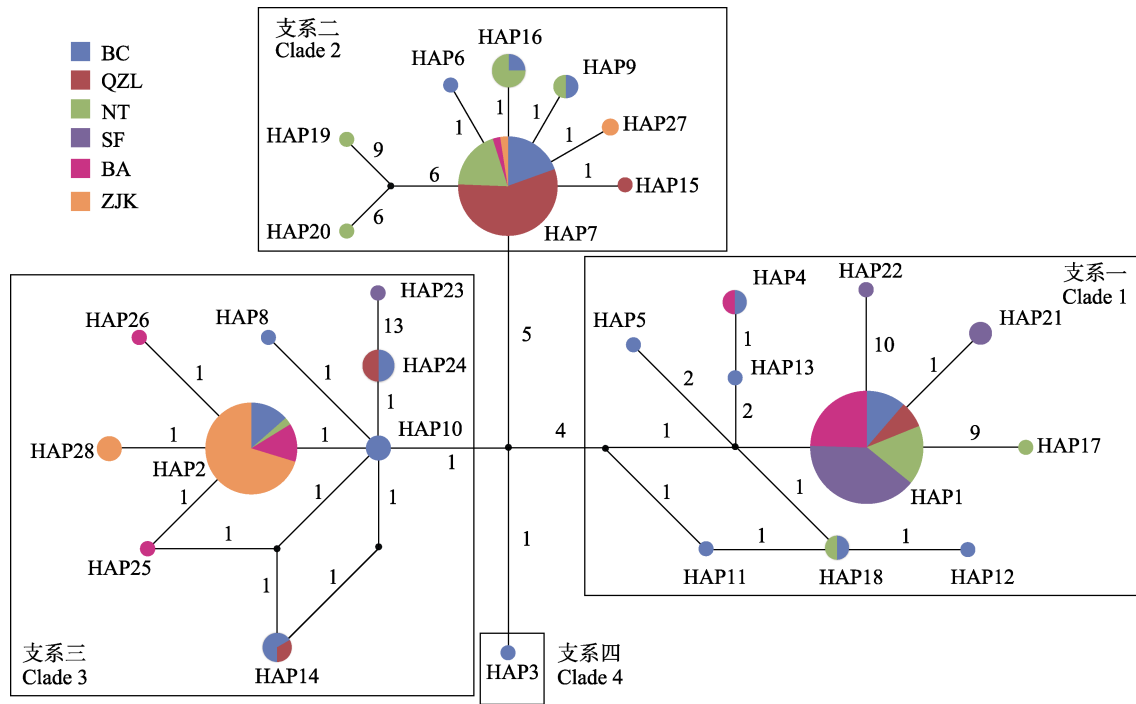


图3 基于中介网络理论构建的单倍型中介网络图

Fig.3 Haplotypes network based on MJ method

线段上的数字代表单倍型间的突变次数，不同的颜色代表不同的群体

The numbers on the lines represents mutation steps; Different colors represents different populations

表3 温州光唇鱼6个群体分子变异分析

Tab.3 AMOVA of 6 populations of *A. wenchowensis*

变异来源 Source of variation	自由度 df	方差组分 Sum of squares	变异比例 Percentage of variation (%)	P 值 P value
群体间 Among population	5	1.27334	33.15	<0.001
群体内 Within population	164	2.56783	66.85	<0.001
总变异 Total	169	3.84117		

表4 群体间遗传分化指数(F_{st})和群体间有效迁徙个体数(N_m)

Tab.4 Pairwise values of F_{st} (below diagonal) and N_m (above diagonal) between populations

	BC	QZL	NT	SF	BA	ZJK
BC		2.16	20.42	1.18	18.46	0.86
QZL	0.188**		3.44	0.32	0.88	0.24
NT	0.024	0.127**		1.66	7.16	0.64
SF	0.297**	0.614**	0.232**		2.82	0.18
BA	0.026	0.363**	0.065*	0.151*		0.64
ZJK	0.366**	0.667**	0.438**	0.733**	0.439**	

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; $N_m = 0.5 \times (1 - F_{st}) / F_{st}$

不同群体间的 F_{st} 值见表4，温州6个地理群体出现了不同程度的分化，其中，SF和ZJK两个群体之间的分化程度最高($F_{st} = 0.73281$)，而BC和NT群体间未检测到明显分化($F_{st} = 0.02389$)。少数群体间存在着不同水平的基因流($N_m > 1$)，6个群体间的平均基因流 $N_m = 2.04$ 。

2.3 群体历史动态

6个群体的中性检验显示 Tajima's D 和 Fu's F_s 为负值，其中 Fu's F_s 结果显著(表5)。基于期望值持续增长模式下的错配分布分析结果显示，曲线呈现单

峰泊松分布, 且实际观测结果与期望的假定模型吻合度较高(图 4)。因此, 认为新安江温州光唇鱼群体可能经过扩张或者仍处于持续增长状态。

表 5 温州光唇鱼群体中性检验和错配分布参数
Tab.5 Neutral test and mismatch distribution of nucleotide of *A. wenchowensis* populations

中性检验 Neutral test		错配分布 Mismatch distribution		
Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>	τ	θ_0	θ_1
-0.627	-24.851**	9.705	0	18.418

** $P < 0.001$

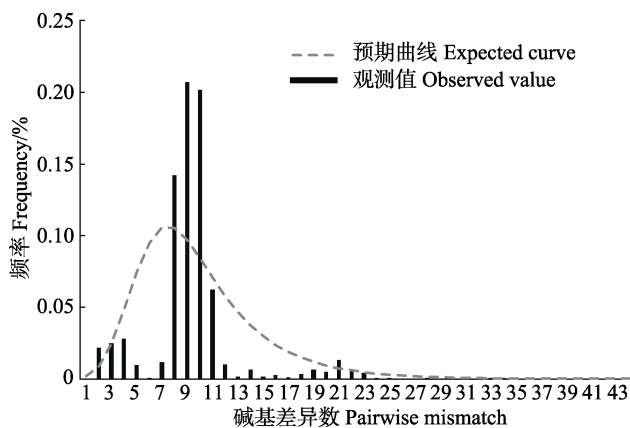


图 4 温州光唇鱼碱基错配分布

Fig.4 Nucleotide mismatch distribution of *A. wenchowensis*

选择 GTR+Gamma 替代模型, 基于宽松分子钟 (Relaxed clock) 理论构建了贝叶斯天际线图来模拟群体变化动态。BSP 结果显示(图 5), 新安江温州光唇鱼 6 个群体发生过扩张事件。由于未见温州光唇鱼 mtDNA Cyt *b* 基因分子进化速率的报道, 研究基于 Gamma 替代模型并辅以选择压估算校正, 估算了温州光唇鱼 mtDNA Cyt *b* 基因位点进化速率 *u* 为 2.87~3.00/百万年。考虑到光唇鱼属于 2 龄性成熟鱼类, 将表 5 中的 τ 值代入公式 $\tau = 2ut$, 推算出新安江温州光唇鱼群体扩张时间约为 335 万年前。

为了追溯该流域光唇鱼群体的扩张历史, 重建其祖先群体的分布情况, 本研究基于贝叶斯二进位法 (Bayesian binary method, BBM) 和分散-隔绝理论 (Statistical dispersal-vicariance method, S-DIVA), 重新构建了温州光唇鱼祖先群体分布地(图 6)。图中上半区是新安江的地图, 按照采集到的群体分布, 将该区域划分成 A~F 六片区域, 分别为 A 率水上游、B 率水下游、C 昌溪、D 休宁河、E 练江、F 锦溪。下半区则是基于 F_{st} 值构建的邻接树(Neighbor joining)拓扑学结构, 进行的祖先起源地重建以及随后的物种区

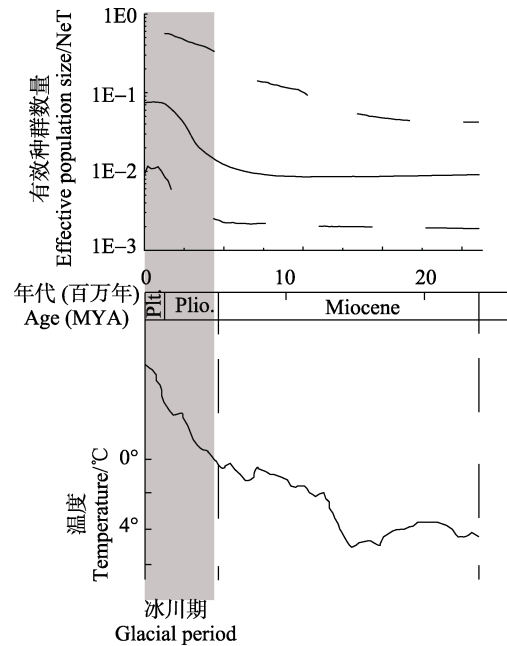


图 5 温州光唇鱼群体历史动态

Fig.5 Historical demography of *A. wenchowensis*

上图为反映温州光唇鱼群体动态的贝叶斯天际线图, 下图为 Zachos(2001)等研究结果的全球温度变化趋势图。

图中阴影部分表示冰川时期

Top plot represents the BSP of 6 populations; bottom plot represents the trend of global temperature change redrawn from Zachos *et al's* results. The shadow zone represents the glacial period

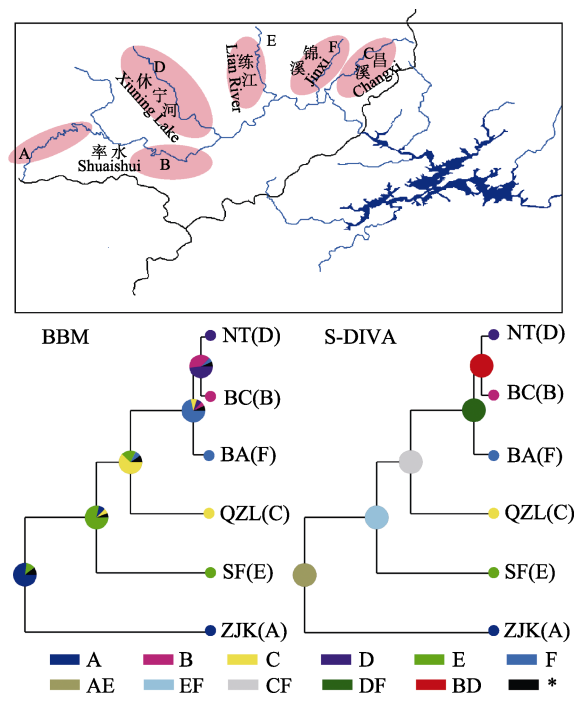


图 6 基于 BBM 和 S-DIVA 理论重建的祖先起源地
Fig.6 The ancestral area reconstruction inferred from BBM and S-DIVA

域进化推测结果。结果显示,新安江水系温州光唇鱼可能起源于率水上游和练江上游,随后群体逐渐扩张,形成现在的分布。

3 讨论

3.1 新安江流域温州光唇鱼群体遗传多样性

遗传多样性是种群适应外界环境、延续物种生存的遗传基础,与种群的扩张、迁徙、选择和分化息息相关(Crawford *et al.*, 2010; Lacy, 1987)。单倍型多样性和核苷酸多样性是评价种群遗传多样性的重要指标,其数值的大小可直观地反映遗传多样性的高低。

新安江流域温州光唇鱼 6 个地理群体的单倍型多样性为 0.799,核苷酸多样性为 0.00631,群体遗传多样性水平较低,这与胡玉婷等(2017)对皖南山区光唇鱼的研究结果相一致。新安江水系较为封闭,与其他水系的光唇鱼物种群体交流较少,加之近年来光唇鱼价格越来越高,当地村民捕鱼热情高涨,温州光唇鱼野生群体数量较少,多种原因造成了该水系温州光唇鱼群体遗传多样性较低的现象。建议该水域的温州光唇鱼资源应以保护为主,科学划定休渔期和禁捕区,对资源量丰富、遗传多样性相对高的群体(BC、NT)可适度开发。

3.2 温州光唇鱼群体遗传分化

新安江流域河流呈现出支流多、蜿蜒盘曲、河道窄、河水浅、河床地质为岩石、水质清澈、河道比降大等特点(王文剑, 2014)。采样过程中,发现光唇鱼分布丰度由一级支流至二级、三级支流呈现显著的增长趋势,这与 Zhu 等(2017)的研究结果相印证。复杂的水系加之季节性的干旱断流和人为建坝的影响,导致了温州光唇鱼出现了栖息地斑块化(Habitat Patch)现象(Erős *et al.*, 2005),不同地理群体间很少有基因交流的机会。因此,在长期遗传漂变的作用下,各个群体分别出现了不同程度的遗传分化。BC 群体采集于多条支流交汇后的水域,个体可能来自上游多个群体,因此,未检测到地理分化,群体个体分布于 4 个进化支系中。

然而, AMOVA 分析结果显示, 6 个地理群体的主要遗传变异仍来自于群体内部,群体间的遗传变异占 33.15%。结合估算的群体扩张时间为 335 万年前,认为新安江温州光唇鱼群体扩张-隔绝-分化事件所处地质年代较新(上新世晚期),群体间隔绝时间较短,较之遗传漂变,基因流在形成群体遗传结构中占主导作用(平均基因流 $N_m=2.04$)。因此,虽然 6 个群体检

测到一定的地理分化,但大多数的分子遗传变异仍来自于群体内个体间。

3.3 新安江温州光唇鱼群体扩张历史

研究表明,多数物种,如鱼类、爬行类,在冰川时期都经历过种群收缩(Zhou *et al.*, 2015; 周伟等, 2017)。由于地表温度过低,物种仅能存活在冰期避难所中,以免灭绝。而处于避难所中的物种,由于温度适宜、资源丰富,往往比冰期后扩张的物种有着更长的群体进化历史。对新安江温州光唇鱼群体历史动态分析暗示,温州光唇鱼于 335 万年前(上新世晚期)发生过群体扩张事件,此时全球处于末次冰川时期的早期(Zachos *et al.*, 2001)。地表温度骤降并未影响到新安江温州光唇鱼群体的扩张。因此,推测新安江流域可能是潜在的冰期避难所。

原种保护一直是保育生物学的重点工作,检测到不同地理群体间的遗传分化,引起了作者对该流域温州光唇鱼原种群鉴定的兴趣。结合温州光唇鱼现有的分布和祖籍地重建分析结果,推测新安江流域温州光唇鱼起源于 ZJK 和 SF 两个种群,即原种群,经过一系列的种群扩散-隔绝-分化事件,形成现今的分布。研究通过广泛采样,采用严格母系遗传的 mtDNA Cyt *b* 基因序列作为分子标记,追溯该物种的起源,鉴定新安江流域温州光唇鱼的原种群,为该物种种群保护的优先级提供理论依据。

参 考 文 献

- Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. Bioinformatics methods and protocols. Humana Press, 2000
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 1987, 325(3): 31-36
- Crawford K, Whitney K. Population genetic diversity influences colonization success. *Molecular Ecology*, 2010, 19(6): 1253-1263
- Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7(1): 214
- Erős T, Grossman G. Effects of within-patch habitat structure and variation on fish assemblage characteristics in the Bernecei stream, Hungary. *Ecology of Freshwater Fish*, 2005, 14(3): 256-266
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (Version 3. 0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, 1(4A): 47-50
- Hu YT, Jiang H, Duan GQ, *et al.* Population genetic structure of *Acrossocheilus wenchowensis* in mountainous area of Southern Anhui Province based on mitochondrial Cyt *b* gene.

- Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(32): 121–126 [胡玉婷, 江河, 段国庆, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的皖南山区温州光唇鱼种群遗传结构. 中国农学通报, 2017, 33(32): 121–126]
- Ji DW, Li MY, Shi YH, *et al.* The nutritional composition and evaluation in muscle of *Acrossocheilus fasciatus*. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(3): 298–300 [冀德伟, 李明月, 史雨红, 等. 光唇鱼的肌肉营养组成与评价. 营养学报, 2009, 31(3): 298–300]
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772–780
- Lacy RC. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. Conservation Biology, 1987, 1(2): 143–158
- Li DM, Li K, Zhang TQ, *et al.* Genetic polymorphism analysis of *Cyrb* and *CO I* gene sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(6): 25–31 [李大命, 李康, 张彤晴, 等. 洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) *Cyrb* 和 *CO I* 基因序列多态性分析. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 25–31]
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452
- Ma CY, Zhao F, Meng YY, *et al.* Phylogenetic relationships of *Pampus* inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 20–26 [马春艳, 赵峰, 孟彦羽, 等. 基于线粒体细胞色素 *b* 基因片段序列变异探讨 3 种鲴属鱼类系统进化. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 20–26]
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MV. Fishes of the world. New York: John Wiley & Sons Press, 2016
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572–1574
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, *et al.* Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. Gene, 1999, 238(1): 195–209
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725–2729
- Wang WJ. Spatial pattern in the structure and diversity of the taxonomic and functional organizations of stream fish in the mountains of southern Anhui. Master's Thesis of Anhui Normal University, 2014 [王文剑. 皖南山区溪流鱼类分类群与功能群结构及其多样性的空间格局. 安徽师范大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(2): 163–173
- Yu Y, Harris AJ, Blair C, *et al.* RASP (reconstruct ancestral state in phylogenies): A tool for historical biogeography. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2015, 87: 46–49
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, *et al.* Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. Science, 2001, 292(5517): 686–693
- Zhang ZS, Hu BJ, Ye XY, *et al.* Genetic diversity of the pregnant schizothoracin (*Schizothorax prenanti*) based on partial mtDNA Cyt *b* sequences. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(3): 609–616 [张争世, 胡冰洁, 叶祥益, 等. 基于 mtDNA Cyt *b* 序列分析齐口裂腹鱼群体遗传多样性. 水生生物学报, 2017, 41(3): 609–616]
- Zhou HX, Jiang Y, Nie LW, *et al.* The historical speciation of *Mauremys* Sensu Lato: Ancestral area reconstruction and interspecific gene flow level assessment provide new insights. PLoS One, 2015, 10(12): e0144711
- Zhou W, Gao TX, Wang J, *et al.* Genetic diversity and structure analysis based on the mitochondrial DNA control region of the northern snakehead (*Channa argus*). Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1521–1532 [周伟, 高天翔, 王俊, 等. 乌鳢群体遗传多样性和遗传结构分析. 水产学报, 2017, 41(10): 1521–1532]
- Zhu R, Li Q, Wang W, *et al.* Effects of local, river-network and catchment factors on fish assemblages in the headwater streams of the Xin'an Basin, China. Journal of Freshwater Ecology, 2017, 32(1): 309–322

(编辑 冯小花)

Population Genetic Analyses of *Acrossocheilus wenchowensis* in Xin'an Basin Based on the Mitochondrial DNA Cytochrome *b* Gene

ZHOU Huaxing^①, HU Yuting, DUAN Guoqing, LING Jun, JIANG He, PAN Tingshuang

(Fisheries Research Institution, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230031)

Abstract In order to clarify the variations in population genetic patterns of *Acrossocheilus wenchowensis* in the Xin'an Basin, 170 individuals from 6 different geographic populations were collected. Subsequent analyses of population genetic structure and historical demography were carried out using the mitochondrial DNA cytochrome *b* (mtDNA cyt *b*) gene. The results suggested that the genetic diversity of different geographic populations varied greatly, and that of *A. wenchowensis* was low. Whereas different levels of genetic differentiation were detected among the 6 populations, molecular genetic variation was mainly detected within populations owing to the short divergence time. Population expansion had occurred approximately 3.35 million years ago, while the global temperature was freezing. The expansion had not been affected by low temperatures. Therefore, the Xin'an Basin may have been a potential refuge during the glacial period. Reconstruction of the ancient area suggested that the Shuaishui and Lian rivers may have been the areas of *A. wenchowensis* origin in the Xin'an Basin. After population diffusion, isolation, and differentiation, the current distribution patterns emerged. The identification of the original population provides a theoretical basis for the conservation of *A. wenchowensis* in the Xin'an Basin.

Key words Xin'an Basin; *Acrossocheilus wenchowensis*; mtDNA Cyt *b*; Population genetic analyses

^① Corresponding author: ZHOU Huaxing, E-mail: hxzhou1987@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180305001

http://www.yykxjz.cn/

王双艳, 王磊, 陈张帆, 崔忠凯, 周茜, 陈松林. 半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 51-57

Wang SY, Wang L, Chen ZF, Cui ZK, Zhou Q, Chen SL. Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 51-57

半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR) 基因的克隆和表达分析*



王双艳^{1,2} 王磊¹ 陈张帆¹ 崔忠凯¹ 周茜¹ 陈松林^{1①}

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

摘要 本研究根据半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)基因组数据库中预测的多聚免疫球蛋白受体(Polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)序列, 通过 PCR 和 RACE 技术获得了半滑舌鳎 pIgR 基因 cDNA, 全长为 1419 bp, 开放阅读框(ORF)为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸, 5'UTR 区域为 109 bp, 3'UTR 区域为 290 bp。保守结构域分析显示, 半滑舌鳎 pIgR 蛋白包含 1 个信号肽, 2 个免疫球蛋白功能域(Ig-like domain, ILD)和 1 个跨膜结构域。经蛋白序列同源比对和系统进化树分析, 发现半滑舌鳎 pIgR 与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)的 pIgR 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析显示, pIgR 基因在健康半滑舌鳎的不同组织中均有表达, 在鳃中表达较高, 在肌肉中表达最低。经哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)病原感染刺激后, pIgR 基因在半滑舌鳎的 5 个组织(肝脏、脾脏、肾脏、肠和鳃)中均呈先上升后下降的趋势, 其中, 在脾脏和鳃中 48 h 达到最高值, 在肝脏、肾脏和肠中 72 h 达到峰值。与内脏组织不同的是, pIgR 基因在皮肤中呈一直上升的趋势。上述结果表明, pIgR 基因在半滑舌鳎抵御哈维氏弧菌的免疫应答中发挥重要作用。

关键词 半滑舌鳎; 多聚免疫球蛋白受体基因; 病原感染; 免疫应答

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0051-07

多聚免疫球蛋白受体 pIgR (Polymeric immunoglobulin receptor)是 I 型跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族的一员, 在动物黏膜相关淋巴组织中结合并介导分泌型抗体跨过上皮细胞进行转运, 经酶切后以复合物的形式分泌到黏膜表面, 抑制病原微生物的粘附和入侵, 在先天性免疫与获得性免疫中均具有重要

作用(Phalipon *et al*, 2003; Kaetzel, 2005)。哺乳动物的 pIgR 蛋白包含 5 个免疫球蛋白功能域(Ig-like domains, ILD), 可以与二聚体 IgA 或者四聚体 IgM 结合, 两栖动物和鸟类的 pIgR 蛋白包含 4 个 ILD, 分别与哺乳动物的第 1、3、4 和 5 个 ILD 同源(Piskurich *et al*, 1995; Wieland *et al*, 2004)。

* 国家自然科学基金项目(31530078)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山卓越人才培养项目(2017ASTCP-OS15)、现代农业产业技术体系(CARS-47-G03)和山东省泰山学者攀登计划专项共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31530078), Aoshan Excellent Talent Training Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-OS15), China Agricultural Research System (CARS-47-G03), and Taishan Scholar Climbing Project, Shandong, China]. 王双艳, E-mail: 190303624@qq.com

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

收稿日期: 2018-03-05, 收修改稿日期: 2018-03-30

目前,在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(Hamuro *et al*, 2007)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Rombout *et al*, 2008)、草鱼(*Ctenopharyodon idellus*)(张毅, 2016)、牙鲆(*Paralichthy solivaceus*)(Xu *et al*, 2013)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Feng *et al*, 2009)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Zhang *et al*, 2010)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(丁冰洁等, 2013)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(Wang *et al*, 2017)等硬骨鱼类中均克隆得到了 *pIgR* 基因。结构分析表明,硬骨鱼 *pIgR* 蛋白仅有 2 个 ILD, 分别与哺乳动物的 ILD1 和 ILD5 同源。因此,研究鱼类 *pIgR* 对于了解生物进化过程具有重要意义。鱼类 *pIgR* 也具有和哺乳动物 *pIgR* 类似的转运功能,显示了生物进化的严谨性和保守性。最新的研究发现,在硬骨鱼中存在一种新型的免疫球蛋白 IgT。对虹鳟的研究发现, *pIgR* 仅能与肠道 IgT 结合,而不能与血液 IgT 结合(Zhang *et al*, 2010),提示硬骨鱼 *pIgR* 的功能仍有很多未知之谜。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水经济养殖鱼类,由于其肉质鲜美滑嫩、营养价值高、生长快速等特点而深受人们喜爱。随着养殖数量的增多,病害的威胁也日趋严重,尤其是细菌引起的溃烂症、肠炎症最为严重,给养殖业带来了巨大的经济损失。同时,半滑舌鲷是一种底栖鱼类,腹部摩擦底面,特别容易受到损伤,在水环境中黏膜包被的皮肤、鳃、肠等是病原侵袭的主要部位,黏膜不仅仅是物理屏障,其局部黏膜的免疫应答对病原体的抵御更加重要。因此,对半滑舌鲷抗病分子机制的研究将会对其病害防治提供重要的理论基础。目前关于 *pIgR* 基因在半滑舌鲷的克隆及功能研究尚未见报道。

本研究对半滑舌鲷的 *pIgR* 基因进行全长 cDNA 克隆并初步分析其结构特征,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术(邢贺飞等, 2016)检测了该基因在半滑舌鲷不同组织中的表达模式和在哈维氏弧菌

(*Vibrio harveyi*)的刺激下不同组织的表达特征,从而为探究 *pIgR* 在半滑舌鲷的免疫应答中的作用机制、开发抗病相关分子标记提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

1.1.1 正常组织 本实验中所用的半滑舌鲷取自山东省海阳市黄海水产公司,18 月龄健康的半滑舌鲷体重为(104.9±4.6) g,全长为(25.8±1.3) cm,体宽为(6.8±0.2) cm。麻醉后,解剖分离肝、脾、肾、头肾、鳃、肠、肌肉、心脏、皮肤等组织,将组织样品迅速放入 RNA 保存液中,置于-20℃冰箱保存。

1.1.2 哈维氏弧菌感染及样品采集 根据半滑舌鲷的感染实验(Wei *et al*, 2017),将 10 月龄健康的半滑舌鲷经腹腔注射哈维氏弧菌感染,在感染后的 12、24、48、72 和 96 h 共 5 个时间点,并以感染前 0 h 作为对照,分别取 3 条半滑舌鲷。将活鱼麻醉后迅速取肝、脾、肠、肾、鳃和皮肤等 6 个免疫组织,放入 RNA 保存液中,置于-20℃冰箱中保存。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 Trizol 法进行半滑舌鲷总 RNA 的提取,用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,并使用 Gene Quant Pro RNA/DNA 分光光度计测定 RNA 浓度。RNA 鉴定合格后,用 cDNA 反转试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。使用 TaKaRa RACE 试剂盒,根据其说明书合成 RACE-Ready-cDNA。

1.3 *pIgR* 基因全长 cDNA 的克隆

1.3.1 中间片段的验证 首先根据半滑舌鲷全基因组测序结果(Chen *et al*, 2014),获得 *pIgR* 基因的部分 cDNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计引

表 1 本研究所用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>pIgR</i> -F	TGGCATTACCAACATCAAGG	验证中间片段
<i>pIgR</i> -R	TCTTGTTTGCATTTTTCCAC	Verifying the internal fragment
<i>pIgR</i> -5'-GSP	TGATGGCGACTGAAGTGTCCCTCGTAGAT	
<i>pIgR</i> -5'-NGSP	CACTGTAGAGACATTCAGCCGT	克隆 5' 和 3' 末端
<i>pIgR</i> -3'-GSP	CGGTGGCAGCGCGTCTGTTC	Cloning the 5' and 3' ends
<i>pIgR</i> -3'-NGSP	CCTGGAACAGTTACGGTCACA	
<i>pIgR</i> -qRT-F	GAGAGATACAGAGACAGCGTGAAGA	定量 PCR
<i>pIgR</i> -qRT-R	GCGACTGAAGTGTCCCTCGTAGA	Real-time PCR
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	
β -actin -R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	

物(pIgR-F/pIgR-R)(表 1), 分别以肠、肾和鳃为模板进行体系为 15 μ l 的普通 PCR 扩增。体系为: Mix 为 7.5 μ l, pIgR-F 为 0.6 μ l, pIgR-R 为 0.6 μ l, ddH₂O 为 5.3 μ l 模板 cDNA 为 1 μ l。程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 为 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 利用胶回收试剂盒(康为世纪)对所需的片段进行收集、纯化, 连接到 pEASY-T1 载体, 转化 Top10 感受态细胞, 涂板后经 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取 3 个阳性克隆送到北京睿博兴科生物技术有限公司(青岛区)测序。

1.3.2 5'和 3' RACE 克隆 根据验证得到的部分 cDNA 序列设计 5'和 3'端的 RACE 引物(pIgR-5'-GSP/pIgR-5'-NGSP 和 pIgR-3'-GSP/pIgR-3'-NGSP)。第一轮反应体系 10 μ l, 根据 TaKaRa TaqTM Hot Start Version 说明书介绍的体系比例加样混合, 进行 Touch down PCR 程序反应。

将第一轮 PCR 反应产物稀释 50 倍后作为第二轮普通 PCR 扩增反应的模板。反应体系为 50 μ l, 同上按比例加样混合后, 进行第二轮普通 PCR 反应。将得到的 PCR 产物根据中间片段验证的方法处理并测序。

1.4 生物学分析及进化树构建

使用生物学软件 DNASTar 对克隆得到的 pIgR 全

长 cDNA 序列进行分析, 预测其开放阅读框(ORF)以及氨基酸序列, 并推导出蛋白的分子量和等电点; 使用 SignalP4.1 对翻译的氨基酸序列进行信号肽分析, 利用 TMpred 预测氨基酸序列跨膜结构域。pIgR 基因同源氨基酸序列的搜索在 NCBI 数据库中通过 Blast 完成并预测功能结构域, 通过 MEGA 7.0 软件完成生物系统进化树构建和氨基酸多序列比对。

1.5 pIgR 基因的表达模式检测

通过使用 qRT-PCR 检测健康的半滑舌鳎不同组织中 pIgR 基因的表达量; 经哈维氏弧菌感染刺激后 6 个不同时间点的肝、肾、脾、肠、鳃和皮肤的表达模式。根据得到的 ORF 序列设计实时荧光定量引物(pIgR-qRT-F/pIgR-qRT-R), 再以 β -actin 基因(β -actin-F/ β -actin-R)(表 1)作为内参基因, 根据 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex TaqTM 说明书的方法进行 pIgR 基因的定量分析。根据测得的 Ct 值, 利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 pIgR 基因相对表达量, 实验得到的数据均采用 SPSS 软件进行方差分析, 设定 P<0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鳎 pIgR 基因序列特征

半滑舌鳎 pIgR 基因的 cDNA 全长为 1419 bp, 其中, ORF 为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸, 5' UTR 为

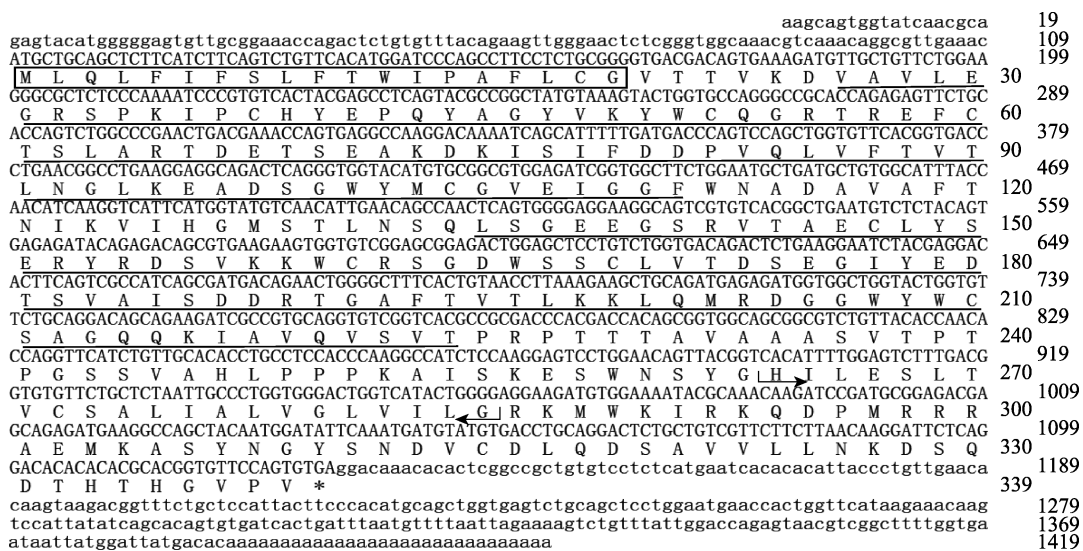


图 1 半滑舌鳎 pIgR 基因 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列
Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *C. semilaepis* pIgR

方框表示信号肽序列为 1~19 号氨基酸, 下划线表示 26~111 号和 135~224 号氨基酸的 2 个 ILD 功能结构域, 箭头区域表示跨膜结构域
The box indicates amino acid residues 1~19 in the signal peptide sequence, two ILD functional domains in amino acids 26~111 and 135~224 are underlined, the arrowhead indicates the transmembrane domain

109 bp, 3' UTR 为 290 bp, 相对分子质量为 37472.76 D, 理论等电点为 6.870。蛋白结构预测结果显示, 在 1~19 aa 之间存在 1 个信号肽序列, 之后为胞外区、跨膜区和胞内区, 分别由 263、22 和 54 个氨基酸组成。胞外区包括 2 个 ILD 功能结构域分别在 26~111 aa 和 135~224 aa 位置(图 1)。

2.2 系统进化树分析及氨基酸多序列比对

将半滑舌鳎 pIgR 的氨基酸序列通过蛋白序列比对在 NCBI 数据库中下载的其他物种: 大菱鲂(*S. maximus*, AGN54539.1)、牙鲆(*P. olivaceus*, ADK91435.1)、红鳍东方鲀(*T. rubripes*, NP_001266944.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, XP_010733629.2)、青鳉

(*Oryzias latipes*, XP_004079170.1)、虹鳟(*O. mykiss*, ADB81776.1)、鲤鱼(*C. carpio*, ADB97624.1)、草鱼(*C. idellus*, ALX37964.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_001289179.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, ABK62772.1)、原鸡(*Gallus gallus*, NP_001038109.1)、鼠(*Mus musculus*, NP_035212.2)、人(*Homo sapiens*, NP_002635.2)的 pIgR 蛋白序列进行分析。多序列氨基酸比对结果显示, 半滑舌鳎 pIgR 与其他硬骨鱼类都只含有 2 个 ILD 区, 分别对应哺乳类的 ILD1 和 ILD5, 哺乳类及鸟类在 ILD1 中存在 3 个互补决定区 (Complementary determining region, CDR), 而硬骨鱼类则没有相似序列(图 2)。系统进化树显示鱼类的 pIgR 聚为一支, 其中, 半滑舌鳎与大菱鲂和牙鲆聚

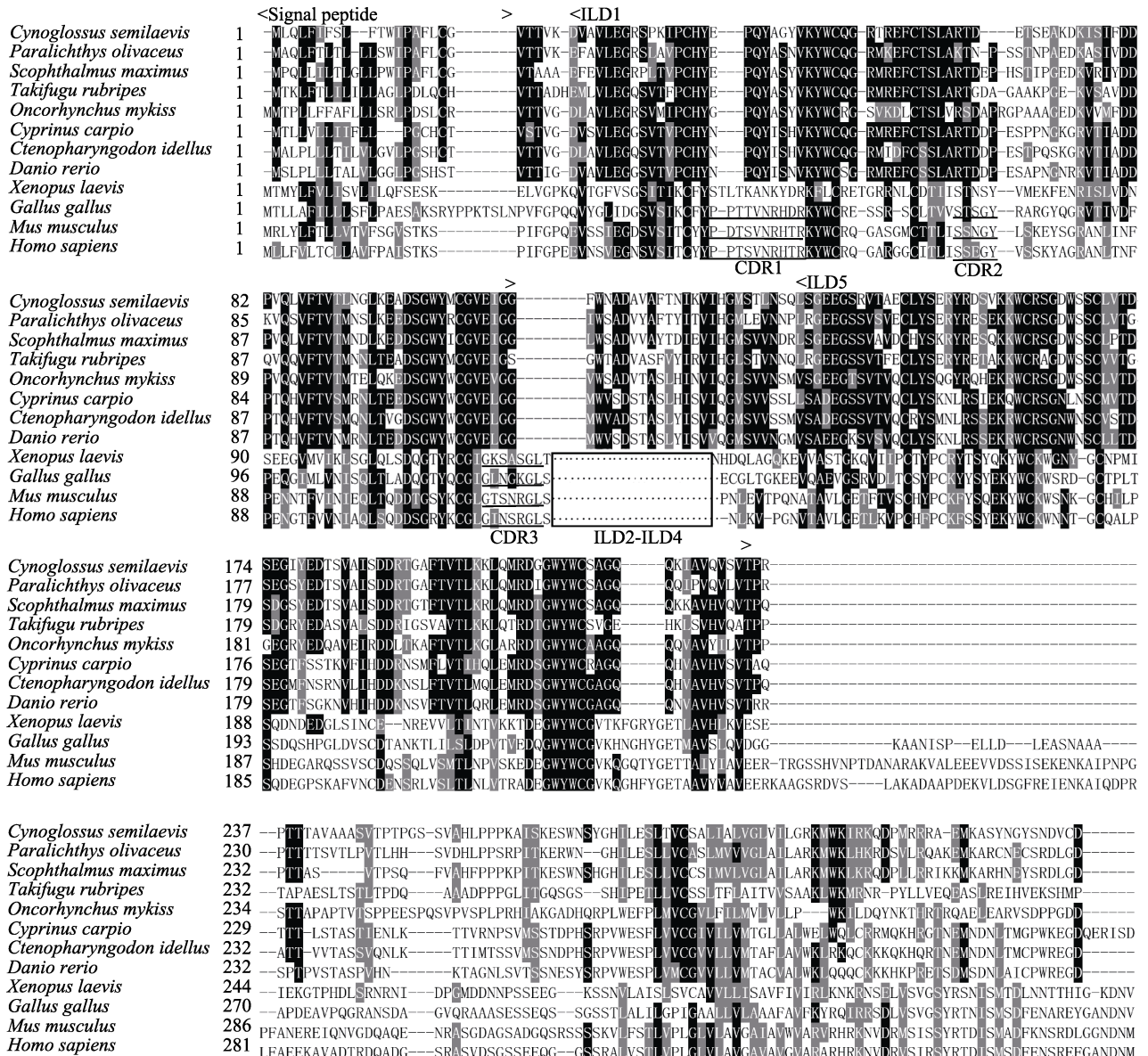


图 2 半滑舌鳎 pIgR 氨基酸多序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of the pIgR amino acid

为一个分支, 3 种淡水鱼(鲤鱼、草鱼和斑马鱼)聚为一个分支; 两栖类、鸟类和哺乳类聚为另一支(图 3)。

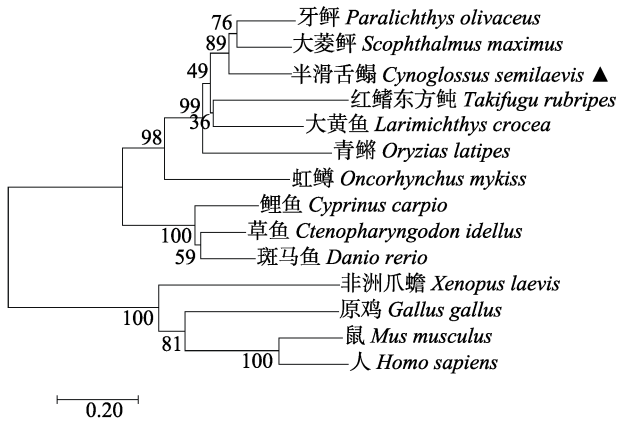


图 3 半滑舌鳎 pIgR 与其他物种 pIgR 系统进化分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of *C. semilaevus* pIgR sequence with other pIgR sequences in fish, amphibians, birds, and mammals

2.3 半滑舌鳎 pIgR 基因的表达模式

2.3.1 pIgR 基因在各组织中的表达 健康组织表达结果显示, pIgR 基因在半滑舌鳎各个组织中均有表达, 在鳃中表达量最高, 其次是心脏、脾脏和皮肤, 在肝脏、头肾和肠中表达量较低, 在肌肉中的表达量最低(图 4)。

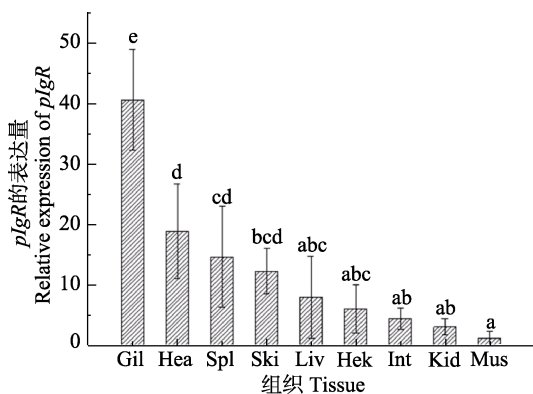


图 4 半滑舌鳎 pIgR 基因在不同组织的表达分布
Fig.4 pIgR gene of *C. semilaevus* expression profile in different tissues

图中“a, b, c, d, e”为 SPSS 软件中

Duncan 算法计算出的子集分组, 下同

Gil: 鳃; Hea: 心脏; Spl: 脾脏; Ski: 皮肤; Liv: 肝脏;

Hek: 头肾; Int: 肠; Kid: 肾脏; Mus: 肌肉

The letters “a, b, c, d, e” were subsets by

Duncan algorithm, the same as below

Gil: Gill; Hea: Heart; Spl: Spleen; Ski: Skin; Liv: Liver;

Hek: Head Kidney; Int: Intestine; Kid: Kidney; Mus: Muscle

2.3.2 哈维氏弧菌感染后 pIgR 基因的表达量的变化

经哈维氏弧菌感染后, 半滑舌鳎内脏和鳃组织中 pIgR 基因的表达模式发生变化。各组织中 pIgR 基因的相对表达量均呈现先增加后减少的趋势, 其中, 鳃和脾脏在 48 h 时出现峰值; 肾脏、肝脏和肠在 72 h 时出现峰值; 皮肤在 96 h 内一直处于上升趋势(图 5)。

3 讨论

本研究通过 PCR 及 RACE 方法成功获得半滑舌鳎 pIgR 基因 cDNA 全长序列, 丰富了对半滑舌鳎免疫相关基因的认识。与硬骨鱼类 pIgR 基因的氨基酸序列进行同源比对分析, 表明 8 种硬骨鱼类都只含有 2 个 ILD, 分别与哺乳动物的 ILD1 和 ILD5 同源。哺乳动物 pIgR 与免疫球蛋白的结合实验证明 ILD1 是受体结合的必需结构(Kaetzel *et al*, 2005)。虽然已有研究证明, 硬骨鱼 pIgR 能够结合 IgM 和 IgT (Feng *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010), 但结合及转运的机制还需要进一步研究。另外, 研究证明, 斑马鱼存在多种 pIgR-like 基因, 在鲤鱼肠道中也发现一种具有 IgM 结合活性的 pIgR-like 蛋白(Kortum *et al*, 2014), 在半滑舌鳎中的研究有待继续开展。

组织表达模式分析发现, pIgR 基因在半滑舌鳎各个组织中均有表达, 其中, 在鳃中表达最高, 在心脏、脾脏和皮肤中表达稍高, 在肌肉中表达最低, 说明 pIgR 特异地在黏膜免疫相关组织中表达。心脏组织样品采集时充盈了血液, 因此 pIgR 表达量较高。本研究结果与牙鲆(Xu *et al*, 2013)、大菱鲆(丁冰洁等, 2013)、斜带石斑鱼(Feng *et al*, 2009)和红鳍东方鲀(Hamuro *et al*, 2007)等基本一致。已有研究证明, 硬骨鱼类 pIgR 基因对细菌和寄生虫的感染均有快速的响应模式。灭活鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)浸泡刺激后, 大菱鲆免疫组织中 pIgR 的相对表达量在 72 h 内均呈现先上升后下降的趋势, 且黏膜相关淋巴组织中的峰值出现最早(丁冰洁等, 2013)。白点虫感染泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的脾脏、肾脏、皮肤和鳃中 pIgR 的表达量均有显著升高(Yu *et al*, 2018)。本研究对哈维氏弧菌感染不同时间, 半滑舌鳎免疫相关组织中 pIgR 基因的表达变化规律进行了检测。在鳃和 4 种内脏组织中 pIgR 基因均呈现先增加后减少的趋势, 其中, 鳃和脾脏 pIgR 的表达量在 48 h 时出现峰值; 肾脏、肝脏和肠中 pIgR 的表达量在 72 h 时出现峰值。然而, 在皮肤中的 pIgR 的表达量在 96 h 内持续上升, 证明皮肤一直处于应答状态, 这可能是因为腹腔注射的哈维氏弧菌经血液循环及组织扩散到

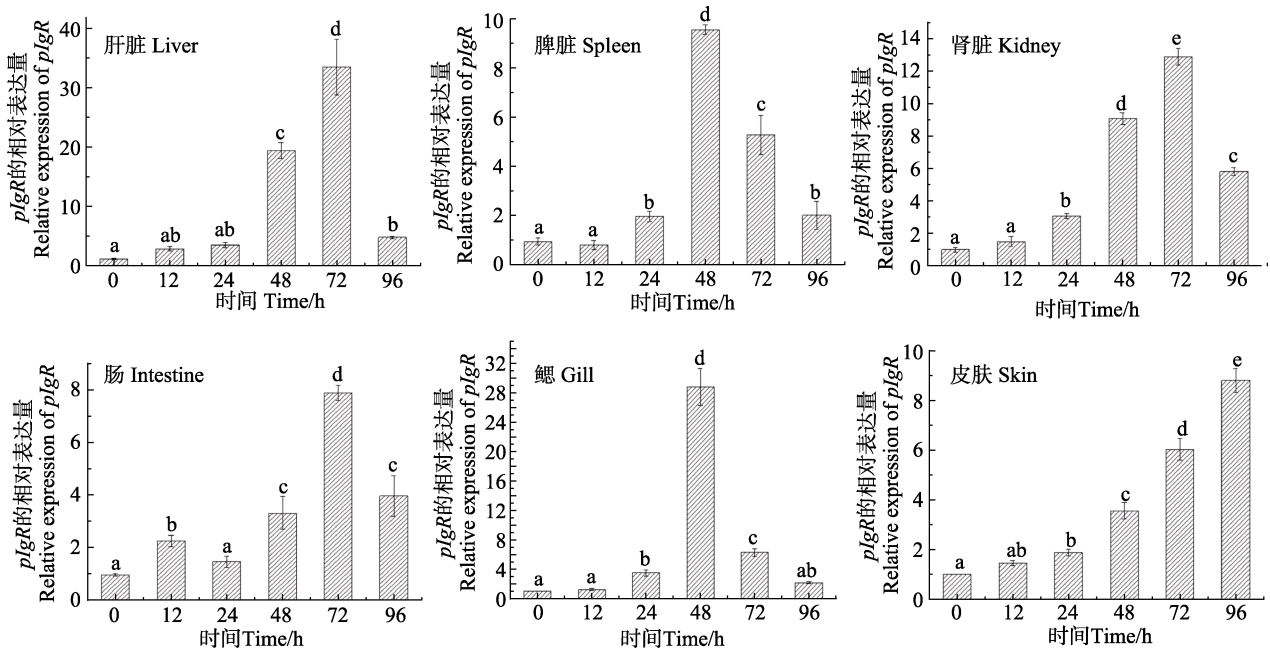


图5 哈维氏弧菌感染后半滑舌鲷 *pIgR* 在免疫组织中表达变化

Fig.5 The expression of *C. semilaevis pIgR* in immunologic tissues after *V. harveyi* infection

皮肤, 导致皮肤溃烂。因此, 皮肤中大量表达 *pIgR*, 发挥持久的免疫防御作用, 提示 *pIgR* 在黏膜免疫防御中发挥重要作用。

综上所述, 本研究对半滑舌鲷 *pIgR* 基因进行了 cDNA 全长克隆、进化分析及表达模式的研究, 尤其是对 *pIgR* 在黏膜免疫防御中的作用进行了深入分析, 为进一步研究 *pIgR* 在免疫应答中的作用机制提供了理论基础。

参 考 文 献

- Chen S, Zhang G, Shao C, *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
- Ding BJ, Sheng XZ, Tang XC, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the *pIgR* gene in *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 178(4): 792–801 [丁冰洁, 绳秀珍, 唐小千, 等. 大菱鲆多聚免疫球蛋白受体基因的克隆及表达分析. *中国水产科学*, 2013, 178(4): 792–801]
- Feng LN, Lu DQ, Bei JX, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(3): 282–289
- Hamuro K, Suetake H, Saha NR, *et al.* A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *Journal of Immunology*, 2007, 178(9): 5682–5689
- Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: Bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 2005, 206(1): 83–99
- Kortum AN, Rodriguez-Nunez I, Yang J, *et al.* Differential expression and ligand binding indicate alternative functions for zebrafish polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) and a family of *pIgR*-like (*PIGRL*) proteins. *Immunogenetics*, 2014, 66(4): 267–279
- Phalipon A, Corthésy B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: Well beyond transport of immunoglobulins. *Trends in Immunology*, 2003, 24(2): 55–58
- Piskurich JF, Blanchard MH, Youngman KR, *et al.* Molecular cloning of the mouse polymeric Ig receptor: Functional regions of the molecule are conserved among five mammalian species. *Journal of Immunology*, 1995, 154(4): 1735
- Rombout JH, Sijm VDT, Yang G, *et al.* Expression of the polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 620–628
- Wang L, Zhang J, Kong X, *et al.* Molecular characterization of polymeric immunoglobulin receptor and expression response to *Aeromonas hydrophila* challenge in *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 372–380
- Wei M, Xu WT, Li HL, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a novel r-spondin member (*rspo21*) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 72: 436–442
- Wieland WH, Orzáez D, Lammers A, *et al.* A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal*, 2004, 380(3): 669–676
- Xing HF, Gao FT, Zhang YZ, *et al.* Molecular cloning, expression and SNP Screening of natural resistance-

- associated macrophage protein (*Nramp*) gene cDNA from half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(4): 116–127 [邢贺飞, 高峰涛, 张永珍, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因克隆与表达分析及 SNP 筛选. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 116–127]
- Xu G, Zhan W, Ding B, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of polymeric immunoglobulin receptor in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 653–660
- Yu Y, Liu Y, Li H, *et al.* Polymeric immunoglobulin receptor in dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): Molecular characterization and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 175–184
- Zhang Y. Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Gene cloning, expression analysis and binding activity with IgM. Doctoral Dissertation of Henan Normal University, 2016 [张毅. 草鱼 pIgR 基因克隆表达及与 IgM 结合活性的研究. 河南师范大学博士研究生学位论文, 2016]
- Zhang YA, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 827

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of the Polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) Gene in the Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Shuangyan^{1,2}, WANG Lei¹, CHEN Zhangfan¹,
CUI Zhongkai¹, ZHOU Qian¹, CHEN Songlin^{1①}

(1. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, 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, the full-length cDNA sequence of the polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) gene of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) was obtained on the basis of its predicted sequence. The cDNA sequence was 1419 bp and included an open reading frame (1020 bp, encoding 339 amino acids), a 5'-UTR region (109 bp), and a 3'-UTR region (290 bp). Conserved domain analysis revealed that the pIgR protein of the half-smooth tongue sole contained one signal peptide, two immunoglobulin-like domains, and one transmembrane domain. According to the protein sequence homology alignment and phylogenetic tree analysis, the *pIgR* sequence of the half-smooth tongue sole had high similarity with the turbot (*Scophthalmus maximus*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) pIgR sequences. Real-time PCR analysis of *pIgR* expression in different tissues of healthy half-smooth tongue sole showed that the highest expression was in the gill and the lowest expression in muscles. After pathogen challenge with *Vibrio harveyi*, *pIgR* expression initially increased and then decreased in five tissues (liver, spleen, kidney, intestine, and gill) of the half-smooth tongue sole, with the peak time point being at 48 h in the spleen and gill, and 72 h in the liver, kidney, and intestine. Unlike in the internal organs, *pIgR* expression in the skin was continually upregulated. These results indicate that *pIgR* is involved in the immune response of the half-smooth tongue sole toward bacterial pathogens, and this finding may contribute to the discovery of an antibacterial gene marker.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene; Pathogen challenge; Immune response

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180306001

http://www.yykxjz.cn/

范耘硕, 邵蓬, 贾旭颖, 高金伟, 窦勇, 史谢尧, 周文礼. 温度胁迫对大鳞副泥鳅抗氧化与非特异性免疫指标的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 58-64

Fan YS, Shao P, Jia XY, Gao JW, Dou Y, Shi XY, Zhou WL. Effects of temperature stress on partial antioxidant and non-specific immunity indices of *Paramisgurnus dabryanus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 58-64

温度胁迫对大鳞副泥鳅抗氧化与非特异性免疫指标的影响*



范耘硕 邵蓬^① 贾旭颖 高金伟 窦勇 史谢尧 周文礼

(天津市水产生态与养殖重点实验室 天津农学院水产学院 天津 300384)

摘要 为研究大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)对温度胁迫的适应能力,开展了温度胁迫与恢复实验。设置对照组(22℃)、高温组(29℃)、降温组(15℃)与低温组(8℃)4个处理,在胁迫期的第1、2、4、8、12 h与恢复期第4、8、12、24 h取肝脏,测定其超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、溶菌酶(LZM)、碱性磷酸酶(AKP)活力和丙二醛(MDA)、血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量。结果显示,胁迫期内肝脏SOD和CAT活力均在温度骤变的影响下受到抑制,显著低于对照组水平($P<0.05$),MDA含量则显著升高($P<0.05$);恢复期内各实验组SOD和CAT活力均逐渐升高,MDA含量逐渐降低,至恢复期结束时,对照组与各实验组间无显著差异($P>0.05$)。温度骤变条件下,各实验组肝脏LZM与AKP活力显著降低($P<0.05$),恢复期内高温组LZM与AKP活力无明显变化,降温组与低温组LZM与AKP活力则逐渐升高,至恢复期结束时与对照组无显著差异($P>0.05$)。温度胁迫显著升高血清中AST与ALT含量($P<0.05$),恢复期内各实验组AST与ALT含量均呈下降趋势,至恢复期结束时,除高温组ALT含量外均降至对照组水平。研究表明,温度胁迫显著降低大鳞副泥鳅SOD、CAT、LZM与AKP活力,MDA与血清转氨酶AST、ALT含量升高,其中,高温胁迫会对大鳞副泥鳅非特异性免疫机能造成不可逆破坏,其他抑制均为可恢复的。

关键词 大鳞副泥鳅; 温度胁迫; 温度恢复; 抗氧化性能; 非特异性免疫

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)02-0058-07

水产动物在养殖与运输过程中会受到多种胁迫因子的影响。机体在胁迫作用下的应激反应分为三级(Wendelaar Bonga, 1997),其中,主要应激反应包括儿茶酚胺和皮质醇循环水平的增加;继发性应激反应由主要反应引起,包括能量调动的增加,主要表现为高血糖和脂质代谢量的上升,为应对胁迫提供了必要

的能量。其他继发性应激反应与体内渗透压及心血管、呼吸和免疫功能有关(Barton, 2002)。而主要应激反应与继发性应激反应可能会引起影响鱼体机能的三级应激反应,如生长性能、繁殖能力和存活率等(Schreck, 2010)。温度胁迫是水产养殖过程中重要的胁迫因子之一,鱼类对水温变化的响应主要表现为摄

* 天津市科技计划项目(15ZXBFNC00120; 16ZXZYNC00080; 17ZXBFNC00130)和天津市高等学校“创新团队培养计划”现代水产生态健康养殖(TD13-5089)共同资助[This work was supported by Tianjin Science and Technology Plan Projects (15ZXBFNC00120; 16ZXZYNC00080; 17ZXBFNC00130) and Modern Aqua-Ecology and Health Aquaculture Innovation Team of Tianjing (TD13-5089)]. 范耘硕, E-mail: 1243437314@qq.com

① 通讯作者: 邵蓬, 高级工程师, E-mail: vipshaopeng@sohu.com

收稿日期: 2018-03-06, 收修改稿日期: 2018-03-28

食量、生长周期、繁殖率和存活率等生理生化指标的变化(李勇等, 2011)。抗氧化酶通常存在于好氧生物的各种组织中, 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)是水生动物的抗氧化因子, 可以除去体内过量的活性氧自由基(成艳波等, 2017)。抗氧化酶活力直接受温度调控, 环境温度过高或过低会导致抗氧化酶活力下降(刘峰等, 2016; 罗伟等, 2017)。非特异性免疫是鱼类免疫反应的主要机制, 溶菌酶(Lysozyme, LZM)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)是这一过程中的 2 个关键酶(薛宝贵等, 2013)。温度也是刺激鱼类非特异性免疫机能变化的主要环境因素之一, 当环境温度低于鱼类最适水温时, 鱼体的免疫反应通常会降低或延迟, 而过高的水温则会造造成与免疫相关酶活力的丧失, 影响鱼类正常的免疫应答反应(Raida *et al.*, 2007; Bowden, 2008)。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)为鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、副泥鳅属(*Paramisgurnus*), 属温水性鱼类, 具有口感风味佳, 营养价值高, 生长速度快, 环境耐受力强等特点, 已成为东亚地区, 特别是中国和韩国重要的淡水养殖品种之一(You *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015)。目前, 关于温度胁迫对水产动物影响的研究多见于常见或名贵水产经济动物, 而关于温度胁迫对大鳞副泥鳅的研究较少。本研究以大鳞副泥鳅为研究对象, 通过对实验鱼进行 4 种温度下 12 h 的胁迫实验及 24 h 的恢复实验, 测定肝脏和血清中部分抗氧化与非特异性免疫指标的变化, 以期为评价大鳞副泥鳅对环境变化的适应能力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼与饲养管理

实验用鱼由天津鸿腾水产科技发展有限公司提供, 体重为(38.20±3.70) g, 体长为(19.3±2.8) cm。实验用鱼运回实验室后, 暂养 7 d, 暂养水温为 22℃。实验开始前, 选取大小均匀、体格健壮、活力较强的个体, 禁食 24 h 后用于实验。实验分为胁迫期与恢复期, 实验共 36 h, 其中, 胁迫期为 12 h, 分为 4 个处理, 分别标记为对照组、高温组、降温组和低温组, 对应水温分别为 22℃、29℃、15℃和 8℃, 每个处理设 3 个平行, 每个平行使用 60 L 玻璃水槽养殖容器, 每个水槽中随机放 60 尾鱼。使用加热棒和制冷循环水机控制温度, 各水槽温度误差为±0.5℃, 每 20 min 检测 1 次水温; 恢复期为 24 h, 各处理水温快速调整

至(22±0.5)℃。实验用水为曝气 48 h 的自来水, 实验期间使用气泵充气, 水体 pH 为 8.5~8.0, 溶解氧为 6.1~7.3 mg/L, 总 NH₄⁺-N 浓度为 0.2~0.3 mg/L。

1.2 样品采集

在胁迫期的第 1、2、4、8、12 h 及恢复期的第 4、8、12、24 h(以 r-4、r-8、r-12 和 r-24 h 表示)分别取血清和肝脏样品, 每次随机从各槽中取出 5 尾实验鱼, 使用 MS-222 (0.5 mg/L)麻醉后, 进行尾静脉取血, 将取出的血液转入 1.5 ml 离心管后, 4℃静置 2 h, 4℃条件下, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 转入-80℃超低温冰箱保存; 取血后, 在冰盘上解剖实验鱼, 取肝脏, 用 4℃去离子水冲洗, 并按 1:9(W/V)加入预冷生理盐水(4℃, 0.86%), 使用玻璃匀浆器在冰水浴中匀浆, 制成 10%组织匀浆液, 4℃条件下 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 转入-80℃超低温冰箱保存。

1.3 实验指标测定

实验鱼肝脏样品中的 CAT、SOD、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、LZM 及 AKP 分别采用南京建成生物工程研究所提供的 A007-2 过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)、A001-1 总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(羟胺法)、A003-1 丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)、A050-1 溶菌酶(LZM)检测试剂盒(比浊法)以及 A059-1 碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(可见光比色法)进行测定, 测定仪器为 SHIMADZU 紫外 UVmini-1240 可见分光光度计, Thermo Scientific Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(多功能酶标仪); 血清谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)含量使用东芝 TBA-120FR 全自动生化分析仪进行测定; 使用考马斯亮蓝 G250 染料结合法测定总蛋白质含量(Bradford, 1976)。

1.4 实验数据处理

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 IBM SPSS 21.0 对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 多重比较, 设定 P 值为 0.05, P<0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏抗氧化相关指标的影响

实验期间, 对照组 SOD 活力基本稳定。温度胁迫显著降低肝脏 SOD 活力(P<0.05), 至胁迫期结束

(12 h), 各实验组 SOD 活力均显著低于对照组 ($P<0.05$), 其中, 高温组 SOD 活力最低, 显著低于其他处理组 ($P<0.05$)。恢复期内, 各实验组 SOD 活力均逐渐升高, 至恢复期结束时(r-24 h), 各实验组 SOD 活力基本恢复至对照组水平 ($P>0.05$) (图 1)。对照组 CAT 活力在实验期间基本稳定。温度胁迫显著降低肝脏 CAT 活力 ($P<0.05$), 至胁迫期结束(12 h), 各实验组 CAT 活力均显著低于对照组 ($P<0.05$), 其中, 高温组显著高于降温组与低温组 ($P<0.05$)。恢复期内, 各实验组 CAT 活力均逐渐升高, 至恢复期结束时(r-24 h), 各实验组 CAT 活力基本恢复至对照组水平 ($P>0.05$) (图 2)。对照组 MDA 含量在实验期间基本稳定。温度胁迫显著升高肝脏 MDA 含量 ($P<0.05$), 至胁迫期结束(12 h), 各实验组 MDA 含量均显著高于对照组 ($P<0.05$), 其中, 低温组显著高于高温组 ($P<0.05$)。恢复期内, 各实验组 MDA 均逐渐下降, 至恢复期结束时(r-24 h), 各实验组 MDA 含量基本恢复至对照组水平 ($P>0.05$) (图 3)。

2.2 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 LZM 与 AKP 活力的影响

实验期间, 对照组 LZM 活力基本稳定。温度胁迫显著降低肝脏 LZM 活力 ($P<0.05$), 至胁迫期结束(12 h), 各实验组 LZM 活力均显著低于对照组 ($P<0.05$)。恢复期内, 高温组 LZM 活力基本稳定, 降温组与低温组逐渐升高, 至恢复期结束时(r-24 h), 高温组 LZM 活力显著低于其他各组 ($P<0.05$), 降温组与

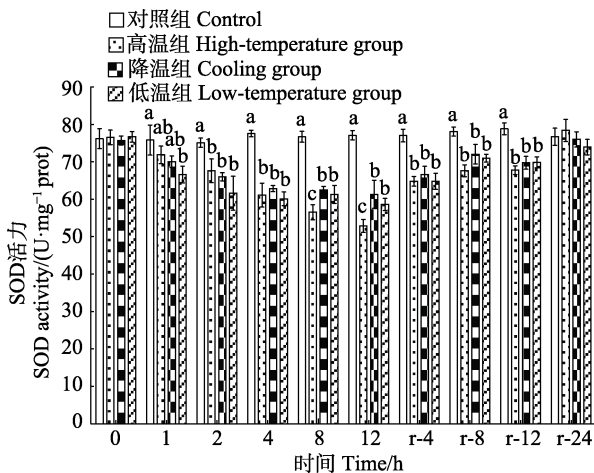


图1 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 SOD 活力的影响
Fig.1 Effects of temperature stress on SOD activity of *P. dabryanus*

不同字母表示在同一时间点, 各实验组之间差异显著 ($P<0.05$), 下同

Different letters represent significant differences ($P<0.05$).
The same as below

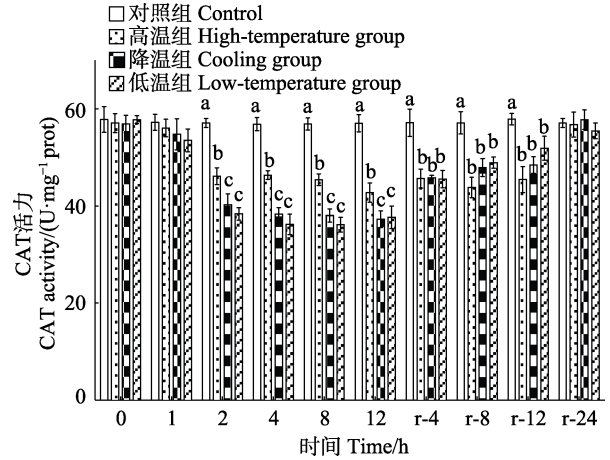


图2 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 CAT 活力的影响
Fig.2 Effects of temperature stress on CAT activity of *P. dabryanus*

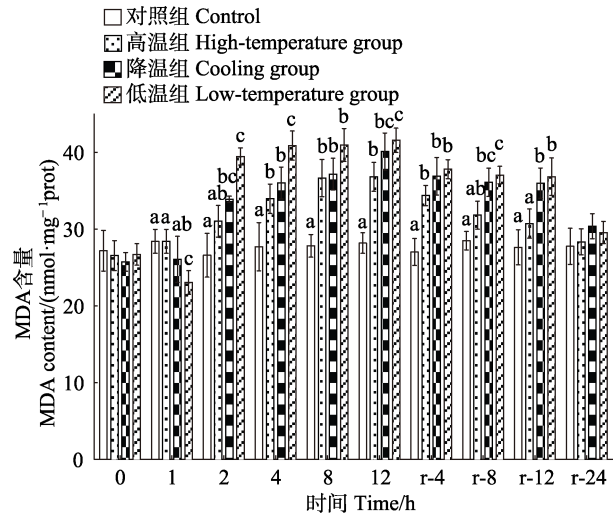


图3 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 MDA 含量的影响
Fig.3 Effects of temperature stress on MDA content of *P. dabryanus*

低温组基本恢复至对照组水平 ($P>0.05$) (图 4)。对照组 AKP 活力在实验期间基本稳定。温度胁迫显著降低肝脏 AKP 活力 ($P<0.05$), 至胁迫期结束(12 h), 各实验组 AKP 活力均显著低于对照组 ($P<0.05$)。恢复期内, 高温组 AKP 活力基本稳定, 降温组与低温组逐渐升高, 至恢复期结束时(r-24 h), 高温组 AKP 活力显著低于其他各组 ($P<0.05$), 降温组与低温组基本恢复至对照组水平 ($P>0.05$) (图 5)。

2.3 温度胁迫对大鳞副泥鳅血清转氨酶含量的影响

实验期间, 对照组 AST 含量基本稳定。温度胁迫显著升高肝脏 AST 含量 ($P<0.05$), 至胁迫期结束(12 h), 各实验组 AST 含量均显著高于对照组 ($P<0.05$)。恢复期内, 各实验组 AST 含量均呈先升高后下降的趋势, 至恢复期结束时(r-24 h), 各实验组 AST

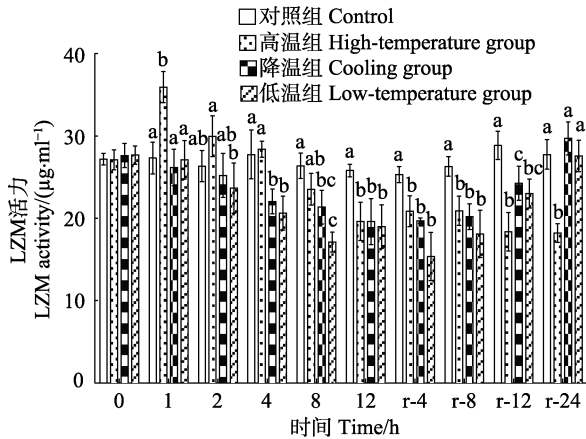


图 4 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 LZM 活力的影响
Fig.4 Effects of temperature stress on LZM activity of *P. dabryanus*

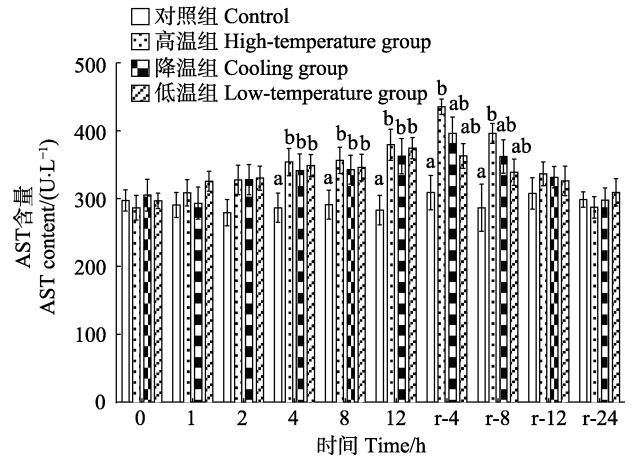


图 6 温度胁迫对大鳞副泥鳅血清 AST 含量的影响
Fig.6 Effects of temperature stress on AST content of *P. dabryanus*

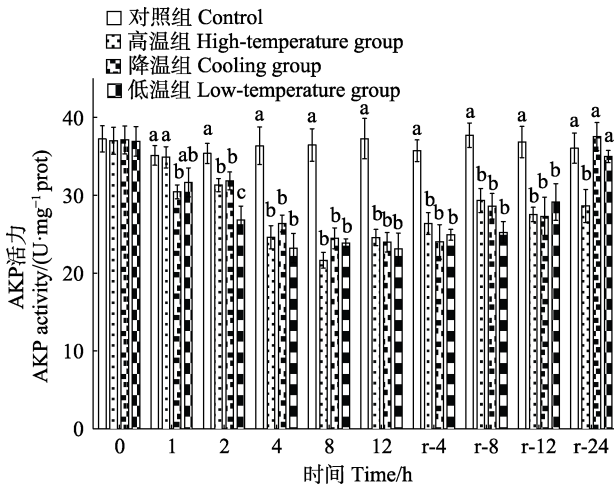


图 5 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 AKP 活力的影响
Fig.5 Effects of temperature stress on AKP activity of *P. dabryanus*

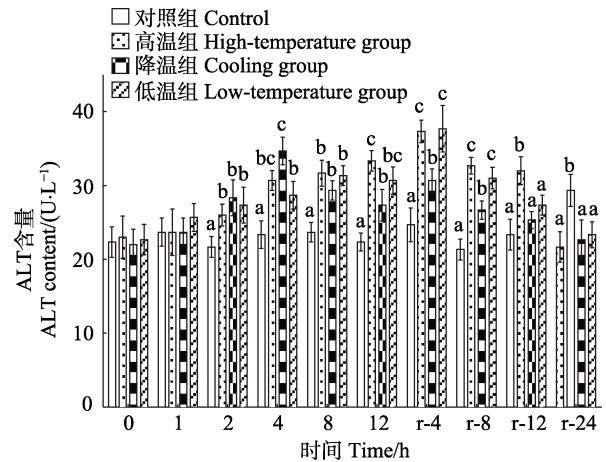


图 7 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏 ALT 含量的影响
Fig.7 Effects of temperature stress on ALT content of *P. dabryanus*

含量基本恢复至对照组水平($P>0.05$) (图 6)。对照组 ALT 含量在实验期间基本稳定。温度胁迫显著升高血清 ALT 含量($P<0.05$)，至胁迫期结束(12 h)，各实验组 ALT 含量均显著高于对照组($P<0.05$)，其中高温组显著高于降温组。恢复期内，各实验组 ALT 含量均呈先升高后下降的趋势，至恢复期结束时(r-24 h)，高温组 ALT 活力显著高于其他各组($P<0.05$)，降温组与低温组基本恢复至对照组水平($P>0.05$) (图 7)。

3 讨论

3.1 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏抗氧化指标相关酶活力的影响

应激可以通过细胞色素 C 氧化酶复合物功能增加肝细胞色素 P450 产生活性氧自由基的能力(Kato, 1977)，而过量的自由基会导致肝脏损伤。SOD 通过

去除自由基来平衡氧化和抗氧化过程，从而防止细胞损伤；CAT 催化 H_2O_2 分解为氧和水，阻断高活力羟基自由基反应，并阻止 H_2O_2 的毒性细胞效应(van der Oost *et al*, 2003; Gül *et al*, 2004)。而作为脂质过氧化的最终产物，MDA 浓度是反映体内氧自由基数量的重要指标(Mourete *et al*, 1999)。研究表明，温度胁迫会对影响鱼类抗氧化系统造成影响。对石斑鱼杂交后代(*Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂)的研究发现，低温胁迫会使实验鱼 CAT 活力呈现波动性变化，导致幼鱼免疫力和抗氧化能力下降(邵彦翔等, 2017)。谢明媚等(2015)在银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼的急性温度胁迫研究中发现，急性温度胁迫会在一定程度上引起实验鱼肝脏的损伤，并对其抗氧化能力和免疫应答反应产生影响。彭婷等(2012)对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的低温胁迫研究发现，随着温

度降低,罗非鱼的生化、免疫及抗氧化指标均发生显著变化,由此可能导致罗非鱼在低温胁迫后出现昏迷及死亡等异常状况。潘桂平等(2016)对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)幼鱼的研究发现,低温胁迫对云纹石斑鱼幼鱼抗氧化和免疫性能影响显著,低温胁迫导致该鱼体内的MDA含量升高,因而肝脏合成更多的抗氧化物质来进行抗氧化防御。本研究中,实验鱼肝脏CAT与SOD活力随着温度胁迫的进行与对照组相比呈现出逐渐降低的趋势,至胁迫期结束,各实验组均显著低于对照组,MDA含量在温度胁迫过程中持续升高,至胁迫期结束各实验组均与对照组差异显著,表明在温度骤变的条件下,实验鱼抗氧化酶活力会受到显著抑制,抗氧化能力减弱。而进入恢复期,各实验组CAT与SOD活力均逐渐提高,MDA含量逐渐降低,至恢复期结束时与对照组不存在显著差异,则表明当温度恢复后,本实验温度骤变范围对大鳞副泥鳅肝脏抗氧化酶活力的抑制是可恢复的,可以认为实验条件下的温度骤变不会造成大鳞副泥鳅永久性肝损伤。

3.2 温度胁迫对大鳞副泥鳅肝脏LZM与AKP活力的影响

LZM在鱼类的体液、血清和巨噬细胞中普遍存在,是吞噬细胞杀菌的物质基础,具有溶解细菌作用(殷海成等,2014)。LZM主要针对革兰氏阳性菌,但也影响一些革兰氏阴性菌,如肠道沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),其具有抗感染、抗肿瘤、抗病毒以及增强抗生素的功能,起到防御病原体的重要作用(Saurabh *et al*, 2008; Jung *et al*, 2012)。AKP是一种磷酸单酯水解酶,特异性低,起到解毒剂的作用,它在水中溶解生成乙醇和磷酸,因此,是鱼类生物健康的重要标志(Hoseinifar *et al*, 2015)。研究认为,温度胁迫会对鱼类非特异性免疫机能产生影响。低温胁迫下,河豚(*Takifugu obscurus*)血浆蛋白和AKP等生化指标显著下降,诱导抗氧化酶、HSP90和C3的基因表达,表明其免疫系统会受到低温胁迫的影响(Cheng *et al*, 2017)。对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼的研究表明,温度胁迫下实验鱼血清LZM与AKP活力在实验期内,基本呈先上升后下降的变化趋势,认为温度胁迫显著改变罗非鱼幼鱼的非特异性免疫能力(强俊等,2012)。低温胁迫下,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)血清的AKP活力显著降低,并在48h的恢复期内维持在较低水平,而高温胁迫下,AKP活力相比对照组略有降低(管标等,2014)。本研

究中,实验鱼肝脏LZM与AKP活力在胁迫期均受到温度骤变的影响,至胁迫期结束时,各实验组均显著低于对照组,表明温度骤变显著降低肝脏LZM与AKP活力,减弱机体非特异性免疫功能;进入恢复期,高温组LZM与AKP活力基本停留在胁迫结束时的水平,至恢复期结束时仍显著低于对照组,而降温组与低温组LZM与AKP活力则持续升高,至恢复期结束时,基本恢复至对照组水平,表明高温胁迫会对大鳞副泥鳅非特异性免疫机能造成不可逆的破坏,而低温胁迫对大鳞副泥鳅非特异性免疫机能的抑制是可恢复的,实验条件下不会造成永久性破坏。

3.3 温度胁迫对大鳞副泥鳅血清转氨酶的影响

正常情况下,AST和ALT在包括肝脏在内的许多器官中普遍存在,当机体由于应激反应或发生病变时,细胞膜通透性发生变化,在浓度差作用下导致细胞内的AST和ALT释放到血液中,引起血清中的ALT和AST含量升高(孙学亮等,2010)。因此,检测血清中AST和ALT水平的变化,可以反映细胞膜通透性的变化,并判断肝脏等组织是否发生病变(Lemaire *et al*, 1991; Lee, 2001)。本研究中,温度胁迫显著升高实验鱼血清的AST与ATL含量表明温度骤变会引起实验鱼细胞膜通透性的变化,肝脏细胞的凋亡速度或数量增加使转氨酶进入血液;进入恢复期,各实验组AST与ALT含量均呈下降趋势,至恢复期结束时,各实验组AST含量基本恢复到对照组水平,而ALT含量上则在降温组与低温组基本恢复至对照组水平,高温组则仍显著高于对照组。高温条件会引起大鳞副泥鳅血液ALT含量升高,造成不可逆的破坏,而低温条件对大鳞副泥鳅血液转氨酶含量的影响是可恢复的,实验条件下不会对机体肝细胞机能造成永久性破坏。

4 结论

在实验条件下,连续12h的温度胁迫会显著抑制大鳞副泥鳅抗氧化能力与非特异性免疫能力,且在高温条件下对其非特异性免疫相关酶活力造成持续抑制,大鳞副泥鳅对低温条件的耐受能力较强,在实际生产中应避免高温。

参 考 文 献

- Barton BA. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42(3): 517-525
- Bowden TJ. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(4):

- 373–383
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1–2): 248–254
- Cheng CH, Ye CX, Guo ZX, *et al.* Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 64: 137–145
- Cheng YB, Zhang XY, Dong YZ, *et al.* Effects of dietary replacement of fish meal and soy protein by wheat gluten on plasma biochemical indices and liver anti-oxidative indices of *Nibea japonica* and *Sparus macrocephalus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 106–114 [成艳波, 张月星, 董智勇, 等. 小麦蛋白替代鱼粉及大豆蛋白对日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 106–114]
- Guan B, Wen HS, Liu Q, *et al.* Effects of acute temperature stress on metabolic enzyme activity and gene expression related to growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 566–571 [管标, 温海深, 刘群, 等. 急性温度胁迫对虹鳟肝脏代谢酶活力及生长相关基因表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(6): 566–571]
- Gül S, Belge-Kurutas E, Yildiz E, *et al.* Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*, 2004, 30(5): 605–609
- Hoseinifar SH, Roosta Z, Hajimoradloo A, *et al.* The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 533–538
- Jung TS, del Castillo CS, Javaregowda PK, *et al.* Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 295–301
- Kato R. Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. *Xenobiotica*, 1977, 7(1–2): 25–92
- Lee SM. Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture Research*, 2001, 32 (S1): 8–17
- Lemaire P, Drai P, Mathieu A, *et al.* Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 1991, 93(1): 63–75
- Li Y, Sun GX, Liu Y, *et al.* Effects of temperature on feed intake, growth and digestive enzyme activity of turbot *Scophthalmus maximus* L. in high stocking density of closed recirculation aquaculture system. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(6): 17–24 [李勇, 孙国祥, 柳阳, 等. 温度对高密度循环海水养殖大菱鲆摄食、生长及消化酶的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(6): 17–24]
- Liu F, Liu YY, Lou B, *et al.* Effect of water temperature on antioxidant and digestive enzymes activities in *Larimichthys polyactis*. *Haiyang Xuebao*, 2016, 38(12): 76–85 [刘峰, 刘阳阳, 楼宝, 等. 温度对小黄鱼体内抗氧化酶及消化酶活性的影响. *海洋学报*, 2016, 38(12): 76–85]
- Luo W, Xu Y, Liu XJ, *et al.* Effect of water temperature on serum content of reactive oxygen species and antioxidant defense system in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(4): 3–7 [罗伟, 许艳, 刘晓娟, 等. 水温对草鱼血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响. *淡水渔业*, 2017, 47(4): 3–7]
- Mourente G, Tocher DR, Diaz E, *et al.* Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture*, 1999, 179(1): 309–324
- Pan GP, Liu BW, Zhou WY. The effects of cold stress on the antioxidant defense and immune parameters of juvenile *Epinephelus moara*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(1): 78–85 [潘桂平, 刘本伟, 周文玉. 低温胁迫对云纹石斑鱼幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(1): 78–85]
- Peng T, Hu TJ, Lin Y, *et al.* Effects of low temperature stress on indices of biochemistry, immunity and antioxidation in Nile tilapia. *Fisheries Science*, 2012, 31(5): 259–263 [彭婷, 胡庭俊, 林勇, 等. 低温胁迫对罗非鱼血液生化、免疫及抗氧化指标的影响. *水产科学*, 2012, 31(5): 259–263]
- Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* The effect of acute temperature stress on biochemical indices and expression of liver HSP70 mRNA in Gift Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(5): 943–953 [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响. *海洋与湖沼*, 2012, 43(5): 943–953]
- Raida MK, Buchmann K. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77(1): 41–52
- Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223–239
- Schreck CB. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 549–556
- 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]
- Sun XL, Xing KZ, Chen CX, *et al.* The effects of acute temperature stress on blood parameters in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fisheries Science*, 2010, 29(7): 387–392 [孙学亮, 邢克智, 陈成勋, 等. 急性温度胁迫对半滑舌鳎血液指标的影响. *水产科学*, 2010, 29(7): 387–392]
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57–149
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591–625

- Xia XH, Zhao J, Du QY, *et al.* Cloning and identification of a female-specific DNA marker in *Paramisgurnus dabryanus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(1): 53–59
- Xie MM, Peng SM, Zhang CJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(6): 541–549 [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *海洋渔业*, 2015, 37(6): 541–549]
- Xue BG, Lou B, Xu DD, *et al.* Impact of density stress on growth, metabolism and non-specific immune functions of juvenile *Nibeia albiflora*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 45–51 [薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 45–51]
- Yin HC, Yang DH, Jia F, *et al.* Effects of yeast β -glucan on the immune response and *Aeromonas hydrophila* infection resistance in *Cyprinus (Cyprinus) carpio haematopterus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 759–768 [殷海成, 杨东辉, 贾峰, 等. 酵母 β -葡聚糖对黄河鲤鱼免疫应答及抗嗜水气单胞菌感染的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 759–768]
- You LJ, Zhao MM, Liu RH, *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(14): 7948–7953
- Zhang YL, Hu WH, Wu QW, *et al.* Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872), larvae and juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 2015, 31(5): 876–882

(编辑 马璀璨)

Effects of Temperature Stress on the Partial Antioxidative and Non-Specific Immunity Indices of *Paramisgurnus dabryanus*

FAN Yunshuo, SHAO Peng^①, JIA Xuying, GAO Jinwei, DOU Yong, SHI Xieyao, ZHOU Wenli

(Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract To investigate the effect of temperature stress on the antioxidative and nonspecific immune systems of *Paramisgurnus dabryanus* under transportation conditions, the liver activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lysozyme (LZM), and alkaline phosphatase (AKP) as well as the malondialdehyde (MDA) content, and the serum content of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were determined. The following results were obtained: The activities of SOD and CAT in the liver were significantly lower ($P < 0.05$), and the MDA content was significantly higher ($P < 0.05$), than the levels in the control group. During the recovery period, the activities of the two antioxidative enzymes in each experimental group increased gradually and the MDA content decreased gradually. There was no significant difference between the control group and each experimental group at the end of the recovery period ($P > 0.05$). The liver activities of LZM and AKP in each experimental group were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$) at the end of the stress period. During the recovery period, the LZM and AKP activities remained at the stress level at the end of the stress period, whereas their activities in the other experimental groups increased gradually and there was no significant difference ($P > 0.05$) compared with the control group at the end of the recovery period. The changes in serum AST and ALT content during the stress period were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). During the recovery period, the AST and ALT content showed a downward trend until the end of the recovery period. In addition, the ALT content in the high-temperature group dropped to the control group level. The results showed that temperature stress significantly inhibited the antioxidative capacity and nonspecific immunity of *P. dabryanus*, where the high-temperature stress caused irreversible damage to the nonspecific immune function of the fish, whereas the other inhibition effects were recoverable.

Key words *Paramisgurnus dabryanus*; Temperature stress; Temperature recovery; Antioxidative properties; Non-specific immunity

① Corresponding author: SHAO Peng, E-mail: vipshaopeng@sohu.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420003

http://www.yykxjz.cn/

李小平, 万晓媛, 张庆利, 黄捷, 董宣, 王秀华, 邱亮, 宋增磊, 程东远. 2016~2017年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 65-73

Li XP, Wan XY, Zhang QL, Huang J, Dong X, Wang XH, Qiu L, Song ZL, Cheng DY. Molecular epidemiological survey of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustaceans in China in 2016~2017. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 65-73

2016~2017年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查*



李小平^{1,2} 万晓媛¹ 张庆利^{1,2①} 黄捷^{1,2}
董宣¹ 王秀华¹ 邱亮^{1,2} 宋增磊^{1,2} 程东远¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 偷死野田村病毒(CMNV)引起的病毒性偷死病(VCMD)使中国对虾养殖业遭受了严重的经济损失,为查明CMNV及其变异株的分子流行病学特征,本研究采用逆转录套式PCR(RT-nPCR)、逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)和TaqMan实时荧光定量PCR(TaqMan RT-qPCR)3种方法,对2016~2017年中国沿海省市CMNV及一种新型野田村病毒——行动障碍野田村病毒(MDNV)的流行、分布和变异情况进行了分析。结果显示,养殖凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾等种类中均可检测到CMNV阳性;在河北、山东、浙江、福建、广东和海南等省市采集的患病对虾中均存在CMNV。基于RT-nPCR、RT-LAMP和TaqMan RT-qPCR的检测结果显示,2016和2017年样品中CMNV的阳性检出率依次为11.8%和7.8%,6.7%和3.9%,17.7%和12.4%;基于上述3种方法检测结果计算得出,2016和2017年样品中CMNV的阳性检出率分别为26.8%和16.3%;基于RT-LAMP的分析显示,2016年样品中MDNV的阳性检出率为9.4%。本研究表明,中国沿海省市养殖虾类中VCMD的流行和危害仍不容忽视,RNA依赖的RNA聚合酶基因不断变异导致前期基于该基因开发的CMNV检测方法可靠性下降,检出假阴性风险升高;同时,发病对虾中出现了新的野田村病毒株系且具有较高的流行率,其传播危害风险值得高度关注。

关键词 偷死野田村病毒;分子流行病学调查;逆转录套式PCR;逆转录环介导等温扩增;TaqMan实时荧光定量RT-PCR;行动障碍野田村病毒

中图分类号 S945.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)02-0065-09

2002~2003年,中国海南、广西等地池塘高密度养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)出现“偷死”现象,并使当地对虾养殖业受到影响(章秋虎,2004;宋盛宪等,2006;徐志进等,2009)。由于发病对虾主要

* 国家自然科学基金面上项目(31672695)、国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)和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(20603022015003;20603022018008)共同资助[This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672695), National Research and Development Program of China (2017YFC1404503), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022015003;20603022018008)].

李小平, E-mail: 278567196@qq.com

① 通讯作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-05-02

在池底深水区陆续死亡,不容易被养殖者观察到,因此,被称为“偷死病”(Covert mortality disease, CMD)或“死底症”(邢华, 2004; 顾水江, 2012; Zhang *et al.*, 2014)。患病个体表现出肝胰腺颜色变浅、萎缩,空肠空胃,生长缓慢等症状,很多时候还可见病虾腹节肌肉不透明或局部发白。患病对虾在水温较高(28℃以上)时死亡率升高,累计死亡率可达 80% (Zhang *et al.*, 2014、2017b)。

研究发现,一种新病毒——偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)是导致养殖对虾发生偷死病的病毒性病原(Zhang *et al.*, 2014)。为了强调该疫病的病原学特征, CMD 又被称为病毒性偷死病(Viral covert mortality disease, VCMD)(Zhang *et al.*, 2017b)。CMNV 可侵染多种甲壳类的肝胰腺和肌肉组织,在肝胰腺小管和淋巴器官上皮细胞,以及肌肉细胞内形成嗜酸性的包涵体,导致肝胰腺小管萎缩及肌肉纤维凝固状坏死(Zhang *et al.*, 2014、2017b)。Liu 等(2018)通过人工感染脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)开展了 CMNV 垂直传播途径研究,结果证实,CMNV 能通过染病亲体的雌性或雄性生殖细胞传递至子代,实现从亲代到子代的垂直传播。Liu 等(2018)研究发现,CMNV 可感染虾类养殖池塘中的多种共生生物。

2013~2015 年,在中国沿海地区 11 省市开展的 CMNV 流行病学调查显示,采集自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西和海南的发病虾类样品中均有 CMNV 阳性检出,其中,采自广东和海南的样品中的 CMNV 检出率最高,达 52.6% 和 50.8%,采自辽宁、天津的样品中 CMNV 检出率最低,为 10% 和 9.9%; CMNV 的检出率基本呈现华南高于华东和华北的趋势(Zhang *et al.*, 2017b)。凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等中国主要养殖虾类中均可检测到 CMNV 阳性,其中,日本囊对虾中 CMNV 检出率为 60%,罗氏沼虾和中国明对虾检出率较低,分别为 24% 和 22%(Zhang *et al.*, 2017b)。

2015 年作者实验室在来自厄瓜多尔和越南等地的发病养殖对虾样品中检出 CMNV 阳性,2017 年在采集自马来西亚的对虾样品中检测到 CMNV 阳性。2016 年,泰国 2 个实验室分别报道了当地发病凡纳滨对虾中存在 CMNV 高感染率的案例,利用 RT-nPCR 和荧光定量方法分析发现,CMNV 的阳性检出率分别为 30.4% 和 37.7% (Thitamadee *et al.*, 2016; Pooljun *et al.*, 2016)。上述研究中,CMNV 的高流行

率和广泛分布特征,揭示了 CMNV 具有在全球主要对虾养殖国家传播流行的较高风险。

在开展 VCMD 流行病学调查中发现,一些发病对虾中不存在 CMNV 原始株(河北株)的感染,但存在一种疑似 CMNV 变异株系的新型野田村病毒的感染,这种新型野田村病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因(*RdRp*)序列与 CMNV 原始株相比存在较大程度的变异,其与 CMNV 原始株 *RdRp* 基因片段的相似性仅为 78%,患病对虾表现出游泳性能下降、沉底的特点。由于这些样品中病原与 CMNV 原始分离株在核酸水平上差异明显,为了将其与 CMNV 原始株系区分开来,暂将其命名为“行动障碍野田村病毒(Movement disorder nodavirus, MDNV)”。

为更深入地了解 2016~2017 年间 CMNV 及新型野田村病毒——MDNV 在中国主要虾类养殖地区的流行情况,本研究采用逆转录套式 PCR (RT-nPCR) (Zhang *et al.*, 2014)、逆转录环介导等温扩增技术 (RT-LAMP)(Zhang *et al.*, 2017a)和 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR(TaqMan RT-qPCR) 3 种方法对 2016~2017 年采集自中国沿海省市虾类样品中 CMNV 和 MDNV 的流行情况进行了系统分析,以期阐明最近 2 年 CMNV 和 MDNV 在沿海各省市主要虾类养殖种类中的流行和分布情况,了解新发野田村病毒对养殖虾类的危害风险。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

2016 年从河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等地共采集 254 份虾类样品,包括凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾、脊尾白虾、罗氏沼虾和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)。2017 年从河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建和广东等地共采集 387 份虾类样品,种类包括凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾、脊尾白虾和罗氏沼虾。2016~2017 年所采集样品的信息见表 1 和表 2。所采集虾类样品的肝胰腺和肌肉等组织保存于 95%乙醇溶液中备用。

1.2 RNA 提取和纯化

将保存在 95%乙醇溶液中的对虾组织取出,先用无 RNA 酶 H₂O 清洗 1 遍,吸水纸吸去多余水分,然后采用 RNAiso plus(TaKaRa)法抽提对虾总 RNA,最后通过 Nanodrop 2000(Thermo Scientific, 美国)测量所制备 RNA 的浓度和纯度。

表 1 样品采集省市及数量信息
Tab.1 Sampling sites and the amount of samples

省/市		数量 Amount	
Province/City		2016	2017
河北	Hebei	56	98
河南	Henan	2	/
山东	Shandong	98	76
江苏	Jiangsu	11	2
上海	Shanghai	1	2
浙江	Zhejiang	31	105
福建	Fujian	40	21
广东	Guangdong	10	24
海南	Hainan	5	63
总计	Total	254	387

“/” 表示无样品, 下同

“/” indicated no sample, the same as below

表 2 样品种类及数量信息
Tab.2 The information of sampling species and amount of samples

对虾种类		数量 Amount	
Shrimp species		2016	2017
凡纳滨对虾	<i>L. vannamei</i>	193	362
中国明对虾	<i>F. chinensis</i>	16	5
日本囊对虾	<i>M. japonicus</i>	23	9
斑节对虾	<i>P. monodon</i>	3	6
罗氏沼虾	<i>M. rosenbergii</i>	17	/
日本沼虾	<i>M. nipponense</i>	1	5
脊尾白虾	<i>E. carinicauda</i>	1	/
总计	Total	254	387

表 3 CMNV RT-nPCR 所用引物序列

Tab.3 Primers for CMNV RT-nPCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'~3')	扩增片段长度 Length of amplicons	引物位置 Position of primer
Noda-F1	AAATACGGCGATGACG	619 bp	232~247
Noda-R1	ACGAAGTGCCCACAGAC		834~850
Noda-F3	CACAACCGAGTCAAACC	165 bp	256~272
Noda-R3	GCGTAAACAGCGAAGG		405~420

注: “引物位置”是指引物在 CMNV *RdRp* 基因(GenBank 登录号: KM112247)片段上的起始和终止碱基位置。下同

Note: Position of primer indicates the position of the starting and ending nucleotide base of the primer in the CMNV *RdRp* gene (GenBank accession number: KM112247) sequence. The same as below

1.4 利用 RT-LAMP 方法检测样品中 CMNV 和 MDNV

根据 Zhang 等(2017a)建立的 RT-LAMP 方法对样品进行检测, 引物序列见表 5, 按照表 6 配制反应体系。反应体系在实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)中 63°C 孵育 60 min; 然后根据扩增曲线有无判断样品是否为 CMNV 阳性。除引物不同外, MDNV 的 RT-LAMP 方法与 CMNV 的 RT-LAMP 方法相同。

1.3 利用 RT-nPCR 方法检测样品中 CMNV

根据 Zhang 等(2014)报道的 RT-nPCR 方法, 通过逆转录和套式 PCR 方法检测 CMNV 靶基因片段。具体步骤如下:

(1) 逆转录过程

首先, 配制逆转录引物预混液体系, 每个反应管中含 4 μ l 无 RNA 酶 H₂O、1 μ l 引物 Noda-R1(10 μ mol/L)、1 μ l 待测 RNA 样品(浓度在 10 ng/ μ l~1 μ g/ μ l), 70°C 预变性 10 min 后, 立即放入冰浴中冷却 2 min。

其次, 配制逆转录酶预混物: 2 μ l 5 \times M-MLV 逆转录酶缓冲液、0.5 μ l dNTP(10 mmol/L)、0.25 μ l RNase 抑制剂(40 U/ μ l)、0.5 μ l M-MLV 逆转录酶(200 U/ μ l), 无 RNA 酶 H₂O 补至 4 μ l, 混匀。42°C 反应 1 h, 70°C 变性 10 min 后, 可获得 cDNA 模板。

(2) 套式 PCR 反应

引物序列及扩增片段信息参见表 3, 参照表 4 配制套式 PCR 反应体系。RT-nPCR 第 1 轮 PCR 扩增程序: 94°C 变性 3 min; 94°C 20 s、50°C 20 s、72°C 40 s, 30 个循环; 72°C 延伸 7 min。第 2 轮 PCR 扩增程序: 94°C 变性 3 min; 94°C 20 s、50°C 20 s、72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 7 min。电泳检测第 1、2 轮 PCR 产物, 若被检样品第 1 轮出现 619 bp、第 2 轮出现 165 bp 扩增带为 CMNV 强阳性, 如只在第 2 轮出现 165 bp 扩增带则为弱阳性; 否则为阴性。

1.5 利用 TaqMan RT-qPCR 方法检测样品中 CMNV

参照常见病毒的荧光定量方法(刘珍等, 2016; Pooljun *et al*, 2016; 刘宝彬等, 2017), 采用 One Step PrimeScriptTM RT-PCR (Perfect real time) 试剂盒 (TaKaRa) 及表 7 中的引物和探针进行 TaqMan RT-qPCR, 检测样品中的 CMNV。

反应体系为 25 μ l, 各组分及用量如下: 2 \times One

表4 CMNV RT-nPCR 的反应体系
Tab.4 Amounts of each ingredients used in the CMNV RT-nPCR

第1轮 PCR 扩增体系 Mixture for the first-step PCR		第2轮 PCR 扩增体系 Mixture for the second-step PCR	
组份 Ingredient	体积 Volume(μ l)	组份 Ingredient	体积 Volume(μ l)
10×Ex <i>Taq</i> Buffer	2.5	10×Ex <i>Taq</i> Buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2	MgCl ₂ (25 mmol/L)	2
dNTP(2.5 mmol/L each)	2	dNTP(2.5 mmol/L each)	2
Noda-F1(10 μ mol/L)	1	Noda-F3(10 μ mol/L)	1
Noda-R1(10 μ mol/L)	1	Noda-R3(10 μ mol/L)	1
<i>Ex Taq</i> (5 U/ μ l)	0.1	<i>Ex Taq</i> (5 U/ μ l)	0.1
ddH ₂ O	15.4	ddH ₂ O	15.4
cDNA	1	第1轮 PCR 产物	1
总体积 Total	25	总体积 Total	25

表5 CMNV 和 MDNV RT-LAMP 引物序列
Tab.5 Primer sequences of CMNV and MDNV RT-LAMP

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence	引物位置 Position of primer
CMNV-F3	TGCCAAGCAAATACGAGCT	971~988
CMNV-B3	CATCAGCGATGTCACGGC	1145~1162
CMNV-FIP	GTCGTCGACGGTTAGGTTGCGTTTTCCAAGCACTTCCCGACAA	1041~1061, 995~1014
CMNV-BIP	CGTCCAAAAGGACCTCCGCATTTTTGGAGACCTTGGTCACGC	1122~1139, 1069~1090
CMNV-LF	GCTCACGGCTTTGGATACC	1015~1034
CMNV-LB	GATTGCATGCGTCAACCTCA	1098~1116
MDNV-F3	CAGACGCTTGCTGTGACC	105~122
MDNV-B3	TATCGGCGGCGTTTTGAG	291~308
MDNV-FIP	ATCGCAACATTGCAACGCAATTTTTCGAAGGTTATCTCGCTACGG	127~146, 174~194
MDNV-BIP	CTGCTGGAACCGCGCTAGAAATTTTGAACCATCTGCAGTCAACC	267~286, 207~226
MDNV-LF	TCTCCAACCAATGGTGTTAGAGAAT	147~171
MDNV-LB	CCAGACGGAAGACGTACATGACT	231~253

表6 CMNV 和 MDNV RT-LAMP 反应体系
Tab.6 Amounts of each ingredients used in the CMNV and MDNV RT-LAMP

组分 Ingredient	加样量 Amount(μ l)	终浓度 Final concentration
1×Isothermal amplification buffer	2.5	
MgSO ₄ (100 mmol/L)	1	4 mmol/L
Betaine(5 mol/L)	6	1.2 mol/L
dNTPs(20 mmol/L)	1.5	1.2 mmol/L
FIP(20 μ mol/L)	2	1.6 μ mol/L
BIP(20 μ mol/L)	2	1.6 μ mol/L
F3(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
B3(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
LF(20 μ mol/L)	1	0.8 μ mol/L
LF(20 μ mol/L)	1	0.8 μ mol/L
MLV 逆转录酶(200 U/ μ l)	0.2	40 U
<i>Bst</i> 2.0 WarmStart [®] DNA Polymerase(8 U/ μ l)	0.8	6.4 U
Eva Green(25 μ mol/L)	0.8	0.8 μ mol/L
RNase-free H ₂ O	4.2	
RNA	1	

表 7 CMNV TaqMan RT-qPCR 方法所用引物序列
Tab.7 Primer sequences of CMNV TaqMan RT-qPCR

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence	引物位置 Position of primer
CMNV-TAQ-F2	CGAGCTAATCCAAGCACTTC	886~905
CMNV-TAQ-R1	ACCTGTTAGGTACGCTACCA	1063~1084
CMNV-TAQ-P	FAM-CGCTCACGGCTTTGGAT ACCTT-TAMRA	911~932

Step RT-PCR Buffer III 12.5 μ l, Ex *Taq* HS 0.4 μ l, Prime Script RT enzyme Mix II 0.4 μ l, 引物 CMNV-TAQ-R1 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, CMNV-TAQ-F2 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, 探针 CMNV-TAQ-P1(10 μ mol/L) 0.5 μ l, CMNV 阳性模板 1 μ l, 其余用无 RNA 酶 H₂O 补足。在冰上配置反应体系。

利用 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 仪进行 TaqMan RT-qPCR 扩增, 反应程序: 50.8 $^{\circ}$ C 保温 15 min 进行逆转录; 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 52.7 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。

1.6 样品阳性检出率计算

每种方法检出 CMNV/MDNV 阳性的样品数除以利用该方法检测的总样品数, 并以百分比表示, 即为基于该方法的 CMNV/MDNV 阳性检出率; 将呈现 RT-nPCR 或 RT-LAMP 或 TaqMan RT-qPCR 任一种检测方法 CMNV 阳性的样品数目相加(对于呈现 2 种或 2 种方法以上阳性的样品只计算 1 次), 除以总样品数, 并以百分比表示, 即为 CMNV 的总阳性检出率(CMVN_Total)。

2 结果

2.1 CMNV 在不同虾类中的阳性率分析

采用 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法分别对 2016 年所采集的 254 份和 2017 年所采集的 387 份样品进行检测分析, 结果发现, 采用不同方法检测所得到的 CMNV 阳性率并不相同(图 1)。RT-nPCR 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾样品中可检测到 CMNV, 其阳性检出率分别为 8.0%(44/553)、9.5%(2/21)和 46.0%(17/37)。RT-LAMP 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾样品中可以检测到 CMNV, 其阳性检出率分别为 3.8%(21/553)、4.8%(1/21)、16.2%(6/37)、22.2%(2/9)和 5.9%(1/17)。TaqMan RT-qPCR 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾样品中可以检测到 CMNV, CMNV 的阳性检出率分别为 10.3%(57/553)、57.1%(12/21)和 67.6%

(25/37)。上述 3 种方法均能检出 CMNV 阳性的对虾种类为凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾。

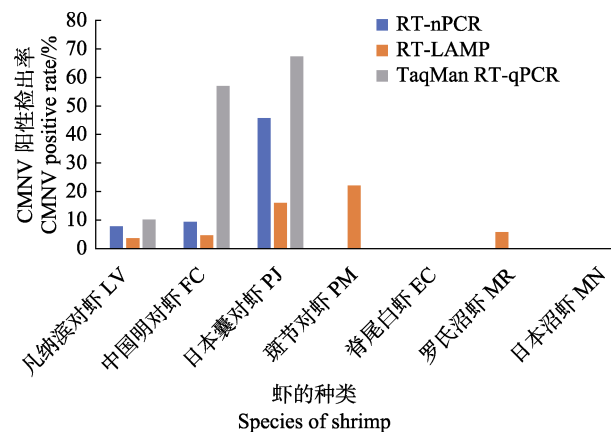


图 1 基于 3 种方法分析 2016~2017 年不同虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.1 CMNV positive rate in different shrimp samples based on three detecting methods

L. vannamei, *F. chinensis*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* and *M. nipponense* were skeletonized as LV, FC, PJ, PM, MR, and MN in the figure, respectively

2.2 CMNV 和 MDNV 的年度阳性检出率分析

对 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法的检测结果按照采样年份分析(图 2)。RT-nPCR 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 11.8%(30/254)和 7.8%(30/387)。RT-LAMP 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 6.7%(17/254)和 3.9%(15/387)。TaqMan RT-qPCR 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 17.7%(45/254)和 12.4%(48/387)。基于上述 3 种方法检测结果计算得出, 2016、2017 年样品中 CMNV 总阳性检出率

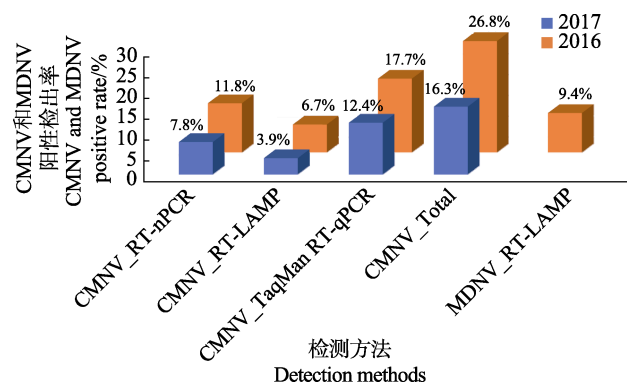


图 2 基于 3 种方法分析 2016、2017 年虾类样品中 CMNV 和 MDNV 的阳性检出率

Fig.2 CMNV and MDNV positive rates in shrimp samples collected in 2016 and 2017 based on three detecting methods

分别为 26.8%(68/254)和 16.3%(63/387)。此外,MDNV 的 RT-LAMP 检测结果显示,2016 年样品中 MDNV 的阳性检出率为 9.4%(24/254)。

2.3 2016、2017 年度 CMNV 的流行区域分析

对 RT-nPCR、RT-LAMP 和 Taqman RT-qPCR 3 种方法的检测结果,按照采样年份和区域分析,结果如图 3 和图 4 所示。2016 年度的 254 份样品来自河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等省市,其中,RT-nPCR 检测显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 19.7%(11/56),山东为 19.4%(19/98);RT-LAMP 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 5.4%(3/56),山东为 7.1%(7/98),浙江为 3.2%(1/31),福建为 15.0%(6/40);TaqMan RT-qPCR 检

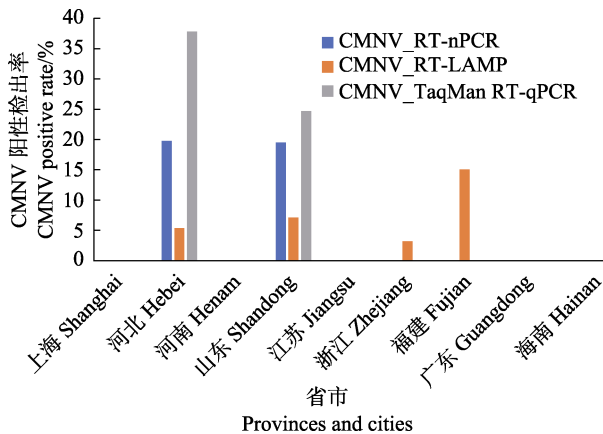


图 3 基于 3 种方法分析 2016 年不同省市虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.3 CMNV positive rate in shrimp samples collected from different provinces and cities in 2016 based on three detecting methods

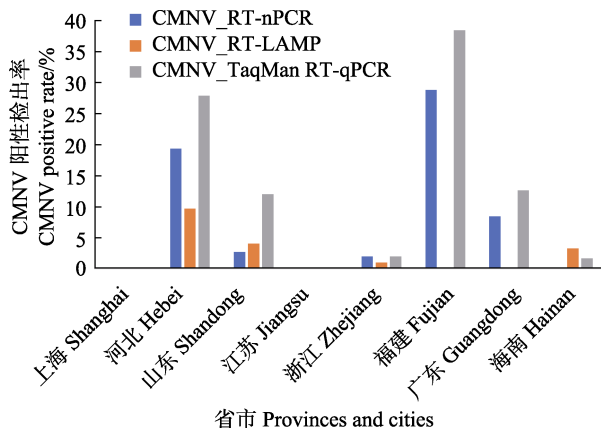


图 4 基于 3 种方法分析 2017 年不同省份虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.4 CMNV positive rate in shrimp samples collected from different provinces and cities in 2017 based on three detecting methods

测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 37.5%(21/56),山东为 24.5%(24/98)。

2017 年的 387 份样品来自河北、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等省市。其中,RT-nPCR 检测显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 19.2%(18/94),山东为 2.6%(2/76),浙江为 1.9%(2/105),福建为 28.6%(6/21),广东为 8.3%(2/24);RT-LAMP 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 9.6%(9/94),山东为 4.0%(3/76),浙江为 1.0%(1/105),海南为 3.2%(2/63);TaqMan RT-qPCR 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 27.7%(26/94),山东为 11.8%(9/76),浙江为 1.9%(2/105),福建为 38.1%(8/21),广东为 12.5%(3/24),海南为 1.6%(1/63)。

3 讨论

过去几年,VCMD 的广泛发生与流行使中国养殖对虾产业遭受了严重的经济损失(Zhang *et al*, 2014、2017b)。为了更深入地了解这种新发疫病的流行病学特征,2013~2015 年本实验室针对中国沿海省市的主要对虾养殖地区开展了 CMNV 的流行病学调查研究发现,沿海各省市虾类样品中均有 CMNV 流行和感染;患病种类涉及中国养殖甲壳动物主要经济种类,如凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾;患病个体大都表现出肝胰腺颜色变浅,甲壳变软,生长缓慢等 VCMD 的典型症状;组织病理学分析揭示,患病凡纳滨对虾、日本囊对虾和斑节对虾等腹节肌肉均呈现溶解样坏死;超微结构病理学分析显示,患病个体的肌肉、肝胰腺中均可见大量 CMNV 样病毒颗粒,另外,患病凡纳滨对虾体内包被肝胰腺的海绵状结缔组织鞘(Tunica propria, 为结缔组织)也是病毒的富集区域。基于 RT-LAMP 检测的分析结果显示,2013~2015 年中国沿海养殖虾类中 CMNV 的流行率分别为 45.9%(130/283)、27.9%(84/301)和 20.9%(54/259)。总体来看,CMNV 呈现出流行范围广、宿主种类多和流行率高的特点(Zhang *et al*, 2017b)。

本研究参照朱罗罗等(2016)分子流行病学调查方法,针对 2016~2017 年采自中国沿海省市的 641 份虾类样品的分析结果显示,沿海大部分省市的养殖虾类样品中均有 CMNV 的阳性检出,表明 CMNV 仍在中国主要对虾养殖地区流行。忽略检测样本数量最少的 3 个省市(上海、河南和江苏),其他 6 个省(河北、山东、浙江、福建、广东和海南)养殖虾类样品中

CMNV 检出率差异很大,为 1.6%~38.1%不等。研究结果也显示,CMNV 在凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾等养殖甲壳类中普遍存在,在日本囊对虾、斑节对虾和中国明对虾中检出率均较高。

为了考察 CMNV 不同分子生物学分析方法的可靠性和适用范围,本研究采用 CMNV 的 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法对所采集的样品进行了检测分析。结果显示,不同检测方法所得出的 CMNV 阳性检出率差异很大,如基于 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 方法,641 份样品中 CMNV 的阳性率分别为 9.4%(60/641)、5.0%(32/641)和 14.5%(93/641)。造成差异的原因可能是检测方法的灵敏度不同;但前期研究表明,CMNV 的 RT-LAMP 检测方法的灵敏度高于 RT-nPCR 检测方法,而同一批样品基于 RT-LAMP 的 CMNV 检出率反而低于基于 RT-nPCR 的 CMNV 检出率。进一步分析检测结果发现,经 RT-nPCR 检测呈现 CMNV 阴性的样品中,部分为 RT-LAMP 检测的 CMNV 阳性;经 RT-LAMP 检测呈现 CMNV 阴性的样品中,部分为 TaqMan RT-qPCR 检测的 CMNV 阳性;经 TaqMan RT-qPCR 检测呈现 CMNV 阴性的样品中,部分为 RT-LAMP 和 RT-nPCR 检测的 CMNV 阳性。该结果说明,利用上述任意一种方法对 CMNV 样品进行检测时,均存在假阴性的结果;造成这种现象可能与所采集样品中 CMNV 靶基因序列发生了不同变异有关。

前期基于 CMNV 的 RT-LAMP 检测方法对 2013~2015 年中国沿海 11 省市养殖虾类样品的检测结果显示,CMNV 的阳性检出率从 2013 年的 45.9%(130/283)下降到 2014 年的 27.9%(84/301)和 2015 年的 20.9%(54/259)(Zhang *et al.*, 2017b);本研究基于 RT-LAMP 检测方法的分析结果也显示,2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 6.7%(17/254)和 3.9%(15/387);该结果似乎说明,CMNV 在中国沿海省市养殖对虾中的流行率在不断下降。而 2013~2017 年在沿海省市的实际走访和调查中发现,主要虾类养殖地区 VCMD 的发病案例并未明显减少。考虑到 CMNV 作为一种单链 RNA 病毒,其 RNA 依赖的 RNA 聚合酶在进行基因组复制时缺乏 5'~3'校正功能,会导致病毒出现较快变异。对 CMNV 变异情况进行持续跟踪分析发现,一些发病对虾中不存在 CMNV 原始株(河北株)的感染,但存在一种类似 CMNV 变异株系的新型野田村病毒的感染,为了与 CMNV 原始株系进行区分,将这种类似 CMNV 变异株的新型野田村病毒暂时命名为 MDNV。在研究中也发现,采用目前

CMNV 的 RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 检测方法,无法扩增 MDNV 的 *RdRp* 基因;此前,Zhang 等(2014)报道的 CMNV RT-nPCR 方法也存在缺陷,无法检测 CMNV 的部分变异株系。基于 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 方法对 2016、2017 年样品的分析中,CMNV 阳性检出率有差异,以及基于 RT-LAMP 分析方法显示,2013~2017 年中国沿海省市养殖对虾中 CMNV 流行率下降,应主要是由于上述 3 种方法均是基于 CMNV 原始株系的 *RdRp* 基因开发,而这 3 种方法所用引物的高特异性无法适应 CMNV 变异株而导致的。

基于上述 3 种方法的检测结果计算得出,2016 年样品中 CMNV 总阳性检出率为 26.8%(68/254),而 CMNV 变异株系(MDNV)的阳性检出率为 9.4%(24/254),考虑到 MDNV 变异幅度较大导致 CMNV 上述 3 种检测方法无交叉反应,以及 MDNV 检测方法无交叉反应,而 2015 年样品中尚未检测到 MDNV 株系(数据未包括在本研究中),2016 年沿海省市池塘养殖虾类中 CMNV 和 MDNV 两种新发野田村病毒的阳性检出率合计达 36.2%(92/254)。由此来看,中国养殖虾类中新发野田村病毒的流行率并没有明显降低,只是流行株系发生了较大变化。

综上所述,2013~2017 年针对中国沿海省市养殖虾类的流行病学调查和分子流行病学分析结果表明,CMNV 作为一种新发病毒,其流行范围广、宿主种类多、流行率高,并且主要特征性基因出现了明显变异,该病毒在虾类养殖业中的危害应引起足够重视。

致谢:中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室同事和研究生协助取样,谨致谢忱。

参 考 文 献

- Gu SJ. Analysis of causes of the covert mortality disease of Pacific white shrimp and its control strategies. *Scientific Fish Farming*, 2012(8): 62-63 [顾水江. 南美白对虾偷死病发病原因分析及防治对策. *科学养鱼*, 2012(8): 62-63]
- Liu BB, Yang B, Lü XW, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by real-time PCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 158-166 [刘宝彬, 杨冰, 吕秀旺, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧

- 光定量 PCR 检测. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 158–166]
- Liu S, Li JT, Tian Y, *et al.* Experimental vertical transmission of covert mortality nodavirus in *Exopalaemon carinicauda*. Journal of General Virology, 2017, 98(4): 652–661
- Liu S, Wang XH, Xu TT, *et al.* Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV). Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 154: 29–36
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 119–126]
- Pooljun C, Direkbusarakom S, Chotipuntu P, *et al.* Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for detection of covert mortality nodavirus (CMNV) in penaeid shrimp. Aquaculture, 2016, 464: 445–450
- Song SX, Zhuang SP. Measures for control of “bottom death” of Pacific white shrimp. Fish Science and Technology, 2006(6): 36–38 [宋盛宪, 庄世鹏. 防治南美白对虾“底死症”的措施. 水产科技, 2006(6): 36–38]
- Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture, 2016(452): 69–87
- Xing H. Discussion of the control measures for the “bottom death” (covert mortality disease) of Pacific white shrimp. China Fisheries, 2004(4): 88–89 [邢华. 南美白对虾“死底症”(偷死病)的控制措施探讨. 中国水产, 2004(4): 88–89]
- Xu ZJ, Ji F. Comprehensive control of the covert mortality disease of Pacific white shrimp. Fishery Guide to be Rich, 2009(1): 60–61 [徐志进, 纪富. 南美白对虾偷死病的综合防治. 渔业致富指南, 2009(1): 60–61]
- Zhang QH. To be cautious of “bottom death” in the intensive farming of Pacific white shrimp. Scientific Fish Farming, 2004(10): 48–49 [章秋虎. 南美白对虾高密度养殖谨防“死底症”. 科学养鱼, 2004(10): 48–49]
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. Journal of General Virology, 2014, 95(12): 2700–2709
- Zhang QL, Liu S, Yang HL, *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of covert mortality nodavirus in shrimp. Journal of Invertebrate Pathology, 2017a, 150: 130–135
- Zhang QL, Xu TT, Wan XY, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. Virus Research, 2017b, 233(2): 113–119
- Zhu LL, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Molecular epidemiology of a new yellow head virus strain in China. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 68–77 [朱罗罗, 张庆利, 万晓媛, 等. 我国一株新型黄头病毒的分子流行病学. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 68–77]

(编辑 马瑾艳)

Molecular Epidemiological Survey of Covert Mortality Nodavirus (CMNV) in Cultured Crustaceans in China in 2016~2017

LI Xiaoping^{1,2}, WAN Xiaoyuan¹, ZHANG Qingli^{1,2}^①, HUANG Jie^{1,2}, DONG Xuan¹,
WANG Xiuhua¹, QIU Liang^{1,2}, SONG Zenglei^{1,2}, CHENG Dongyuan¹

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

Abstract Covert mortality nodavirus (CMNV), a recently emerged RNA virus, is the pathogen responsible for viral covert mortality disease, which has caused serious losses of shrimp aquaculture in China in recent years. In order to determine the transmission, prevalence, and evolution of CMNV in the coastal provinces and cities in China, national wide survey of the molecular epidemiology of the CMNV and its variants was conducted, based on analysis of shrimp samples collected from 2016 and 2017 by using the methods of RT-nPCR, RT-LAMP, and TaqMan RT-qPCR in present study. The analyses found the presence of CMNV-positive specimens in the major species of cultured crustaceans, including *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, and *Macrobrachium rosenbergii*. CMNV-positive specimens appeared in almost all the coastal provinces, such as Hebei, Shandong, Zhejiang, Fujian, Guangdong, and Hainan. The results based on RT-nPCR assays showed that the prevalence rates of CMNV among the collected samples were 11.8% (30/254) and 7.8% (30/387) in 2016 and 2017, respectively. The results based on RT-LAMP assays showed that the prevalence rates of CMNV were 6.7% (17/254) and 3.9% (15/387) in 2016 and 2017, respectively. The results based on TaqMan RT-qPCR assays showed that the prevalence rates of CMNV were 17.7% (45/254) and 12.4% (48/387) in 2016 and 2017, respectively. The total prevalence rates of CMNV were 26.8% (68/254) and 16.3% (63/387) in 2016 and 2017, respectively, based on the above mentioned three methods. The results based on RT-LAMP assays showed that the prevalence rate of MDNV was 9.4% (24/254) in 2016. The high prevalence of CMNV in the major shrimp species and in the main farming areas revealed that this virus still threatened shrimp aquaculture in China during 2016~2017. Moreover, mutation of the RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene of CMNV will raise the risk of appearing of false-negative result in CMNV molecular tests, which is of great concern. Meanwhile, the high prevalence rates of the emerging CMNV variant, MDNV, is a reminder that close attention needs to be paid to the high risk of MDNV transmission widely in farmed crustaceans.

Key words Covert mortality nodavirus (CMNV); Molecular epidemiological survey; RT-nPCR; RT-LAMP; TaqMan RT-qPCR; Movement disorder nodavirus (MDNV)

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171219002

http://www.yykyxjz.cn/

史晓丽, 张莹雪, 孟宪红, 孔杰, 栾生, 罗坤, 曹宝祥, 曹家旺, 陈宝龙. 中国对虾甘氨酸脱羧酶的基因克隆、表达及其与抗 WSSV 的关联分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 74-82

Shi XL, Zhang YX, Meng XH, Kong J, Luan S, Luo K, Cao BX, Cao JW, Chen BL. cDNA cloning of the GLDC gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analyses after WSSV infection. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 74-82

中国对虾甘氨酸脱羧酶的基因克隆、表达及其与抗 WSSV 的关联分析*



史晓丽^{1,2} 张莹雪^{1,2} 孟宪红^{1,2}① 孔杰^{1,2} 栾生^{1,2}
罗坤^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 曹家旺^{1,2} 陈宝龙^{1,2}

(1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究采用 RACE 技术克隆获得中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)甘氨酸脱羧酶基因(*FcGLDC*)的全长 cDNA 及 DNA 序列, 并对其进行生物信息学分析。结果显示, *FcGLDC* 基因的 cDNA 全长为 3481 bp, 其中, ORF 为 2829 bp, 5'UTR 长 17 bp, 3'UTR 长 86 bp。完整的阅读框编码 942 个氨基酸, 分子量为 104.66 kDa, 预测的理论等电点为 6.51。*FcGLDC* 基因 DNA 序列全长共 4964 bp, 包含 12 个外显子和 11 个内含子。同源性及系统进化分析显示, *FcGLDC* 基因与节肢动物的 *GLDC* 基因聚为一类; 氨基酸序列比对发现, *FcGLDC* 基因的蛋白序列与节肢动物的相似度最高, 与内华达白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、体虱(*Pediculus humanus corporis*)和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)的相似度分别为 71%、68%和 68%。在鳃、肝胰腺和肌肉中的荧光定量 PCR 结果显示, *FcGLDC* 在肌肉中的相对表达量最高, 鳃中最低。WSSV 感染后, 该基因在鳃、肝胰腺和肌肉中呈现出了不同的时空表达特点。使用直接测序法结合质谱法, 在该基因内部发现 4 个 SNP 位点, 但是各位点与抗 WSSV 性状均不相关($P>0.05$)。本研究表明, *FcGLDC* 基因在对虾感染 WSSV 后的应答反应中或起一定作用。

关键词 中国对虾; 甘氨酸脱羧酶; 基因克隆; 表达; 关联分析

中图分类号 Q785; S966.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)02-0074-09

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的土著海水养殖种类之一, 近十几年来, 其养殖产业饱受病害困扰。在诸多病原当中, 白斑综合征病毒

(White spot syndrome virus, WSSV)是对对虾养殖生产毒害最大的病毒之一(Lightner, 1996), 它导致的疾病传播快、破坏性强, 且防治困难, 已给我国乃至全

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017001)、国家自然科学基金(41676148)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS (20603022017001), National Natural Science Foundation of China (41676148), the Taishan Scholar Program for Seed Industry and China Agriculture Research System (CARS-48)]. 史晓丽, E-mail: shixiaoli209@163.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-19, 收修改稿日期: 2018-03-01

球的对虾养殖业造成了极大危害,严重制约了对虾养殖业的健康发展。国内外学者展开了大量研究工作,如消除传染源、切断传播途径、控制水质、提高对虾抵抗力等以降低其危害,但至今效果不显著 (Yang *et al.*, 2001; He *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; 曹家旺等, 2017)。研究对虾对病原感染的免疫应答机制,可以为有效进行对虾的病害防治提供重要的理论指导。

甘氨酸脱羧酶(Glycine Decarboxylase, GLDC)是由 P-蛋白、H-蛋白、T-蛋白和 L-蛋白 4 个亚基构成的多酶复合体系(Tada *et al.*, 1987)。它作为天冬门氨酸氨基转移酶超家族(Aspartateamino transferase superfamily, AAT_1)的成员,是一种磷酸吡哆醛依赖酶。在人类中的研究表明,甘氨酸脱羧酶的突变是非酮性高甘氨酸血症(Nonketotic Hyperglycinemia, NKH)的病因,该疾病是由先天基因缺陷导致大量甘氨酸在体液中积累而引起的严重的神经功能障碍,如脑病、肌张力减退、呼吸暂停、顽固性癫痫和可能的死亡(Kanekar *et al.*, 2013)。也有学者指出, GLDC 是非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)发生的关键酶, NSCLC 初期肿瘤的 TICs 中检测到高表达量的 LIN28B 干细胞因子和 GLDC(Zhang *et al.*, 2012)。GLDC 在糖酵解和甘氨酸/丝氨酸代谢中引起巨大变化,导致嘧啶代谢发生变化,从而影响肿瘤细胞的增殖(信波等, 2007)。迄今为止,水产动物中尚未见该基因相关的研究报道。

在中国对虾感染 WSSV 后的表达谱芯片研究中,发现甘氨酸脱羧酶基因出现显著差异表达,此外,该基因内部出现与抗病性状呈显著关联的 SNP 位点(本实验室未发表数据)。故此,本研究采用 RACE 技术克隆中国对虾的甘氨酸脱羧酶基因(以下称 *FcGLDC* 基因),并研究其在 WSSV 侵染后的时空表达特点;利用直接测序法筛选基因内部的 SNP 位点,并利用飞行时间质谱法对 SNP 位点进行分型及其与抗 WSSV 性状的关联分析。研究结果将有助于为中国对虾抗 WSSV 育种提供理论依据和实践资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料及人工 WSSV 感染实验

中国对虾实验群体取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心[体重(1.01±0.21) g],实验前暂养 7 d。实验用水为砂滤海水,养殖期间水温为 24.8~25.4℃,盐度为 28,持续充氧,每天换水,并投喂配合饲料。利用单尾、等量、口饲法对 1500 尾左右的对虾进行 WSSV 感染,感染方法参见逢锦菲

等(2013),选取 WSSV 感染实验中早期死亡的 48 尾和后期死亡的 48 尾对虾分别作为敏感群体和抗性群体,将 2 个群体的肌肉组织保存于液氮中,用于后续 DNA 的提取及关联分析。

随机挑选暂养的健康中国对虾 180 尾,平均分为 2 组(WSSV 感染组和对照组),每组 3 个平行。WSSV 感染组从第五腹节处注射病毒含量 10^3 copies/ μ l 的病毒悬液 10 μ l,对照组从第五腹节处注射 PBS 10 μ l,各组分别在实验开始后的 0、6、12、24、48 和 72 h 取鳃、肝胰腺和肌肉组织,每个时间点各取 3 尾存于液氮中,用于后续 RNA 的提取及荧光定量验证。

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 的提取及 cDNA 合成

使用 Trizol 法提取中国对虾肝胰腺组织的总 RNA,具体操作方法参照说明书(Invitrogen, 美国)。采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的质量及完整性。利用 SMART™ RACE Amplification Kit (Clontech, 美国)反转录合成 cDNA 第一条链。按照 TIANGEN 基因组 DNA 提取试剂盒的方法进行基因组 DNA 的提取。采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量及完整性。

1.3 中国对虾 *FcGLDC* 基因全长 cDNA 的克隆及测序

根据本实验室的中国对虾 454 转录组测序获得的甘氨酸脱羧酶基因的部分 EST 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 5'RACE 和 3'RACE 引物(表 1),利用 Advantage 2 Polymerase (AD 酶)进行扩增,扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后,利用胶回收试剂盒回收目的片段,连接到 pMD18-T simple 载体上,转化入 Top 10 感受态细胞。使用 M13 引物对克隆进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆经确定后送青岛擎科测序公司进行测序。

1.4 中国对虾 *FcGLDC* 基因的克隆及测序

以对虾的基因组 DNA 为模板,根据 *FcGLDC* 基因的 cDNA 序列设计引物(表 1)。利用 TaKaRa 的 *LA Taq* DNA 聚合酶进行扩增,反应体系:DNA 模板 2 μ l, 正反向引物各 5 μ l, dNTP mixture (2.5 mmol/L each) 8 μ l, Buffer 5 μ l, *LA Taq* 0.5 μ l, 加水补足到 50 μ l。PCR 反应程序:94℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。扩增产物测序由青岛擎科测序公司进行。

1.5 基因生物信息学分析

测序结果通过 NCBI 网站上的 BLASTX 进行序列同源性比对分析,利用 DNASTAR 软件进行全长序

表1 引物序列及信息
Tab.1 Primer sequences in RACE, qRT-PCR and DNA amplification

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	用途 Purpose
5' outer primer	ACGGCGAGCGTCTGCGGGTG	RACE
5' inner primer	GCTGCGTCGGTCAAGGCGTC	RACE
3' outer primer	CGAGAGTTTAAGAAGACAGC	RACE
3' inner primer	AATCCGAAGACAAAGCAG	RACE
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	qRT-PCR
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	qRT-PCR
GLDC 1F	TCAGGGAAATCTCGGA	DNA 扩增
GLDC 1R	TGTCTGGATACTGGAAAAGC	DNA 扩增
GLDC 2F	TCAGTGCCGTGCTTTTCCAG	DNA 扩增
GLDC 2R	GCAGATGTTGCTGGTGGCTT	DNA 扩增
GLDC 3F	GAAGGACTCTTACCGCCTTG	DNA 扩增
GLDC 3R	AAGGGCTATTCCAACCGTCT	DNA 扩增
GLDC 4F	GTTAATCCGACATTGGCAACT	DNA 扩增
GLDC 4R	CTCTGTGCTGAGGCAGGATT	DNA 扩增
GLDC 5F	GACTTCCTCACCCACAGCAT	DNA 扩增
GLDC 5R	TCCCTCACCACGCGCAT	DNA 扩增
GLDC 6F	GAGGAGCTTGAACATGACC	DNA 扩增
GLDC 6R	CTGTGCTGAGGCAGGATT	DNA 扩增
GLDC 7F	GTGTGCCTGATTCCAACCTC	DNA 扩增
GLDC 7R	CATGAGGGATGCAGAAAGGTC	DNA 扩增
GLDC 8F	CGAGAGTTTAAGAAGACAGC	DNA 扩增
GLDC 8R	GGGTGAATCCAGTACATAACAA	DNA 扩增

列拼接,在线生物学软件 ExPASy 对全长序列编码的氨基酸序列进行生物信息学分析,使用 MEGA 5.0 软件的邻接法(NJ)构建系统进化树。

1.6 基因的时空表达分析

以 18S rRNA 作为 Real-time PCR 反应的内参基因,采用 TaKaRa 的荧光定量 PCR 试剂盒对基因进行荧光定量 qRT-PCR 检测。所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,各个基因引物序列见表 1。20 μ l 反应体系包含: 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l, 正向和反向引物各 1 μ l (2 μ mol/L), 稀释后的 cDNA 模板 1 μ l (1 : 10 稀释), 循环参数按照说明书。实验重复 3 次,以平均值进行后续数据分析。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每个基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001), 所得数据用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 比较均值的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。

1.7 中国对虾 *FcGLDC* 基因的 SNP 位点筛查及其与抗 WSSV 性状的关联分析

取中国对虾 5 个个体的 DNA 进行混合,进行 PCR 扩增反应,扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后将产物送青岛擎科测序公司测序。在测序结果中寻找有明显双峰的位点,将其定为 SNP 位点。之后利用飞行时间质谱法对 SNP 位点进行分型,并在敏感群体和抗性群体中对分型结果进行关联分析。

2 结果与分析

2.1 中国对虾 *FcGLDC* 基因 cDNA 全长序列的克隆

利用 Trizol 法获得中国对虾肝胰腺组织的 RNA,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后发现, 18S 和 28S rRNA 条带清晰,说明其完整性较好,紫外分光光度计检测其 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为 1.86,表明其纯度较高,可用于后续实验。

中国对虾 *FcGLDC* cDNA 序列全长 3481 bp,其中,5'UTR 长 17 bp,3'UTR 长 86 bp,ORF 为 2829 bp,编码 942 个氨基酸,包含 94 个碱性氨基酸(K 和 R), 108 个酸性氨基酸(D 和 E), 322 个疏水氨基酸(A、I、L、F、W 和 V), 233 个亲水氨基酸(N、C、Q、S、T 和 Y), 222 个带电荷氨基酸(K、R、D 和 E), 预测蛋白分子量为 104.66 kDa, 理论等电点为 6.51(图 1)。

2.2 中国对虾 *FcGLDC* 基因的克隆

经 PCR 扩增得到中国对虾 *GLDC* 基因 DNA 序列全长,共 4964 bp,包含 12 个外显子和 11 个内含子。所有内含子均由 GT 开头,以 AG 结尾,符合 GT-AG 法则。所有内含子都在开放阅读框内部(图 2)。

2.3 *FcGLDC* 蛋白系统进化分析

氨基酸序列分析显示, *FcGLDC* 蛋白含有天冬氨酸氨基转移酶超家族的典型保守序列 SAAILPISW(A 也可为 S), 定位于第 736~744 氨基酸(图 3)。氨基酸序列比对发现, *FcGLDC* 的蛋白序列与节肢动物的相似度最高, 与内华达白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、体虱(*Pediculus humanus corporis*)和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)的相似度分别是 71%、68%和 68%, 而与哺乳动物如非洲象(*Loxodonta africana*)和草原鹿鼠(*Peromyscus maniculatus bairie*)的相似度分别为 67%和 67%。

系统进化分析表明, *GLDC* 基因在进化过程中分为了脊椎动物(哺乳动物、爬行动物等)和无脊椎动物(主要为节肢动物)两个大的分支, 在无脊椎动物分支

```

1           M L E A L G Y E S L D A L T D A A M P E N I R L G
1  aggacgaccagaaaagATGCTCGAGGCGTGGGTTATGAGTCGTTGACGCCTTGACCGACGAGCGATGCCGAGAACATCCGACTCG
26  R D L N V Q N P M G E H A L L S R I R E I S E K N E I W R T
91  GGAGGACCTGAACGTGCAGAAATCCGATGGCGGAGCAGCGCTACTCAGCAGGATCAGGAAATCTCGGAGAAGAACAAATCTGGAGGA
56  Y I G M G Y H N C R V P H I L R N I F E N P G W T T Q Y T P
181 CCTACATCGGCATGGGCTACCACAACCTGCCCGTCCCCACATCCTCAGGAACATCTTCGAGAATCCGGGATGGACAACACAGTACACGC
86  Y Q P E V A Q G R L E S L L N Y Q T M V T D L T G L E V A N
271 CATACCAACCGGAAGTGCCAGGCTCGCCTCGAATCCCTCTGAATACCAGACGATGGTACTGACCTGACCTGGCCTTGAAGTTGCTA
116  A S L L D E G T A A A E A V G L A Y R Q N K R R K V S D
361 ATGCTTCATTGTTGGACGAAGGCACAGCAGTGCAGAAAGCCGTTGGGTTGGCGTACAGGCAGAACAAACGGCGAAAAGTGTACCTGTGAC
146  K L H P Q T L A V V R T R A L P L G L E V L I G D V F D I D
451 ACAAGTTTACCAGCAGAGCTCGCCGTTGCGAACCAGCCCTTCCCTTGGCCTTGAAGTCTCATTGGCGATGTTGATGATCG
176  F T N R D V S A V L F Q Y P D T E G T V N D F T Q V I E N A
541 ACTTACCAATCGCATGTCAGTGCCTGCTTTTCCAGTATCCAGACACTGAAGAACCGTCAATGACTTACACAAAGTTATTGAAAATG
206  Q S N G T M V V C A T D L L A L T V L V P P G D L G V D I A
631 CGCAGAGCAATGGAACAATGTTAGTGTGTGCGCAGGACTCTTGGCTTCCAGTCTCAGTCTCGTTCCCGCCGGGACTCGGCTGGACATCG
236  V G T S Q R L G V P L G Y G G P H A G F F A C K N N L V R L
721 CCGTCGGGACTTCGACAGACTCGGGTTCCTCTGGGCTACGGAGGCTCCTCAGCCGGCTTCTTCCCTGCAAGAAACATCTGGTGAAGC
266  M P G R M I G V T R D A N G K D S R G L Q S A R R E Q H I R
811 TCATGCCCGGAGAATGATCGGTGTCAAGGGATGCAATGGGAAGGACTCTTACCGCTTGTCTTCAAACCGAGAGCAACACATTC
296  R D K A T S N I C T A Q A L L A N M S A M F A V Y H G P K G
901 GTCGTGACAAAGCCAGCAACATCTGCACAGCTCAGGCACTGCTTGCAAACATGTGCAAGATGTTGCAAGTTCACCTGGACAAAAG
326  L K N I A N R I H N A T N V I L S R G L Q S A G H I T E N D I
991 GGTAAAAAATATTGCTAATCGCATTCAACGCAACAGTCTTGTCAAGGGGCTTCACTCAGCTGGCCATATAATTGAGAATGATA
356  F F D T M R V N P T L A T S E I R M R A Q Q K E I N L R Y F
1081 TCTTCTTTGACTATGAGGTTAATCCGACATTTGGCACTAGTGAATGAGATCAGAATGAGAGTCAACAGAAAGAAATTAACCTTCGTTACT
386  R D E L D V L F W V P C K N N V
1171 TCAGAGATGAGACGGTTGGAATAGCCCTTGTAGACAGTAAGAAAGCAGGACTTGGACGATTTGTTCTGGGTGTTCACTGCAAGAACG
416  T A D K V A S N L S G A A L P K E H I S N T K F A R K S D F
1261 TTACTCGACAGAAGTTCGCTAGCAATCTCAGCGTGTCTGCTTGCCTAAGGAAACATCTCAATCAAAAATTTGCTCGCAAGTCCGACT
446  L T H S I F N T Y H S E A Q L V R Y M K I L E N K D V S L V
1351 TCCTCACCCACAGCATATTCAACACATATCATTCTGAGGCCAGTGGTGGCCTACATGAAGATCCTGGAGAATAAGGATGTTCTCTTG
476  H S M I P L G S C T M K L N S T T E M M P C S F P H F T E I
1441 TACATTCATGATCCCCCTAGGCTCTTGTACGATGAAGCTAAACAGCACACAAGAGATGATGCGGTGAGCTTCCACACTTCCACAGAAA
506  H P F V P P E Q A L G Y R L L F E E L E H D L C E I T G Y D
1531 TCCATCCATTTGACACCAGAGCAAGCACTTGGTATCGGCTTCTGTTTGGAGGCTTGAACATGACCTATGTGAGATCACCGGTTATG
536  K I S F P Q P N T P P Q P H Y P P L P P I I S Y L D A R G E G
1621 ACAAAATTTTCATTCAGCCAAACACTCCACCTCAACCACTATCCACCTTCCACCCATCATCTCATACTGGATGCGCGTGGTGGG
566  H R N V C L I P T S A H G T N P A S A Q M A G M K V E A V N
1711 GACACCGCAATGTGCGCTGATTTCAACTTCAGCCATGGTACAAATCCTGCCTCAGCACAGATGGCAGGAATGAAAGTGAAGCTGTA
596  V D K E G S I D F R H L T A K I E G D V S H L N L H K T F C I P
1801 ATGTTGACAAGGAAGGTCATTTGATTTAGACATCTTACTGCCAAGATTGAGAAACATCGTAAGAACTGGCATGGCTGATGATACAT
626  P S T N G V F E D T V K D V C H M V H E A G G Q V Y L D G A
1891 ATCTTCTACCAATGGTATTTGAAAGACTGTAAAGATGTTGCCATATGGTTCATGAAGCTGGTGGTCAGGTGATTTGGATGGAG
656  N M N A Q V G L C R P G D I G M D V S H L N L H K T F C I P
1981 CAAACATGAATGCCAGGTGGTCTGTGTCGGCCAGGAGATATTGGAGGAGATGATCCCATCTTAATTTGCACAAGACCTTCTGCATCC
686  H G G G G P G M G P I G V K A H L I P Y L P S H P I V D P M
2071 CTCATGGTGGAGGAGCTGGCATGGACCCATTTGGAGTGAAGGCCACCTGATTCCATACTTGCCAAGTCAACCCATTTGTTGACCCAA
716  A L M K K A R S F G L V S A A P Y M K S A A I L P I S W A Y
2161 TGGCCTTAATGAAAGAAAGCTCGCAGTTTTGGCCTTGTGTCGACGCTCCCTATGGTTCAGTCTATCTTCCAATCTCTTGGGCT
746  V K M M G P K G L R E A T Q V A I L N A N Y M A N R L R K Y
2251 ATGTCAAGATGATGGTCCAAAGGTTTGGGAAAGTACTCAGTTGCTATCTTGAATGCTAATACTACATGGCAATCGCTCAGAAAAT
776  Y K V L Y T G N C G L V A H E F I L D M R E F K K T A G I E
2341 ACTACAAGTGTGTACTACGGAAATTTGGATTAGTGTCTATGAATTCATCCTGATATGGCAGAGTTTAAAGAACAGCTGGAAATTG
806  A T D I A K R L Q D Y G F H A P T M S W P V A G S L M V E P
2431 AAGCTACAGACATTTGCAAGGCTTTCAGGACTATGGTTCATGCAACCGCAATGCTGGCCTGTTGCTGGTATTTGATGTTAGGAGC
836  T E S E D K A E L D R F C D A M I L I R E E I R D L E E G R
2521 CAACGAATCCGAAGACAAAGCAGAGTGGATCGTTTCTGTGATGCAATGATCTTAATTCGAGAAGAGATCAGAGACCTGGAGGAGGGA
866  S D P K C N P L N M S P H P L V T V T S Y N W D R P Y S R E
2611 GAGTATCCCAAGTCAACCCCTCAACATGTCACCCCTAGTAACTGTCACCTTCTTCAACTGGGACCTCCATATCCCGAG
896  Q A A F P A P F V R P E S K W W P T V G R I D D I Y G D R N
2701 AGCAAGCTCCTTCCCTGCTCCATTTGTGCGGCCAGAGACAAATGGTGGCAACTGGGGACCGATTGATGACATCTATGGCAGCCGTA
926  L V C T C P P M E T S C S P F D D *
2791 ACCTGGTTGTACTGTCGCGCCATGGAGACTTCATGCTACCCCTTGGACGATTAActtgcttgaaccttggttttgtaaacacctaa
2881 aattcatcatatttgcaggagaaaaagaaaaaaaggagggttttatattttctttctatgtataacttgatagatttgcct
2971 gcaagtttatgaaacccaaatattaaaactcaaaaaatcatcccacttatgtataactcttgaatcacatcagttataaagtcag
3061 aaagttatattatagcaccagaaacataataataggcaattatgtcatcttcacttctatcttcatagaaaagctcttattaca
3151 ggtacatttttaatacactgtgtaggctacactaggacaacttggatgattaaactggacttcattttatctgtaaagaaaggctat
3241 tattaagattctttatacaccatgtcttaataagtttggtagtaataaaatgaaacctctttgataaataagattgacataataattcc
3331 tgttagtaatacaattgttaatactgtgttcttaacttcataaaaagggtgataatgactattacattcattggtatgcatggattca
3421 ctacagttgggtgataatttcttatttttaataaaagtgaatgaaataaaaaa

```

图 1 中国对虾 *GLDC* 基因 cDNA 全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *FcGLDC* gene
全长起始密码子 ATG 由下划线标出; 终止密码子 TAA 由*标出; 黑色方框内为保守序列

Start codon (ATG) was underlined; Stop codon (TAA) marked with asterisk; Conserved sequence marked with black box

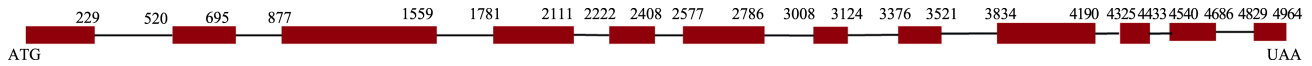


图 2 *FcGLDC* 基因的 DNA 结构

Fig.2 The DNA structure of *FcGLDC*

红色框表示外显子, 黑色线表示内含子 Red box represents exon, black line represents intron

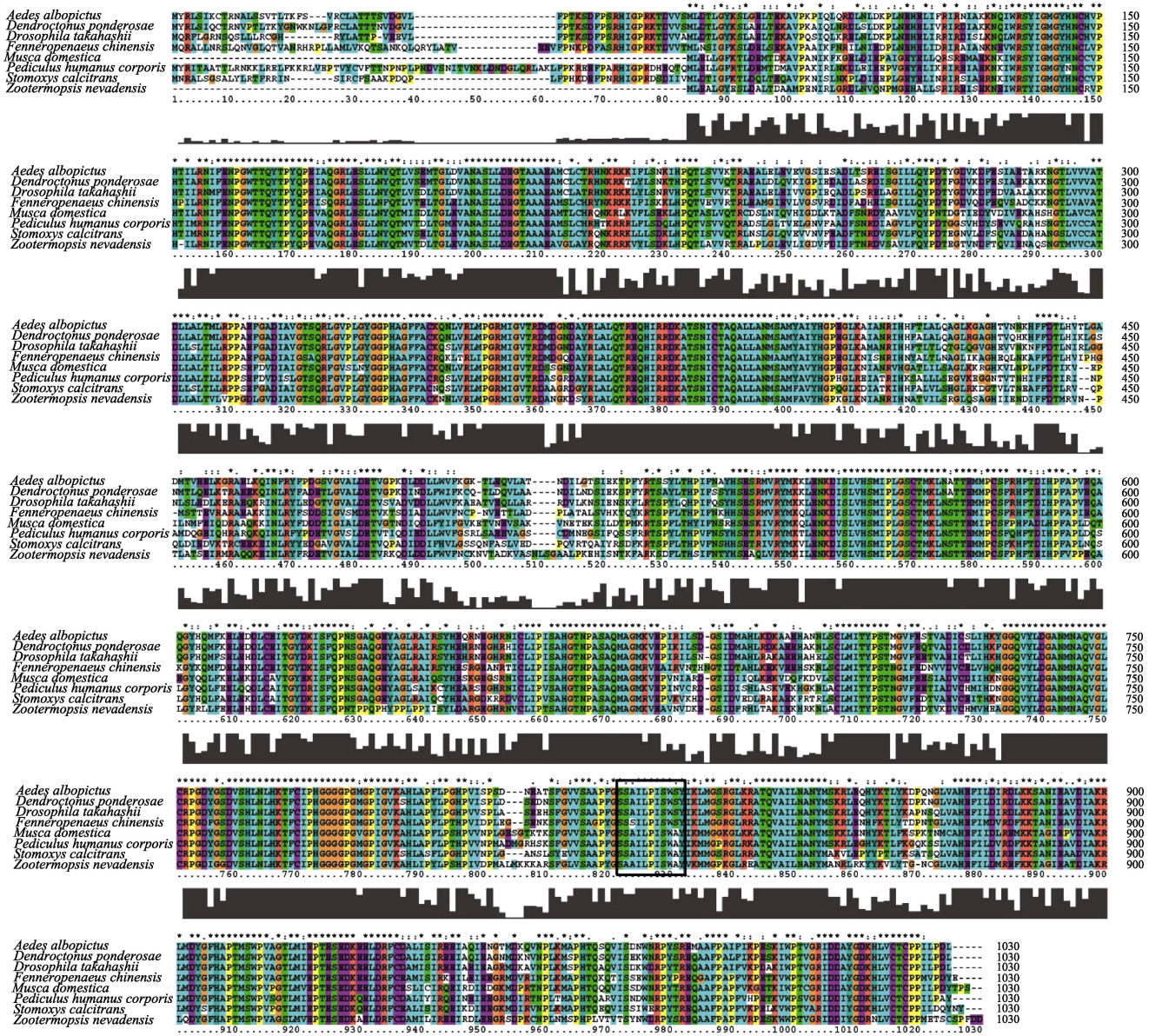


图 3 中国对虾与其他物种 GLDC 氨基酸的序列比对

Fig.3 Alignment analysis of amino acid sequence of *FcGLDC* from various species
黑色方框内为保守序列。Conserved sequence marked with black box

中, 中国对虾所属的甲壳亚门和家蝇 (*Musca domestica*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 等六足亚门的物种之间也体现了差异性(图 4)。

2.4 中国对虾 *FcGLDC* 基因的组织表达分析

FcGLDC 基因在中国对虾各组织中的相对表达

量分析结果显示, 该基因在鳃、肝胰腺和肌肉中均有表达, 其中, 肌肉中的表达量最高, 肝胰腺中次之, 鳃中的表达量最少, 但三者间无显著差异 ($P>0.05$) (图 5A)。

FcGLDC 基因在感染 WSSV 的对虾不同组织中的相对表达量变化分析结果显示, 在鳃中, 该基因的

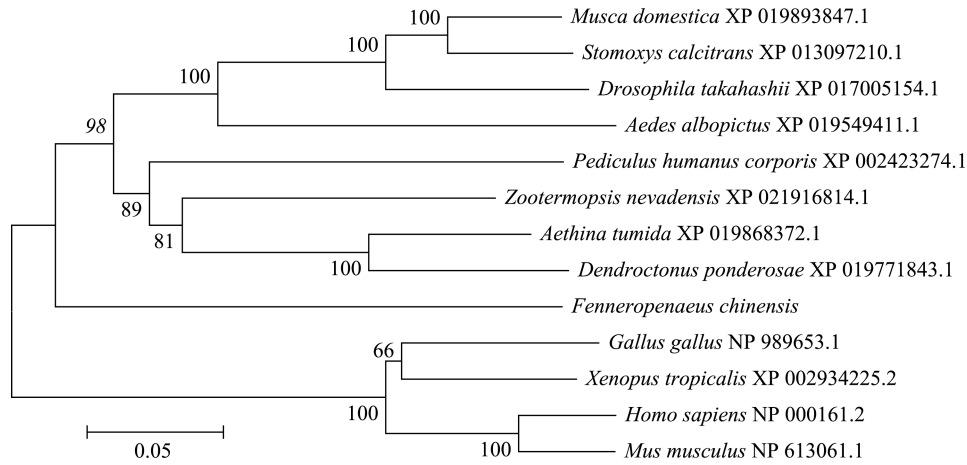


图 4 中国对虾与其他物种 GLDC 的系统进化分析
Fig.4 The phylogenetic tree analysis of FcGLDC from various species

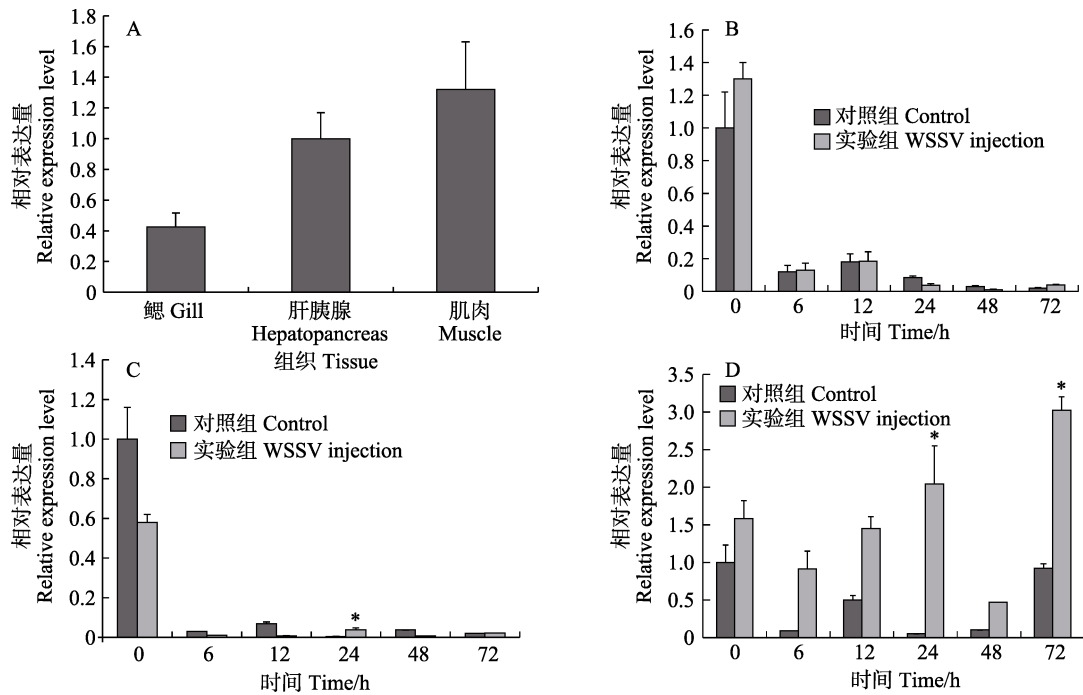


图 5 *FcGLDC* mRNA 的组织表达及其在感染后的组织表达(n=3)

Fig.5 The expression profiles of *FcGLDC* in hepatopancreas, gill, and muscle (n=3)

A: 正常组织; B: 感染后的肝胰腺; C: 感染后的鳃; D: 感染后的肌肉。*表示显著性差异
A: Control; B: Hepatopancreas after WSSV challenge; C: Gill after WSSV challenge; D: Muscle after WSSV challenge.
* represents significant difference

表达量在感染后的变化与对照组基本一致, 均为急剧下降, 在 24 h 时, 实验组表达量有小幅上升, 是对照组的 4.47 倍($P<0.05$)(图 5C)。在肝胰腺中, *GLDC* 基因的表达量同样在注射后明显降低, 在 12 h 有上升趋势, 而后在 48 h 时表达量达到最低。肝胰腺中, 各个时间点对照组与实验组的表达量差异均不显著 ($P>0.05$)(图 5B)。在肌肉组织中, 实验组 *GLDC* 基因的表达量在 24 h 和 72 h 时表现为 2 次峰值, 分别为对照组的 19.98 倍($P<0.05$)和 4.21 倍($P<0.05$)(图 5D)。

在 6 个时间点中, 实验组的表达量均高于对照组。

2.5 中国对虾 *FcGLDC* 基因 SNP 位点多态性分析及其关联分析

利用直接测序法, 在 *FcGLDC* 内部共发现 4 个可能的 SNP 位点, 并利用质谱法对这 4 个位点进行了成功分型。分型结果采用 PopGene 软件处理, 统计各位点的期望杂合度 H_e , 观测杂合度 H_o , 计算各位点多态信息含量 PIC, 并进行哈迪-温伯格平衡检验(表 2)。

由表 2 可知, *FcGLDC* 基因内的这 4 个 SNP 标记的 H_o 范围为 0.045~0.462, H_e 范围为 0.108~0.465。C1588-TG 和 C4406-CT 的 PIC 分别为 0.355 和 0.285, 为中度多态($0.25 < PIC < 0.5$), C4854-GA 和 C2967-AG 的 PIC 分别为 0.142 和 0.101, 属于低度多态($PIC < 0.25$)。哈温平衡分析结果显示, 只有 C1588-TG 符合哈迪-温伯格平衡检验, 且差异不显著。

表 2 SNP 位点多态性分析

Tab.2 The analysis of genetic polymorphism of SNPs

SNP 位点 SNP loci	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	PIC	哈温平衡 HW
C1588-TG	0.462	0.465	0.355	NS
C4406-CT	0.295	0.346	0.285	ND
C4854-GA	0.168	0.155	0.142	ND
C2967-AG	0.045	0.108	0.101	ND

NS: 差异不显著; ND: 差异显著

NS: No significant difference; ND: Significant difference

使用 SPSS 18.0 对基因型和抗 WSSV 性状之间的相关性进行卡方检验, 发现各位点与抗 WSSV 性状不相关($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 SNP 位点与抗 WSSV 性状的关联分析

Tab.3 The correlation analysis of SNPs between WSSV-sensitive group and WSSV-resistant group

SNP 位点 SNP loci	位置 Location	突变类型 Mutation type	卡方值 χ^2	显著性 P
C1588-TG	内含子 Intron	无义突变 Nonsense mutation	0.513	0.52
C4406-CT	ORF	同义突变 Synonymous mutation	1.538	0.42
C4854-GA	ORF	同义突变 Synonymous mutation	0.110	0.74
C2967-AG	内含子 Intron	无义突变 Nonsense mutation	3.875	0.14

3 讨论

本研究首次报道了对虾中的甘氨酸脱羧酶, 克隆的 *FcGLDC* 基因 ORF 全长为 2829 bp, 编码 942 个氨基酸。氨基酸序列分析表明, 其含有天冬氨酸氨基转移酶超家族的典型保守序列 SAAILPISW(A 也可为 S)。蛋白的进化分析显示, 该甘氨酸脱羧酶基因与其他节肢动物的甘氨酸脱羧酶基因明显聚为一类。ORF 序列分析、蛋白保守位点分析及蛋白的系统进化分析均表明 *FcGLDC* 基因与其他物种的甘氨酸脱羧酶具有较高的相似性, 因此, 确定本研究克隆的 *FcGLDC* 基因为中国对虾的甘氨酸脱羧酶基因。

本研究分析了中国对虾感染 WSSV 后 *GLDC* 基因在鳃、肝胰腺及肌肉组织中的表达特征, 结果显示, 该基因在 3 种组织中均有表达, 且在肌肉中的表达最高。感染后, 通过分析 *GLDC* 在 3 种组织中的表达规律发现, 肌肉对该基因最敏感, 说明 WSSV 对该基因有相对比较刺激。考虑到对虾感染 WSSV 后出现了运动机能减退的情况(Lightner *et al*, 1998), 推测肌肉中该基因的表达与对虾的运动不协调有关。

本研究通过直接测序法得到了中国对虾 *GLDC* 基因全长 DNA 序列, 该 DNA 序列全长为 5608 bp, 包含 11 个内含子, 鉴定的外显子-内含子边界都与经典的剪接供体(GT-)和受体序列(-AG)一致。开放阅读框起于第 1 个外显子, 止于第 12 个外显子。众所周知, 真核生物的基因在每个外显子和内含子的接头区, 都有一段高度保守的共有序列, 即每个内含子的 5'端起始的 2 个核苷酸均为 GT, 3'端的 2 个核苷酸均为 AG。但也有少数基因不符合 GT-AG 法则, 如在人类 135 kb 的 *GLDC* 基因含有的 24 个内含子中, 只发现有 1 个内含子不符合 GT-AG 法则(Takayanagi *et al*, 2000)。

本研究通过直接测序法定位了中国对虾 *GLDC* 基因 DNA 全长序列中 4 个可能的 SNP 位点, 并进一步通过飞行时间质谱法对这 4 个位点进行分型检测。4 个 SNP 位点有 2 个位于内含子上, 2 个位于外显子上。位于外显子上的突变位点均在密码子的第 3 位, 属于同义突变, 未对所编码氨基酸序列造成影响。位于内含子区域的突变在转录翻译过程中被剪切, 并不参与调控过程。位点多态性分析显示, 有 3 个位点不符合哈迪-温伯格平衡, 推测这可能是杂合子数量过多或不足造成的。位点与性状的关联分析表明, 获得的 SNP 位点均与性状不相关。关联分析研究时需要考虑群体分层的问题。由于群体存在遗传背景的差异, 使得来自不同亚群的个体中等位基因频率存在差异, 即存在群体分层, 关联分析时这些位点会造成假阳性(Emahazion *et al*, 2001)。因此, 加大样本量, 并尽量使用遗传背景一致或相似的群体如采用基于家系的群体进行关联研究就显得尤为重要。本研究选用家系材料作为验证群体, 遗传背景相近, 符合关联研究所用群体的要求。水产动物中, 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等物种的经济性状与 SNP 位点的关联分析时采用的群体多小于 200 个个体(刘福平等, 2009; 杜芳芳等, 2011; 李纪勤, 2012), 本研究采用的是感染早期死亡和后期死亡的各 48 尾个体进行关联分析, 数量上基本达到了关联分析群体数量的要求。

本研究首次在中国对虾中获得了甘氨酸脱羧酶基因的全长 cDNA 序列及其 DNA 序列, 分析了 WSSV 感染后该基因在不同组织中的表达特征, 并进行了基因内部 SNP 位点多态性分析及其关联分析, 研究结果将有助于为中国对虾抗 WSSV 育种提供理论依据和实践资料。

参 考 文 献

- Cao JW, Kong J, Luo K, *et al.* Immune priming response induced by heat-inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at different temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 128–136 [曹家旺, 孔杰, 罗坤, 等. 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 在不同温度下的免疫致敏反应. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 128–136]
- Du FF, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Effects of SNPs in *POU1F1* promoter on growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(6): 793–800 [杜芳芳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子区域 SNPs 对生长的影响. *水产学报*, 2011, 35(6): 793–800]
- Emahazion T, Feuk L, Jobs M, *et al.* SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends in Genetics*, 2001, 17(7): 407–413
- He YD, Zhang X. Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *RNA Biology*, 2012, 9(7): 1019–1029
- Kanekar S, Byler D. Characteristic MRI findings in neonatal nonketotic hyperglycinemia due to sequence changes in GLDC gene encoding the enzyme glycine decarboxylase. *Metabolic Brain Disease*, 2013, 28(4): 717–720
- Lightner DV. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique*, 1996, 15(2): 579–601
- Lightner DV, Redman RM. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 1998, 164(1–4): 201–220
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- Liu FP, Bai JJ, Ye X, *et al.* Cloning of *MC4R* gene and study on the association between SNPs of *MC4R* and growth trait in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fishery Science of China*, 2009, 16(6): 816–823 [刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 *MC4R* 基因克隆及其与生长相关的 SNPs 位点. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 816–823]
- Li JQ. Development, characterization and application of EST-SNP markers in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [李纪勤. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) EST-SNP 的开发及其应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- Tada K, Hayasaka K. Non-ketotic hyperglycemia: Clinical and biochemical aspects. *European Journal of Pediatrics*, 1987, 146(3): 221–227
- Takayanagi M, Kure S, Sakata Y, *et al.* Human glycine decarboxylase gene (GLDC) and its highly conserved processed pseudogene (psiGLDC): Their structure and expression, and the identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Human Genetics*, 2000, 106(3): 298
- 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
- Yang JY, Chang CI, Liu KF, *et al.* Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins. *Immunology Letters*, 2012, 148(1): 41–48
- Zhang WC, Shyhchang N, Yang H, *et al.* Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*, 2012, 148(1–2): 259
- Pang JF, Kong J, Meng XH, *et al.* Real-time PCR assay for quantifying WSSV load in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 782–787 [逢锦菲, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) “黄海 2 号”人工感染 WSSV 的荧光定量分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 782–787]
- Xin B, Liu XY, Wang W, *et al.* Coexistence of GABA and glycine in the neurons of the oral and interpolar subnuclei of the spinal trigeminal nucleus in the GAID67-GFP transgenic mouse. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2007, 23(1): 45–48 [信波, 刘翔宇, 汪伟, 等. GAD67-GFP 转基因小鼠三叉神经脊束核吻侧亚核和极间亚核内 GABA 和甘氨酸共存神经元的观察. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(1): 45–48]

(编辑 冯小花)

cDNA Cloning of the GLDC Gene in *Fenneropenaeus chinensis* and Its Expression and Functional Analyses after WSSV Infection

SHI Xiaoli^{1,2}, ZHANG Yingxue^{1,2}, MENG Xianhong^{1,2①}, KONG Jie^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2},
LUO Kun^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, CAO Jiawang^{1,2}, CHEN Baolong^{1,2}

(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 Glycine decarboxylase is a key glycolytic enzyme that is involved in both the glycolytic and gluconeogenic pathways. In this study, the glycine decarboxylase gene from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (*FcGLDC*) was cloned and sequenced for the first time. The full-length cDNA sequence of *FcGLDC* was 3481 bp long and contained a 17 bp 5'-UTR, an 86 bp 3'-UTR, and a 2829-bp open reading frame that encoded a 942 amino acid peptide with a calculated molecular mass of 104.66 kDa and theoretical isoelectric point of 6.51. The full-length *FcGLDC* DNA sequence was 4964 bp long and contained 12 exons and 11 introns. Multiple sequence alignment showed its high similarity with the glycine decarboxylase genes from other arthropod species: *Zootermopsis nevadensis* (71%), *Pediculus humanus corporis* (68%), and *Aedes albopictus* (68%). Phylogenetic analysis revealed that *FcGLDC* was in the same class with those from the other arthropods. The *FcGLDC* transcript showed the highest expression in muscles and the lowest expression in the gill. Stimulation of the shrimp with white spot syndrome virus (WSSV) resulted in changes in *FcGLDC* expression profiles in the hepatopancreas, gill, and muscles. In the gill, the transcript level was approximately 4.47-fold higher than that of the control group ($P<0.05$) at 24 h post injection (hpi). In the hepatopancreas, no significant difference was observed between the WSSV-challenged group and the control group ($P>0.05$). In the muscles, the transcript levels increased significantly, by approximately 19.98-fold at 24 hpi and 4.21-fold at 72 hpi, relative to the control group levels ($P<0.05$). Four single nucleotide polymorphisms were identified, using direct sequencing and time-of-flight mass spectrometry. Association analysis indicated that there was no significant association between the genotype and WSSV resistance ($P>0.05$). These results show that *FcGLDC* is inducible and may be involved in the shrimp's immune response to pathogens.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Glycine decarboxylase; Gene cloning; Expression; Association analysis

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180813001

http://www.yykxjz.cn/

陈胜军, 刘先进, 杨贤庆, 李来好, 黄卉, 吴燕燕, 李春生. 不同产地鲍鱼特征元素分析与主成分评价模型的建立. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 83-90

Chen SJ, Liu XJ, Yang XQ, Li LH, Huang H, Wu YY, Li CS. Analysis of characteristic elements and establishment of principal component evaluation model of abalone from different habitats. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 83-90

不同产地鲍鱼特征元素分析与主成分评价模型的建立*



陈胜军^{1①} 刘先进^{1,2} 杨贤庆¹ 李来好¹
黄卉¹ 吴燕燕¹ 李春生¹

(1. 农业农村部水产品加工重点实验室 国家水产品加工技术研发中心
中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 为了找出不同产地鲍鱼(*Haliotis Spp. Abalone*)的区域性差异,并探究一种有效的鲍鱼产地的鉴别方法,采用主成分分析法对广东、福建、山东、辽宁4个主要养殖省份鲍鱼样品肌肉中的特征元素(Na、K、Mg、Ca、Fe、Zn、Cu、Ni、As、Al、Mn、Cr、Se)进行分析。结果显示,鲍鱼样品的元素含量存在差异,Mn的变异程度最大,变异系数为74%,Ni次之,为65%,其次是Se(60%),其余元素的变异系数均高于10%。同时,通过对这些数据进行降维处理,有效地从13个特征元素中提取了6个元素作为主成分,累计方差贡献率达89.87%;同时发现Ca、Se、Na、Fe、Mn、K、Ni这7种元素是不同产地鲍鱼的特征元素,并建立了主成分综合评价模型: $F=0.2777F_1+0.2652F_2+0.1295F_3+0.1066F_4+0.0656F_5+0.0541F_6$ 。模型的建立可以为利用特征元素对不同产地鲍鱼的产地溯源提供一定的理论参考。

关键词 鲍鱼; 特征元素; 主成分评价; 不同产地

中图分类号 S932.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0083-08

中国是世界第一鲍鱼(*Haliotis Spp. Abalone*)养殖国家,养殖产量占全球的92%,从2006年的 2.16×10^4 t快速增长到2016年的 13.97×10^4 t,近10年的平均年增长率达到54.68%(农业部渔业渔政管理局,2007-2017)。鲍鱼由于其极高的食用价值和药用价值,深受国内外广大消费者喜爱。

不同产地的鲍鱼品质有很大差异,且难以区分,

因此导致市场上以次充好的现象屡见不鲜。刘艳青(2013)研究发现,春季荣成产地的鲍鱼与福建、青岛两地的鲍鱼可以进行区分;夏季时3个产地的鲍鱼难以区分;秋季时青岛产地的鲍鱼与其他两产地鲍鱼可以区分;冬季时福建产地的鲍鱼与青岛产地的鲍鱼差异显著。刘桃花等(2016)通过判别分析和聚类分析对鲍鱼年龄进行了分类。贾亮亮等(2009、2014)对大连、

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院基本科研业务费)(2016HY-ZD0802)、2017年国家农产品质量安全风险评估计划(GJFP201700904)和农业部财政重大专项(NFZX2013)共同资助[This work was supported by the Special Funds for the Basic Scientific Research Operations of the Central Public Welfare Research Institutes (Basic Scientific Research Operating Expenses of China Academy of Fishery Sciences)(2016HY-ZD0802), 2017 National Agricultural Product Quality and Safety Risk Assessment Plan(GJFP201700904), Major Financial Projects of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China(NFZX2013)].

① 通讯作者: 陈胜军, 研究员, E-mail: chenshengjun@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2018-08-13, 收修改稿日期: 2018-09-11

山东、澳洲 3 个不同产地鲍鱼中若干元素含量进行了测定分析并建立了 FTIR 图谱。孙建民等(2010)建立了大连、山东、澳洲 3 个产地鲍鱼的 HPLC 指纹图谱。目前只能对鲍鱼的外观和微量元素进行简单的对比分析,很难找出其差异性,而通过大量的数据和主成分分析方法可以建立综合模型,找出主成分元素,为产地溯源建立基础。

区分不同产地的产品需要测定大量的数据,同时需要采用合适的工具对所得数据进行处理。统计分析方法在各个领域都有广泛应用,具有节省人工、提高速率、科学可靠、全面系统等优点。其中的主成分分析法是最常用的一种统计分析方法(Gupta *et al*, 2018; Alharbi, 2018),通过数据降维处理,可以找出数据中的代表性指标,并且独立成新的变量,并获得变量间的线性关系(姜雪等, 2017),目前已广泛应用于食品(黄鸾玉等, 2018)、药品(关倩倩等, 2018)、水产品(李来好等, 2012; 韩青鹏等, 2017; 李忠义等, 2009; 李达等, 2017)等领域。目前,我国不同产地的鲍鱼品质上的差异尚未实现量化评价,鲍鱼产品价格与其品质不一致,导致中国鲍鱼在国际市场上缺乏竞争力。另外,相较于茶叶、水果等产品,鲍鱼尚没有完善的溯源体系。中国鲍鱼养殖主要集中于福建、山东、广东以及辽宁四省。本研究通过对这 4 个产地鲍鱼的 13 种常量元素与微量元素进行统计分析,建立基于主成分分析的综合评价模型,旨在为不同产地鲍鱼的营养品质进行评价以及产地溯源提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活鲍鱼样品于 2017 年 6 月分别采集自福建、山东、广东、辽宁 4 个鲍鱼主要养殖省份,其中样品 1~6 号采自广东省,样品 7~11 号采自福建省,样品 12~15 号采自山东省,样品 16~18 号采自辽宁省,规格大小在 20 粒/kg 左右(带壳)。HCl、H₃BO₃、NaOH、K₂SO₄、AgNO₃ 等均为分析纯, HNO₃ 为优级纯,购于广州左克科技发展有限公司;元素标准溶液为 10 μg/L,购于国家标准测试中心;实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

Agilent 7900 型电感耦合等离子体质谱仪(安捷伦公司,美国);CEM MARS5 型高压高通量微波消解装置(CEM 公司,美国);Milli-Q 型超纯水系统(密理博公司,美国);GB204 型电子天平(Mettler 公司,瑞士)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的处理

将采集的鲍鱼去壳、去内脏,

取腹足肌肉搅碎混匀制成样品急冻运回实验室,并于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 常量及微量元素含量的测定 按照 SN/T 2208-2008《水产品中钠、镁、铝、钙、铬、铁、镍、铜、锌、砷、镉、钼、镉、铅、汞、硒的测定微波消解—电感耦合等离子体—质谱法》的方法,使用微波消解装置进行消解,采用电感耦合等离子体质谱仪在标准模式下测定 13 种元素。

1.3.3 数据处理分析 采用 SPSS 20.0 和 Excel 软件进行数据分析处理。将 Na、K、Mg、Ca、Fe、Zn、Cu、Ni、As、Al、Mn、Cr 和 Se 这 13 种元素数据,运用 SPSS 20.0 软件进行相关性分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 鲍鱼中常量与微量元素含量

鲍鱼样品中 13 种元素含量如表 1 所示。18 个鲍鱼样品之间元素含量变异幅度均较大,其中, Mn 的变异程度最大,变异系数为 74%, Ni 次之,为 65%,其次是 Se (60%),其余元素的变异系数均高于 10%,表明所选鲍鱼样品之间的元素差异明显,适于进行主成分分析(白沙沙等, 2012)。

2.2 数据标准化处理与相关性分析

由于原始数据不是在同一区域范围内,因此需要对原始数据进行标准化数据处理。首先,将原始数据进行标准化处理,计算出各元素的特征值和方差贡献率,并提取累计方差贡献率大于 85%的指标作为主成分对象;然后主成分载荷系数矩阵数值除以主成分相应特征值的平方根,得到各主成分的特征向量值,进而得到各主成分的函数表达式,得到主成分综合模型(洗燕萍等, 2016);最后根据各主成分得分和综合得分,确定排名,选择出不同产地鲍鱼的特征元素。结果见表 2。

对经标准化处理后的数据进行不同元素之间的相关性分析,从而衡量 2 个变量因素的相关密切程度。元素之间的相关性分析结果见表 3。

由表 3 可知,18 个鲍鱼样品中 Na 含量与 Mg 含量呈极显著正相关;K 含量与 Zn 含量呈显著正相关;Mg 含量与 Ca 含量呈显著正相关;Ca 含量与 Fe、Cu、Mn、Cr 含量呈显著正相关;Fe 含量与 Ni 含量呈显著正相关;Zn 含量与 Cr 含量呈显著正相关,与 Se 含量呈极显著正相关;Cu 含量与 Ni、Cr、Se 含量呈显著正相关;Ni 含量与 Cr 含量呈极显著正相关,与 Se 含量呈显著正相关;As 含量与 Mn 含量呈显著正

表 1 鲍鱼中常量与微量元素含量(mg/100 g)
Tab. 1 The content of constant and trace elements in abalone (mg/100 g)

序号 Number	Na	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu	Ni	As	Al	Mn	Cr	Se
1	308.41	259.41	55.85	2.99	2.60	0.81	0.39	0.04	0.19	0.13	0.05	0.01	0.02
2	319.66	259.56	55.65	6.04	7.00	1.17	1.27	0.31	0.23	0.26	0.12	0.05	0.04
3	238.64	301.17	51.57	3.01	5.21	0.95	0.46	0.10	0.23	0.09	0.07	0.01	0.02
4	254.89	274.65	55.43	3.43	4.03	0.64	0.94	0.14	0.13	0.21	0.07	0.01	0.02
5	157.40	311.88	41.87	2.40	2.28	1.00	0.19	0.10	0.10	0.10	0.09	0.01	0.01
6	273.73	320.06	55.92	3.10	3.33	1.18	0.45	0.12	0.30	0.10	0.08	0.03	0.03
7	348.26	280.53	61.35	3.98	5.97	0.81	0.79	0.08	0.29	0.67	0.08	0.02	0.01
8	391.63	250.44	65.10	4.06	5.12	0.70	0.79	0.07	0.30	0.52	0.09	0.01	0.01
9	226.34	222.06	52.08	3.19	4.71	0.70	0.64	0.09	0.31	0.25	0.06	0.01	0.01
10	257.57	280.97	43.14	3.75	7.08	0.71	0.58	0.06	0.33	0.33	0.03	0.03	0.01
11	351.86	243.95	61.66	3.60	2.73	0.61	0.42	0.06	0.34	0.22	0.06	0.02	0.01
12	254.71	255.27	62.25	4.68	6.82	0.75	0.39	0.12	0.40	0.34	0.32	0.01	0.01
13	280.75	243.78	63.20	4.80	7.06	0.76	0.43	0.12	0.41	0.28	0.34	0.01	0.01
14	554.06	231.93	69.42	3.95	3.33	0.70	0.33	0.09	0.28	0.13	0.17	0.01	0.01
15	293.29	278.79	58.59	3.60	8.04	0.63	0.52	0.28	0.36	0.27	0.14	0.02	0.01
16	209.00	214.41	48.35	3.76	4.40	0.75	0.43	0.04	0.15	0.30	0.13	0.01	0.01
17	436.00	222.74	74.52	5.00	4.05	0.89	0.53	0.06	0.23	0.27	0.15	0.02	0.01
18	251.34	250.94	57.47	3.87	7.09	0.68	0.46	0.18	0.15	0.25	0.05	0.03	0.01
\bar{x}	300.42	261.25	57.41	3.85	5.05	0.80	0.56	0.11	0.26	0.26	0.12	0.02	0.01
s	92.06	30.49	8.36	0.86	1.83	0.17	0.25	0.07	0.09	0.15	0.09	0.01	0.01
变异系数 Coefficient of variation	31%	12%	15%	22%	36%	21%	46%	65%	35%	56%	74%	56%	60%

表 2 标准化数据
Tab. 2 Standardized data

序号 Number	Na	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu	Ni	As	Al	Mn	Cr	Se
1	0.0868	-0.06042	-0.18676	-0.99131	-1.34086	0.04527	-0.65408	-0.99353	-0.78922	-0.89952	-0.77071	-0.69795	0.64933
2	0.209	-0.0555	-0.21067	2.54494	1.06995	2.14083	2.81103	2.60987	-0.35545	-0.01512	0.03854	2.89151	2.98691
3	-0.67107	1.30914	-0.69844	-0.96812	0.08919	0.86021	-0.37845	-0.19277	-0.35545	-1.17165	-0.5395	-0.69795	0.64933
4	-0.49455	0.43939	-0.23698	-0.48116	-0.55735	-0.9443	1.51161	0.34106	-1.43987	-0.35527	-0.5395	-0.69795	0.64933
5	-1.55353	1.66038	-1.85808	-1.67537	-1.51619	1.15126	-1.44161	-0.19277	-1.7652	-1.10362	-0.30828	-0.69795	-0.51946
6	-0.28991	1.92865	-0.1784	-0.86377	-0.94088	2.19904	-0.41783	0.07414	0.40365	-1.10362	-0.42389	1.09678	1.81812
7	0.51967	0.63223	0.47076	0.15652	0.5056	0.04527	0.92097	-0.45969	0.2952	2.77416	-0.42389	0.19941	-0.51946
8	0.99077	-0.3546	0.91908	0.24928	0.03988	-0.59504	0.92097	-0.59315	0.40365	1.75369	-0.30828	-0.69795	-0.51946
9	-0.80468	-1.28534	-0.63747	-0.75942	-0.18477	-0.59504	0.33032	-0.32623	0.51209	-0.08315	-0.6551	-0.69795	-0.51946
10	-0.46544	0.64666	-1.70625	-0.11015	1.11378	-0.53683	0.09407	-0.72661	0.72897	0.4611	-1.00192	1.09678	-0.51946
11	0.55877	-0.56744	0.50782	-0.28406	-1.26963	-1.11893	-0.53595	-0.72661	0.83742	-0.28724	-0.6551	0.19941	-0.51946
12	-0.49651	-0.19619	0.57836	0.96812	0.97132	-0.30399	-0.65408	0.07414	1.48807	0.52913	2.35066	-0.69795	-0.51946
13	-0.21365	-0.57302	0.69193	1.10725	1.10282	-0.24578	-0.49658	0.07414	1.59651	0.12094	2.58187	-0.69795	-0.51946
14	2.75515	-0.96165	1.43553	0.12174	-0.94088	-0.59504	-0.89034	-0.32623	0.18676	-0.89952	0.61657	-0.69795	-0.51946
15	-0.07744	0.57517	0.1408	-0.28406	1.63977	-1.00251	-0.14219	2.20949	1.0543	0.05291	0.26975	0.19941	-0.51946
16	-0.99303	-1.53623	-1.08339	-0.09855	-0.35462	-0.30399	-0.49658	-0.99353	-1.22299	0.25701	0.15414	-0.69795	-0.51946
17	1.47274	-1.26304	2.04524	1.33914	-0.54639	0.51095	-0.10282	-0.72661	-0.35545	0.05291	0.38535	0.19941	-0.51946
18	-0.53312	-0.3382	0.00691	0.02899	1.11926	-0.71146	-0.37845	0.8749	-1.22299	-0.08315	-0.77071	1.09678	-0.51946

表3 18个鲍鱼样品元素含量的相关性
Tab. 3 Correlation coefficients among element content of 18 kind of abalone sample

序号 Number	Na	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu	Ni	As	Al	Mn	Cr	Se
Na	1												
K	-0.382	1											
Mg	0.812**	-0.456	1										
Ca	0.395	-0.446	0.520*	1									
Fe	-0.136	-0.034	0.024	0.528*	1								
Zn	-0.145	0.488*	-0.185	0.131	-0.157	1							
Cu	0.101	-0.044	0.067	0.537*	0.356	0.168	1						
Ni	-0.094	0.211	-0.007	0.403	0.581*	0.234	0.482*	1					
As	0.259	-0.108	0.374	0.324	0.446	-0.218	-0.041	0.060	1				
Al	0.170	-0.212	0.253	0.382	0.455	-0.290	0.419	-0.073	0.315	1			
Mn	0.121	-0.274	0.429	0.517*	0.333	-0.039	-0.191	0.133	0.512*	0.090	1		
Cr	0.039	0.192	-0.076	0.487*	0.380	0.470*	0.527*	0.590**	0.012	0.057	-0.246	1	
Se	-0.071	0.370	-0.145	0.238	-0.033	0.741**	0.555*	0.490*	-0.196	-0.322	-0.178	0.603**	1

*: 相关性显著($P<0.05$); **: 相关性极显著($P<0.01$)

*: Significant correlation ($P<0.05$); **: Highly significant correlation ($P<0.01$)

相关; Cr 含量与 Se 含量呈极显著正相关。说明这些样品元素含量之间存在着密切的联系,但由于信息重叠,难以看出整体关联性,因此,使用主成分分析法将这些数据进行降维处理,将复杂的数据简单化,有助于得出元素之间的关联规律。

2.3 主成分分析

将 18 个鲍鱼样品中的常量与微量元素含量数据进行标准化处理后,对其进行主成分分析。由表 4 可知,第 1 主成分的特征值为 3.610,方差贡献率为 27.769%,累计方差贡献率为 27.769%;第 2 主成分特征值为 3.447,方差贡献率为 26.516%;第 3、4、5、6 主成分的方差贡献率分别为 12.951%、10.662%、6.563%和 5.411%。当主成分的个数为 6 时,累计方差贡献率为 89.872%(>85%),即意味着可以通过前 6 个主成分来解释全部样品的 13 个元素指标的绝大部分信息,因此选择前 6 个主成分对鲍鱼元素含量进行综合评价。

主成分载荷系数矩阵反映了各元素对主成分的影响程度。由表 5 可知,在第 1 主成分中, Ca 有较大的正系数值,说明第 1 主成分可以有效反映 Ca 的信息;在第 2 主成分中, Se 有较大的正系数值,说明第 2 主成分可以有效反映 Se 的信息;在第 3 主成分中, Na 有较大的正系数值, Fe 有较大的负系数值,说明第 3 主成分可以有效反映 Na、Fe 的信息;第 4 主成分中, Mn 有较大的正系数值,说明第 4 主成分

可以有效反映 Mn 的信息;第 5 主成分中, K 有较大的正系数值,说明第 5 主成分可以有效反映 K 的信息;第 6 主成分中, Ni 有较大的负系数值,说明第 6 主成分可以有效反映 Ni 的信息。根据上面结果可以确定, Ca、Se、Na、Fe、Mn、K 和 Ni 这 7 种元素是不同产地鲍鱼的特征元素。

表4 主成分分析特征值及方差贡献率
Tab. 4 Principal component analysis eigenvalue and variance contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate(%)	累计方差贡献率 Cumulative variance contribution rate(%)
1	3.610	27.769	27.769
2	3.447	26.516	54.285
3	1.684	12.951	67.237
4	1.386	10.662	77.898
5	0.853	6.563	84.461
6	0.703	5.411	89.872
7	0.488	3.755	93.627
8	0.408	3.141	96.768
9	0.138	1.058	97.826
10	0.114	0.880	98.706
11	0.106	0.814	99.520
12	0.052	0.402	99.922
13	0.010	0.078	100.000

表 5 主成分载荷系数矩阵
Tab. 5 Principal component loading coefficient matrix

元素 Element	第 1 主成分 First principal component	第 2 主成分 Second principal component	第 3 主成分 Third principal component	第 4 主成分 Fourth principal component	第 5 主成分 Fifth principal component	第 6 主成分 Sixth principal component
Na	0.460	-0.381	0.667	-0.099	0.247	-0.258
K	-0.370	0.588	-0.207	0.242	0.549	-0.068
Mg	0.596	-0.482	0.514	0.096	0.123	-0.119
Ca	0.920	0.064	0.142	0.047	-0.205	0.205
Fe	0.672	0.127	-0.660	0.042	-0.039	-0.118
Zn	-0.030	0.727	0.338	0.343	0.159	0.382
Cu	0.579	0.498	0.037	-0.505	-0.030	0.127
Ni	0.504	0.598	-0.206	0.179	-0.215	-0.402
As	0.528	-0.343	-0.261	0.374	0.453	-0.096
Al	0.523	-0.265	-0.334	-0.506	0.336	0.351
Mn	0.477	-0.372	-0.111	0.689	-0.186	0.269
Cr	0.462	0.718	0.056	-0.131	0.082	-0.168
Se	0.157	0.853	0.350	0.113	-0.008	0.078

2.4 特征元素主成分评价模型

由表 5 的主成分载荷系数矩阵数值除以其相应特征值的平方根, 可得到各主成分的特征向量值, 见表 6, 与标准化的元素含量数据相乘后即可得到 6 个主成分的元素函数表达式(式中 Z_{Na} 表示标准化后的 Na 含量数据, 其他函数同理)。

$$\begin{aligned}
 F_1 &= 0.2421Z_{Na} - 0.1947Z_K + 0.3137Z_{Mg} + 0.4842Z_{Ca} + \\
 & 0.3537Z_{Fe} - 0.0158Z_{Zn} + 0.3047Z_{Cu} + 0.2653Z_{Ni} + \\
 & 0.2779Z_{As} + 0.2753Z_{Al} + 0.2511Z_{Mn} + 0.2432Z_{Cr} + \\
 & 0.0826Z_{Se} \\
 F_2 &= -0.2052Z_{Na} + 0.3167Z_K - 0.2596Z_{Mg} + 0.0345Z_{Ca} + \\
 & 0.0684Z_{Fe} + 0.3916Z_{Zn} + 0.2682Z_{Cu} + 0.3221Z_{Ni} - \\
 & 0.1847Z_{As} - 0.1427Z_{Al} - 0.2004Z_{Mn} + 0.3867Z_{Cr} + \\
 & 0.4594Z_{Se} \\
 F_3 &= 0.5140Z_{Na} - 0.1595Z_K + 0.3961Z_{Mg} + 0.1094Z_{Ca} - \\
 & 0.5086Z_{Fe} + 0.2605Z_{Zn} + 0.0285Z_{Cu} - 0.1587Z_{Ni} - \\
 & 0.2011Z_{As} - 0.2574Z_{Al} - 0.0855Z_{Mn} + 0.0432Z_{Cr} + \\
 & 0.2697Z_{Se} \\
 F_4 &= -0.0841Z_{Na} + 0.2056Z_K + 0.0815Z_{Mg} + 0.0399Z_{Ca} + \\
 & 0.0357Z_{Fe} + 0.2913Z_{Zn} - 0.4290Z_{Cu} + 0.1520Z_{Ni} + \\
 & 0.3177Z_{As} - 0.4298Z_{Al} + 0.5852Z_{Mn} - 0.1113Z_{Cr} + \\
 & 0.0960Z_{Se} \\
 F_5 &= 0.2674Z_{Na} + 0.5944Z_K + 0.1332Z_{Mg} - 0.2220Z_{Ca} - \\
 & 0.0422Z_{Fe} + 0.1722Z_{Zn} - 0.0325Z_{Cu} - 0.2328Z_{Ni} + \\
 & 0.4905Z_{As} + 0.3638Z_{Al} - 0.2014Z_{Mn} + 0.0888Z_{Cr} - \\
 & 0.0087Z_{Se} \\
 F_6 &= -0.3077Z_{Na} - 0.0811Z_K - 0.1419Z_{Mg} + 0.2445Z_{Ca} - \\
 & 0.1407Z_{Fe} + 0.4556Z_{Zn} + 0.1515Z_{Cu} - 0.4795Z_{Ni} - \\
 & 0.1145Z_{As} + 0.4186Z_{Al} + 0.3208Z_{Mn} - 0.2004Z_{Cr} + \\
 & 0.0930Z_{Se}
 \end{aligned}$$

将各主成分的方差贡献率作为系数与主成分的乘积之和, 得出主成分综合模型为:

$$F = 0.2777F_1 + 0.2652F_2 + 0.1295F_3 + 0.1066F_4 + 0.0656F_5 + 0.0541F_6$$

其中 F_1 表示第 1 主成分, $F_2 \sim F_6$ 表示第 2 至第 6 主成分。

根据主成分的函数表达式计算出 18 个鲍鱼样品各主成分得分及排序情况, 再以主成分综合模型函数表达式计算出 18 个鲍鱼样品元素含量的综合得分和综合排序(表 7)。由表 6 可知, 综合排名在前 6 位的是 2 号样品、6 号样品、17 号样品、13 号样品、7 号样品以及 15 号样品, 排名最低的是 5 号样品。

2 号样品 F_1 、 F_2 值、综合排名都是第一, F_3 、 F_4 、 F_6 值排名居中, F_5 值靠后, 表明其主要优势体现在 F_1 和 F_2 上, 即 Ca、Se 含量较高, K 含量较低。6 号样品的 F_2 、 F_3 、 F_4 、 F_5 值排名靠前, F_1 值排名靠后, 表明其主要优势是在 F_2 、 F_3 、 F_4 、 F_5 上, 即 Se、Na、Mn、K 含量较高, 而 Ca 含量较低。7 号样品, F_1 、 F_5 、 F_6 值排名靠前, F_4 值最低, 表明其主要优势是在 F_1 、 F_5 、 F_6 , 即 Ca、K 含量较高, Mn、Ni 含量较低。12 号和 13 号样品 F_1 、 F_4 、 F_6 值排名都靠前, F_5 排名都居中, F_2 、 F_3 排名都靠后, 表明其主要优势是在 F_1 、 F_4 、 F_6 上, 即 Ca、Mn 含量较高, Se、Na、Ni 含量较低。贾亮亮等(2009)通过火焰原子吸收光谱法对大连、青岛、河北 3 个产地的鲍鱼若干元素含量进行测定后发现, 3 个产地鲍鱼的 K、Na、Ca、Mg、Fe、P 含量存在显著差异($P < 0.01$), Zn, Cu 无显著性差异($P < 0.5$)。这与本研究的特征元素相符, 其中 Fe、P 未表现出明显优势可能是由于采样地点、品种以及检测方法差异导致的。

表6 特征向量值
Tab. 6 Characteristic vector values

元素 Element	第1主成分 First principal component	第2主成分 Second principal component	第3主成分 Third principal component	第4主成分 Fourth principal component	第5主成分 Fifth principal component	第6主成分 Sixth principal component
Na	0.2421	-0.2052	0.5140	-0.0841	0.2674	-0.3077
K	-0.1947	0.3167	-0.1595	0.2056	0.5944	-0.0811
Mg	0.3137	-0.2596	0.3961	0.0815	0.1332	-0.1419
Ca	0.4842	0.0345	0.1094	0.0399	-0.222	0.2445
Fe	0.3537	0.0684	-0.5086	0.0357	-0.0422	-0.1407
Zn	-0.0158	0.3916	0.2605	0.2913	0.1722	0.4556
Cu	0.3047	0.2682	0.0285	-0.429	-0.0325	0.1515
Ni	0.2653	0.3221	-0.1587	0.152	-0.2328	-0.4795
As	0.2779	-0.1847	-0.2011	0.3177	0.4905	-0.1145
Al	0.2753	-0.1427	-0.2574	-0.4298	0.3638	0.4186
Mn	0.2511	-0.2004	-0.0855	0.5852	-0.2014	0.3208
Cr	0.2432	0.3867	0.0432	-0.1113	0.0888	-0.2004
Se	0.0826	0.4594	0.2697	0.0960	-0.0087	0.0930

表7 主成分得分及排序
Tab. 7 Principal component score and sort

序号 Number	F_1	排序 Sort	F_2	排序 Sort	F_3	排序 Sort	F_4	排序 Sort	F_5	排序 Sort	F_6	排序 Sort	F	排序 Sort
1	-2.2203	17	-0.1351	9	1.3057	3	-0.1547	9	-0.1273	10	0.0157	10	-0.5073	15
2	3.9778	1	5.1385	1	0.9932	5	-0.2110	10	-0.9024	16	0.3366	8	2.5325	1
3	-1.9266	16	1.2490	3	-0.1736	9	0.8318	5	0.3626	6	-0.0454	12	-0.1163	9
4	-0.8933	13	0.8461	5	0.1277	8	-1.2786	16	-0.8579	15	-0.2105	13	-0.2111	12
5	-4.2228	18	1.2043	4	-0.4269	10	0.8851	4	-0.2128	11	0.5421	5	-0.7988	18
6	-1.2763	14	2.8227	2	1.1828	4	1.5764	3	1.6150	2	0.0874	9	0.8260	2
7	1.3079	5	-0.3989	10	-0.6450	12	-1.7215	18	1.8679	1	0.9729	2	0.1655	5
8	1.1696	7	-1.4915	15	0.2258	7	-1.5066	17	0.9659	3	0.4822	6	-0.1127	8
9	-0.8118	12	-0.8248	11	-0.7398	13	-0.8072	13	-0.6295	14	0.0060	11	-0.6670	16
10	-0.2871	10	0.5824	6	-1.8909	17	-0.9636	15	0.9128	4	-0.2126	14	-0.2245	13
11	-0.5252	11	-1.4827	14	0.8321	6	-0.4513	11	0.4507	5	-0.8459	15	-0.4956	14
12	1.6737	3	-1.6111	16	-1.2992	16	1.9739	2	-0.0851	9	0.8103	3	0.1180	7
13	1.9880	2	-1.7473	17	-1.0172	15	2.1868	1	-0.3917	13	0.6945	4	0.2019	4
14	0.4287	8	-2.4178	18	2.4724	1	0.6525	7	-0.0458	8	-1.1695	16	-0.1987	11
15	1.2955	6	0.1269	8	-1.9369	18	0.6863	6	0.1557	7	-1.9810	18	0.1188	6
16	-1.3075	15	-0.9516	12	-0.4642	11	-0.7447	12	-1.6859	18	1.2610	1	-0.7973	17
17	1.4852	4	-1.4665	13	2.3319	2	-0.0826	8	-0.3087	12	0.4272	7	0.3195	3
18	0.1444	9	0.5574	7	-0.8779	14	-0.8707	14	-1.0832	17	-1.1710	17	-0.1530	10

3 结论

本研究通过对18个不同产地鲍鱼样品的13种常量与微量元素的测定并进行主成分分析,有效地从13个元素中提取了6个元素作为主成分,累计方差贡献率达89.872%;经分析,得出Ca、Se、Na、Fe、

Mn、K和Ni这7种元素是不同产地鲍鱼的特征元素。建立了基于特征元素主成分分析的综合评价模型: $F=0.2777F_1+0.2652F_2+0.1295F_3+0.1066F_4+0.0656F_5+0.0541F_6$

为科学评价鲍鱼营养品质以及鲍鱼产地溯源提供了一定的理论参考。

本研究虽然对鲍鱼的 13 个常量元素及微量元素含量进行了主成分分析, 但其对营养成分评价并不全面, 对产地溯源只有一定参考作用, 下一步可以结合脂肪酸、氨基酸等营养成分进行主成分分析、聚类分析等数据分析, 构建出更为准确、简便、快捷的产地溯源模型。

参 考 文 献

- Alharbi T. Energy resolution improvement of CdTe detectors by using the principal component analysis technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 2018, 882: 114–116
- Bai SS, Bi JF, Wang P, *et al.* Fruit quality analysis of different apple varieties. *Food Science*, 2012, 33(17): 68–72 [白沙沙, 毕金峰, 王沛, 等. 不同品种苹果果实品质分析. *食品科学*, 2012, 33(17): 68–72]
- Gupta A, Barbu A. Parameterized principal component analysis. *Pattern Recognition*, 2018, 78(6): 215–227
- Guan QQ, Zong AZ, Qi YT, *et al.* Cultivars selection of yam for diabetes based on principal component analysis. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(4): 38–43 [关倩倩, 宗爱珍, 祁瑜婷, 等. 基于主成分分析的糖尿病专用山药品种筛选. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 38–43]
- Huang LY, Wu XQ, Pang FY, *et al.* Comprehensive evaluation of nutritional value of aquatic products using principal component analysis. *Food Science and Technology*, 2018, 43(2): 175–179 [黄鸾玉, 吴祥庆, 庞燕飞, 等. 主成分分析法综合评价水产品营养价值. *食品科技*, 2018, 43(2): 175–179]
- Han QP, Lu HJ, Chen XJ, *et al.* Morphological analysis of beaks of *Uroteuthis chinensis* in the northern South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(4): 122–130 [韩青鹏, 陆化杰, 陈新军, 等. 南海北部海域中国枪乌贼角质颚的形态学分析. *南方水产科学*, 2017, 13(4): 122–130]
- Jia LL, Sun JM, Chang D, *et al.* The Analysis of elements content of abalone from different places. *Studies of Trace Elements and Health*, 2009, 26(3): 37–38 [贾亮亮, 孙建民, 常丹, 等. 不同产地鲍鱼中若干元素含量的分析. *微量元素与健康研究*, 2009, 26(3): 37–38]
- Jia LL. Analysis of FTIR spectra of abalone from different areas. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2014, 20(1): 10–12 [贾亮亮. 不同产地鲍鱼的 FTIR 谱图分析. *分析测试技术与仪器*, 2014, 20(1): 10–12]
- Jiang X, Liu N, Sun Y, *et al.* Application of statistical analysis methods in food quality evaluation. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(1): 13–19 [姜雪, 刘楠, 孙永, 等. 统计分析方法在食品品质评价中的应用. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(1): 13–19]
- Liu YQ. Studies on the original and seasonal analysis of abalone (*Halotis discus hannai* Ino) and anti-obesity activity of phospholipids from abalone viscera. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 1–73 [刘艳青. 皱纹盘鲍地域及季节性差异分析及内脏磷脂减肥活性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–73]
- Liu TH, Hou MZ. Discriminant analysis and cluster analysis in the classification of abalone age. *Journal of Shaoyang University (Natural Science Edition)*, 2016, 13(1): 14–18 [刘桃花, 侯木舟. 鲍鱼年龄分类中的判别分析和聚类分析. *邵阳学院学报(自然科学版)*, 2016, 13(1): 14–18]
- Li D, Liu CL, Li A, *et al.* Principal component analysis of the morphometric traits of the cuttlebone of *Sepia esculenta* at early developmental stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 41–49 [李达, 刘长琳, 李昂, 等. 金乌贼(*Sepia esculenta*)早期发育阶段内壳形态学指标的主成分分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 41–49]
- Li LH, Wang GC, Hao SX, *et al.* Discrimination of tilapia at different frozen storage time by electronic nose. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(4): 1–6 [李来好, 王国超, 郝淑贤, 等. 电子鼻检测冷冻罗非鱼肉的研究. *南方水产科学*, 2012, 8(4): 1–6]
- Li ZY, Lin Q, Dai FQ, *et al.* Food quality analysis of some forage fish in Yellow Sea with principal component method. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 64–67 [李忠义, 林群, 戴芳群, 等. 主成分分析对黄海 6 种主要饵料鱼类的质量分析评价. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 64–67]
- Ministry of agriculture fishery administration bureau. China fishery statistics yearbook of 2007–2017. Beijing: China Agriculture Press, 2007–2017, 32–38 [农业部渔业渔政管理局. 2007–2017 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2007–2017, 32–38]
- Sun JM, Jia LL, Ma Y, *et al.* Fingerprint of abalone from different areas by HPLC. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2010, 30(6): 676–681 [孙建民, 贾亮亮, 马勇, 等. 不同产地鲍鱼的 HPLC 指纹图谱. *河北大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(6): 676–681]
- Xian YP, Dong H, Luo DH, *et al.* Quality evaluation modeling of dried shark fin products based on principal component analysis. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(1): 210–217 [洗燕萍, 董浩, 罗东辉, 等. 基于主成分分析法的鱼翅干制品品质评价模型的构建. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 210–217]

Analysis of Characteristic Elements and Establishment of Principal Component Evaluation Model of Abalone from Different Habitats

CHEN Shengjun¹①, LIU Xianjin^{1,2}, YANG Xianqing¹, LI Laihao¹,
HUANG Hui¹, WU Yanyan¹, LI Chunsheng¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National R&D Center for Aquatic Product Processing, South China Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;
2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract This study was done to assess regional differences among abalone from different habitats and develop a new and efficient method to identify abalone from different habitats of origin. To do this, the content and composition of 13 major elements and trace elements (Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, As, Al, Mn, Cr, and Se) in the muscle tissue of 18 kinds of abalone samples from the four major breeding provinces of Guangdong, Fujian, Shandong, and Liaoning, China, were determined and analyzed using principal component analysis (PCA). The results showed that the elemental content differed among the 18 abalone samples. The variation in Manganese (Mn) was the largest [the coefficient of variation (CV) was 74% among samples], followed by Nickel (Ni) (CV = 65%), and then by Selenium (Se) (CV = 60%); all the rest of the analyzed elements had CVs higher than 10%. At the same time, after using the PCA method to reduce the dimensions of these data, six elements were effectively extracted from among the 13 elements examined that cumulatively explained 89.87% of the variance among samples. These characteristic elements of abalone from different habitats were Ca, Se, Na, Fe, Mn, K, and Ni, and a comprehensive model of the six principal components including them was established as follows: $F = 0.2777F_1 + 0.2652F_2 + 0.1295F_3 + 0.1066F_4 + 0.0656F_5 + 0.0541F_6$, where F_1 represents the first principal component, and $F_2 \sim F_6$ represent the second to sixth principal components, respectively. On the basis of the comprehensive PCA score, the top six samples were samples No. 2, 6, 17, 13, 7, and 15, and the lowest one was sample No. 5. Among these, sample No. 2 had a higher content of all characteristic elements and better quality than all others. The PCA approach was found to be quite suitable for the evaluation of the nutritive quality of abalone. The establishment of this PCA model provided an empirical basis for the theoretical determination of the origin of abalone samples.

Key words Abalone; Characteristic elements; Principal component analysis; Different habitats

① Corresponding author: CHEN Shengjun, E-mail: chenshengjun@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180201001

http://www.yykxjz.cn/

孙朝虎, 白志毅, 李清清, 彭建庆, 李家乐. 三角帆蚌生长和壳色性状早期复合选择的优化研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 91-97

Sun CH, Bai ZY, Li QQ, Peng JQ, Li JL. The optimization of early compound selection for growth traits and shell color in *Hyriopsis cumingii*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 91-97

三角帆蚌生长和壳色性状早期复合选择的优化研究*



孙朝虎^{1,3} 白志毅^{2,3}① 李清清^{1,3} 彭建庆^{1,3} 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海市水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306; 3. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306)

摘要 本研究以三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*) ‘申紫1号’ F₁为研究对象,在幼蚌壳色透明期,根据目标性状的选择顺序和中选率,设置了7种依次选择法。壳长(SL)为第1选择性状,贝壳深紫色(PN)为第2选择性状,设定3种中选率,选择方法分别为SL 50% × PN 20%(I)、SL 30% × PN 33%(II)、SL 20% × PN 50%(III);贝壳深紫色(PN)为第1选择性状,壳长(SL)为第2选择性状,设定3种中选率,选择方法分别为PN 50% × SL 20%(IV)、PN 30% × SL 33%(V)、PN 20% × SL 50%(VI);另外1组经验选择法SI 10%(VII)作为对照组,选择内壳色深紫色和体型大的个体,每种方法的综合中选率均为10%。经过300 d养殖后,通过比较分析选留三角帆蚌的生长和壳色性状表现,对这7种方法的早期选择效果进行综合评价。结果显示,不同选择方法,早期选择效果不同,方法IV和方法VI选留个体的生长性状表现最佳,方法II最差;方法I~方法III对于壳色的选择效果最佳,方法IV对于壳色的选择效果较差;传统选择方法选留的三角帆蚌性状表现不突出。以贝壳深紫色为第1选择性状的方法,对于生长性状的早期选择效果优于以壳长性状为第1选择性状的选择方法;以壳长性状为第1选择性状的方法,对于壳色的早期选择效果优于以贝壳深紫色为第1选择性状的选择方法,说明选择顺序对于选择效果影响显著。更加关注的目标性状,在依次选择中,最后选择效果更佳;中选率影响选择效果,但受到复合选择的影响。

关键词 三角帆蚌; 早期选择; 生长性状; 壳色; 选择顺序; 中选率

中图分类号 S966.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0091-07

优良的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)可以培育出优质的淡水珍珠,推动淡水珍珠产业转型升级、提质增效(梁飞龙等, 2015)。珍珠质量等级的提高需大小、圆度、颜色、光泽度、表面光洁度和珍珠层厚度(有

核珍珠) 6个指标同步提升。影响三角帆蚌育珠效果的因子有很多,包括育珠蚌的种质优劣、三角帆蚌的吊养密度、工人的插片技术等(王晓艳, 2011)。本实验室评价和筛选五大淡水湖泊的优质三角帆蚌(汪桂玲

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49)、上海市工程中心项目(16DZ2281200)和国家自然科学基金(31672654)共同资助[This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-49), Shanghai Engineering and Technology Center for Promoting Ability (16DZ2281200), and the National Natural Science Foundation of China (31672654)].
孙朝虎, E-mail: 869408077@qq.com

①通讯作者: 白志毅, 教授, E-mail: zybai@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-02-01, 收修改稿日期: 2018-03-09

等, 2014), 以其为基础群体, 持续选育数年, 成功选育出三角帆蚌新品种‘申紫一号’。王照旗等(2014)通过对紫色三角帆蚌的内壳色和体重性状同步选育, 选育效果良好。李清清等(2015)研究表明, 育珠蚌的壳长生长率与所产无核珍珠的大小、圆度、光泽及产珠量极显著相关, 供片蚌的内壳色与无核珍珠颜色极显著相关。吴雷明等(2016)对紫色三角帆蚌选育组和对照组的贝壳珍珠质颜色和生长性状进行研究, 虽然选育效果良好, 但无法通过生长性状间接选择贝壳珍珠质颜色。因此, 本研究以壳长和贝壳深紫色为目标性状, 开展三角帆蚌生长和壳色性状复合选育, 以期培育双性状均表现优异的新品种。

复合性状选育方法有指数选择法、独立淘汰法、依次法, 各有利弊(楼允东, 1999)。吴建良等(2011)对中国荷斯坦奶牛不同选择方法的研究表明, 在同一淘汰率的情况下, 综合指数选择法的选择效果优于依次法和独立淘汰法。孔杰等(2012)通过综合选择指数法选育中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 4代后, 培育出‘黄海2号’。王雪磊等(2016)以壳金性状和生长性状为主要选育指标, 采用混合选育技术同步改良长牡蛎(*Crassostrea gigas*) 2个性状, 效果良好。葛建龙等(2016)通过家系内个体选育有效提高长牡蛎壳金群体的生长速度, 可获得较大的选择反应。从这些研究可以看出, 相对于指数选择法和独立淘汰法, 依次法操作简单, 可以获得更多的优秀性状的个体。

李达等(2017)对于金乌贼(*Sepia esculenta*)早期发育阶段内壳生长规律的研究表明, 早期选育的必要性。三角帆蚌苗种早期贝壳透明, 外壳色与内壳色显著相关, 该时期可直接观测贝壳内壳色, 是选择三角帆蚌内壳色最方便的时期; 三角帆蚌壳长、壳宽、壳高和体重等生长性状呈显著正相关, 壳长是5月龄三角帆蚌最易测量的生长性状, 选择壳长性状可实现对三角帆蚌各生长性状的间接选择。本研究以三角帆蚌

蚌壳长性状和贝壳深紫色为选育性状, 首次制定不同的中选率, 并借助依次选择法, 对5月龄三角帆蚌‘申紫1号’F₁代进行早期选择, 评估依次选择法的性状选择顺序和不同中选率对三角帆蚌生长和壳色性状的早期选择效应, 以期优化三角帆蚌的早期选择方法, 进一步改良壳色和生长性状, 并为今后的淡水珍珠蚌的选育工作提供理论基础和科学依据(金武等, 2012)。

1 材料与方 法

1.1 蚌苗繁育

2015年5月, 在安徽省宣城市裘公乡三角帆蚌良种繁育基地, 挑选性状优良的紫色三角帆蚌‘申紫1号’做亲本, 分辨出雌雄蚌, 分别吊养于同一池塘里, 进行亲本培育, 每隔1d, 检查母蚌怀卵情况, 选取同一天怀卵的母蚌100只, 按常规方法培育蚌苗, 获得稚蚌。

1.2 实验设置

2018年7月中旬, 稚蚌出池时, 进行初次筛选。该时期中选率为10%, 用网筛从三角帆蚌‘申紫1号’F₁育苗池中挑选出约5600只大规格稚蚌, 网筛的网孔边长为1cm的正方形, 将挑选出的稚蚌分别吊养在同一池塘的56个网箱中, 每个网箱放养100只, 养殖期间, 进行科学管理和定期施肥。

待三角帆蚌长至5月龄时开展研究。设定该时期综合中选率为10%, 以壳长性状和贝壳颜色深紫色为选育指标, 分别设置不同的中选率, 按不同的选择顺序, 共设置7种依次选择法(表1)。壳长(SL)为第1选择性状, 贝壳深紫色(PN)为第2选择性状, 设定3种中选率组合, 形成SL 50%×PN 20%(I)、SL 30%×PN 33%(II)、SL 20%×PN 50%(III)3种选择方法; 贝

表 1 不同选择方法的性状选择顺序和中选率
Tab.1 The selected trait order and retention rate of different selection methods

项目 Items	选择方法 Selection methods														
	I		II		III		IV		V		VI		VII		
选择顺序 Selection order	第 1	第 2	第 1	第 2	第 1	第 2	第 1	第 2	第 1	第 2	第 1	第 2	第 1	第 2	无
选育性状 Breeding traits	SL	PN	SL	PN	SL	PN	PN	SL	PN	SL	PN	SL	PN	SL	SL, PN
中选率 Retention rate(%)	50	20	30	33	20	50	50	20	30	33	20	50			
综合中选率 Comprehensive retention rate(%)	10		10		10		10		10		10		10		

注: SL 为壳长性状, PN 为贝壳颜色深紫性状

Note: SL is the shell length; PN is the deep purple shell

壳深紫色(PN)为第 1 选择性状, 壳长(SL)为第 2 选择性状, 设定 3 种中选率组合, 形成 PN 50% × SL 20%(IV)、PN 30% × SL 33%(V)、PN 20% × SL 50%(VI) 3 种选择方法。另外, 根据经验, 同步挑选壳色深紫色和体型大的个体作为对照组, 中选率为 10%, 选择方法为 SI 10%(VII)。将 5600 只 5 月龄三角帆蚌随机分成 7 组, 依据上述 7 种选择方法分别进行挑选, 最终将每种方法选留的 80 只三角帆蚌平均放入 4 个网箱(40 cm × 40 cm × 40 cm)中, 所有网箱放回原先池塘, 以 40 cm 水深继续吊养。定期施肥, 进行科学管理(张元培等, 1996)。

1.3 性状测量

2015 年 12 月, 从每个选择方法中随机挑选出 60 只蚌, 测量壳长、壳高、壳宽、体重、外套膜重和壳重。使用游标卡尺测量壳长、壳高、壳宽这 3 个长度性状, 精确度为 0.01 mm。三角帆蚌洗净擦干后, 使用电子天平称量体重, 精确度为 0.01 g。对三角帆蚌进行解剖, 去除内脏团, 将分离出的外套膜进行称重, 将壳阴干后进行称量, 精确度为 0.01 g(李清清等, 2015)。

使用 Lovibond RT Colour V3.0 软件的 CIEL^{*}a^{*}b^{*}系统和 Lovibond-RT 200 表面色度计对三角帆蚌内壳色测量。测量参数包括明度(L^{*})、色度 a(a^{*})、色度 b(b^{*})和色差值(dE^{*})。L^{*} > 0 为颜色偏白, L^{*} < 0 为颜色偏黑, L^{*} 越小, 表明颜色越深; a^{*} > 0 为颜色偏红, a^{*} < 0 为颜色偏绿; b^{*} > 0 为颜色偏黄, b^{*} < 0 为颜色偏蓝; dE^{*} 为所测样品和标准白之间的色差, dE^{*} 值越大, 表明贝壳颜色越丰富。因此, L^{*} 越小, dE^{*} 值越大时, 紫色三角帆蚌内壳颜色更深、更丰富。测量前, 先将内壳洗净晾干, 依次对前闭壳肌(A3)、左壳边缘部位的外套痕与纵肋的交叉处(A2)、后闭壳肌处进行壳色测量(A1) (图 1), 取每个蚌 3 个点的颜色参数值的平均值作为该个体的内壳色数据(吴雷明等, 2016)。

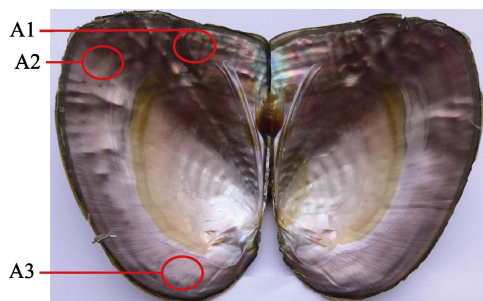


图 1 内壳色测量位置示意

Fig.1 Schematic diagram of measured positions of inner shell color

1.4 数据统计与处理

采用 Excel 2016 软件对原始数据进行初步整理, 再用 SPSS Statistics V22.0 统计软件对 7 种选择方法选留的三角帆蚌的壳长、壳高、壳宽、体重、外套膜重、壳重生长性状和 L^{*}、a^{*}、b^{*}和 dE^{*}内壳颜色参数等测量值进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 数据采用平均值±标准差(Mean ± SD)表示(李梦军等, 2006)。

2 结果与分析

2.1 不同选择方法选育出的三角帆蚌的生长性状差异

采用 7 种选择方法选出的三角帆蚌的各生长性状的统计描述见图 2。从图 2 可以看出, 方法 IV 和方法 I 的生长性状早期选择效果最好, 方法 IV 选择的三角帆蚌壳长和壳宽表现最优(图 2A、图 2C), 方法 VI 选择的三角帆蚌的壳宽、体重最优(图 2C、图 2D)。

在以壳长为第 1 选择性状的方法 I~方法 III(SL × PN)中, 壳长的中选率分别为 50%、30%和 20%, 但方法 I 和方法 III 的早期选择效应优于方法 II; 在以壳长为第 2 选择性状的方法 IV~方法 VI(PN × SL)中, 壳长性状的中选率分别为 20%、33%和 50%, 但方法 IV 和方法 VI 的早期选择效应优于方法 V。从方法 I SL × PN 与方法 IV PN × SL 整体对比可以发现, 后 3 种方法选出的三角帆蚌, 后期在壳长、壳高、壳宽、体重、外套膜重、壳重方面表现更优, 表明壳长性状的选择顺序对选留个体生长性状的表现具有显著影响。以贝壳深紫色(PN)为第 1 选择性状、壳长作为第 2 选择性状的选择方法(PN × SL), 可以选育出后期生长性状更优的三角帆蚌。

壳长性状中选率相同, 选择顺序不同时, 中选率对选留个体生长性状表现的影响不明显。方法 I 和方法 VI 的壳长性状的中选率都是 50%, 仅选留个体的外套膜重存在显著差异, 其他性状间无显著差异(P < 0.05); 方法 III 和方法 IV 的壳长性状的中选率都是 20%, 选留个体后期各生长性状均未呈现显著差异。

2.2 不同选择方法选育出的三角帆蚌贝壳颜色差异

采用 7 种选择方法选出的三角帆蚌各贝壳颜色参数的统计描述见图 3。从图 3 可以看出, 方法 I~方法 III 选留的三角帆蚌 L^{*}值较低, 显著低于其他 4 种选择方法, 其中, 方法 IV 的 L^{*}值最大(P < 0.05)。方法 IV 的 a^{*}值最大, 显著高于其他 6 种选择方法选留的三角帆蚌(P < 0.05)。方法 II 和方法 III 的 b^{*}值最大, 显著高于方法 VI, 方法 IV 的 b^{*}值最小(P < 0.05)。方

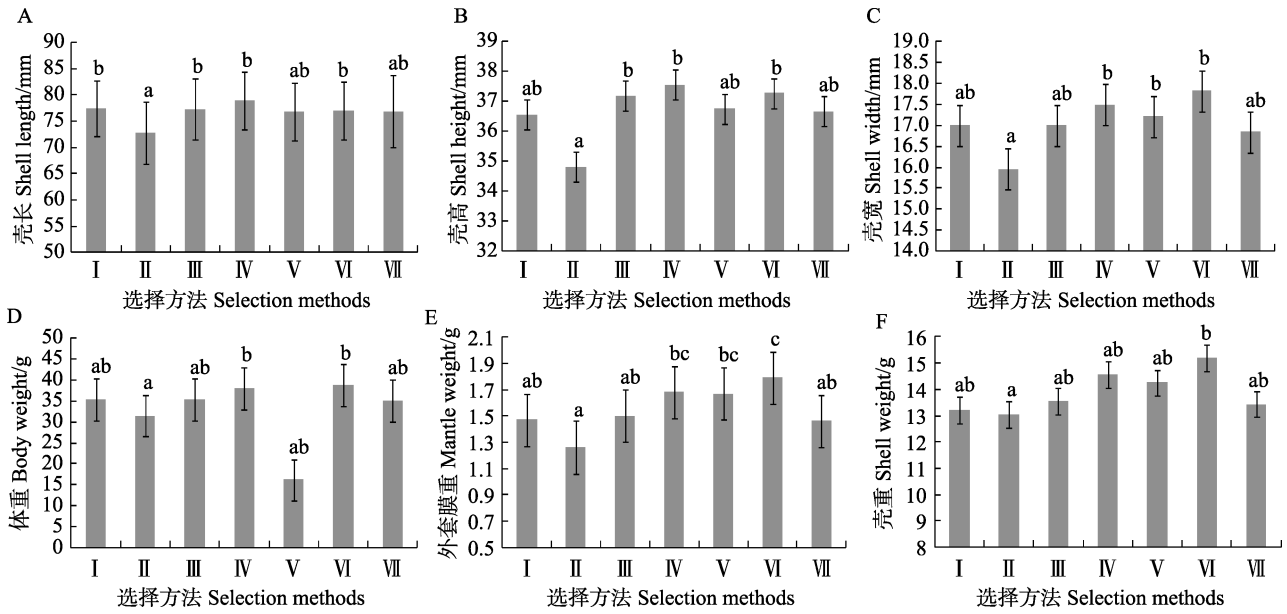


图2 不同选择方法对三角帆蚌生长性状的影响
Fig.2 Effects of different selection methods on growth traits of *H. cumingii*

不同字母之间代表差异显著($P < 0.05$), 下同
Different letters represent significant difference ($P < 0.05$), the same as below

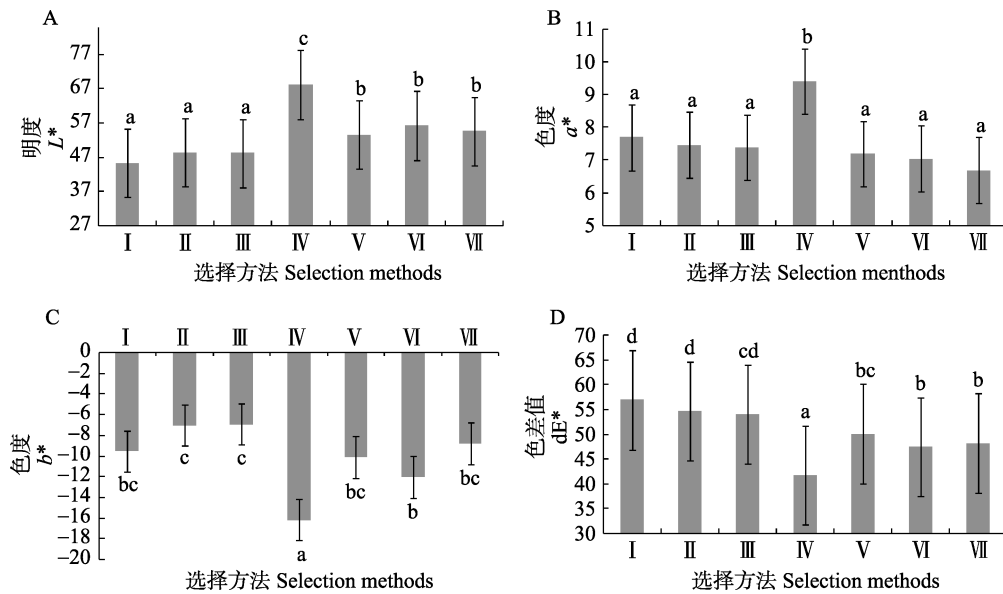


图3 不同选择方法对三角帆蚌内壳色参数的影响
Fig.3 Effects of different selection methods on inner shell color parameters of *H. cumingii*

法 I~方法 III 的 dE^* 值最大(图 3), 三者间无显著差异, 除方法 III 与方法 V 间未见显著差异外, 该 3 种方法的 dE^* 值均显著大于其他方法。

以贝壳深紫色(PN)为第 2 选择性状的方法 I~方法 III(SL×PN)中, 贝壳深紫色的中选率分别为 20%、33%和 50%, 各方法选留三角帆蚌的颜色参数均无显著差异; 以贝壳深紫色为第 1 选择性状的方法 IV~方法

VI(PN×SL)中, 贝壳深紫色的中选率分别为 50%、30%和 20%, 方法 IV 各颜色参数性状与其他各组相比, 均呈现显著差异, 方法 V 和方法 VI 间各颜色参数无显著差异。

3 讨论

近年来, 市场和消费者对淡水珍珠质量的要求越来越高, 培育优质淡水珍珠蚌、提升珍珠质量是淡水

珍珠产业提质增效、绿色发展的必经之路。李祥孔等(2017)和栾生等(2008)研究表明,在水产动物育种中,进行个体选择或者家系选择时,育种值选择效率都显著高于表型值选择,但是,在三角帆蚌的实际育种工作中,单纯的家系选育会提高近交衰退率,从颜色参数和生长性状育种值高的家系中,选择颜色较好且生长较快的个体补充选育群体,可降低减少近交系数(吴雷明等, 2016)。对照组Ⅶ和其他6种选择方法的结果显示,凭借常规经验选出的三角帆蚌生长性状和壳色表现不突出,这进一步说明优化选育方法的必要性。三角帆蚌是我国最主要的淡水育珠母蚌,本研究以壳长性状和贝壳颜色深紫为选育指标,对三角帆蚌进行早期复合选择,以期优化选择方法,为今后的选育工作提供一定的基础。

3.1 三角帆蚌生长和壳色性状的选择顺序对选择效果的影响

本研究以不同的顺序依次选择性状,研究三角帆蚌生长和壳色性状早期复合选择效应发现,以贝壳深紫色(PN)为第1选择性状的方法(PN×SL)可以选育出后期生长性状更优的三角帆蚌,表明对于生长性状的早期选择效果优于以壳长性状(SL)为第1选择性状的选择方法(SL×PN);以壳长性状为第1选择性状的方法(SL×PN)选出的三角帆蚌,后期贝壳紫色表现更优,表明对于壳色的早期选择效果优于以贝壳深紫色为第1选择性状的选择方法(PN×SL)。以上结果表明,选择顺序对于选择效果影响显著,目标性状的选择顺序不同,导致选择方法的选择效果不同。在实际生产中依次选择时,对于更加关注的目标性状,应该最后选择,选择效果更佳。供片贝提供外套膜细胞小片给育珠贝,育珠贝接受细胞小片,细胞小片形成珍珠囊,珍珠囊分泌珍珠质形成珍珠,珍珠的培育过程需要供片贝和育珠贝共同参与(吴曼等, 2014)。供片贝对珍珠颜色性状的影响很大,同种育珠贝对珍珠颜色性状影响较小,主要对珍珠的生长速度起着关键作用(Zhao *et al*, 2013; 刘越, 2013; 白志毅等, 2008; 徐在宽等, 1992)。李清清等(2015)对于紫色三角帆蚌选育系F₅育珠性状的研究发现,供片贝内壳色dE越大,所产紫色珍珠比例越大。张文府(2013)通过将育珠贝家系和小片贝家系分开选育以研究4种壳色的马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)。所以,在培育三角帆蚌稚蚌的时候,凭借以贝壳深紫色为第1选择性状的选择方法(PN×SL)挑选育珠贝,凭借以壳长作为第1选择性状的选择方法(SL×PN)挑选供片贝,将供片贝和育珠贝分开选育,既便于工人管理又可节省养殖成本。

3.2 早期中选率对三角帆蚌生长性状和壳色选择效果的影响

本研究发现,不同中选率对选留个体性状的选择效果不同,方法~方法 的壳长性状中选率逐渐降低,贝壳深紫色(PN)中选率逐渐提高,方法 和方法 对于生长性状的早期选择效应优于方法 ,这3种方法选留个体的颜色参数却均未见显著差异。选择方法Ⅳ~方法Ⅵ的壳长性状(SL)中选率逐渐提高、贝壳深紫色(PN)中选率逐渐降低,方法Ⅳ和方法Ⅵ的对于生长性状的早期选择效应优于方法Ⅴ,方法Ⅳ选留个体的颜色参数与其他方法均呈显著差异,方法Ⅴ和方法Ⅵ间各颜色参数却未见显著差异。以上结果表明,中选率和性状选择效果不是线性关系。

贝壳深紫色性状被选顺序不同中选率相同的方法中,选择方法的选择效果不同。方法 和方法Ⅵ的壳长性状(SL)中选率为50%,贝壳深紫色(PN)中选率为20%时,仅选留个体后期的外套膜重存在显著差异,其他生长性状间未呈现显著差异($P < 0.05$),但方法 选留三角帆蚌贝壳颜色参数 L^* 和 dE^* 大于方法Ⅵ,方法 对贝壳紫色的选择效果优于方法Ⅵ。方法 和方法Ⅳ的壳长性状(SL)中选率是20%,贝壳深紫色性状(PN)中选率为50%时,这2种方法选留个体后期各生长性状均未呈现显著差异,方法Ⅲ各颜色参数性状与方法Ⅳ均呈现显著差异,方法 对贝壳紫色的选择效果优于方法Ⅳ。从以上结果可以看出,选择效果不仅和中选率有关,还受复合选择效应的综合影响。在大型育珠工作中,提高育珠贝的生长速度,尽快达到插片规格,提高供片贝的贝壳深紫色度,选育出贝壳深紫性状优良的三角帆蚌供片贝和生长性状优良的三角帆蚌育珠贝,这是培育优质紫色珍珠的有效方法。本研究以贝壳深紫色和壳长为目标性状,依次选择生长性状和壳色性状来研究三角帆蚌生长和壳色性状的复合选择效果,可为三角帆蚌复合选育工作提供理论依据和数据支持。

参 考 文 献

- Bai ZY, Li JL, Wang GL. Relationship between pearl production, growth traits and the inserted position of mantle piece in triangle mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(3): 493-499 [白志毅, 李家乐, 汪桂玲. 三角帆蚌产珠性能与生长性状和插片部位的关系. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 493-499]
- Ge JL, Li Q, Yu H, *et al*. Selection response in mass selection of golden shell Pacific oyster (*Crassostres gigas*). *Journal of*

- Fisheries of China, 2016, 40(4): 612–617 [葛建龙, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎壳金选育群体生长性状的选择效应. 水产学报, 2016, 40(4): 612–617]
- Gu ZF, Huang FS, Wang H, *et al.* Contribution of donor and host oysters to the cultured pearl colour in *Pinctada martensii*. *Aquaculture Research*, 2014, 45(7): 1126–1132
- Jin W, Li JL, Fu LL, *et al.* Genetic parameter estimates for growth traits in the earlier larva stage of *Hyriopsis cumingii*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1209–1214 [金武, 李家乐, 付龙龙, 等. 三角帆蚌早期阶段生长性状遗传参数估计. 水产学报, 2012, 36(8): 1209–1214]
- Kong J, Luo K, Luan S, *et al.* The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1854–1862 [孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海 2 号”的培育. 水产学报, 2012, 36(12): 1854–1862]
- Li D, Liu CL, Li A, *et al.* Principal component analysis of the morphometric traits of the cuttlebone of *Sepia esulenta* at early development stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 41–49 [李达, 刘长琳, 李昂, 等. 金乌贼 (*Sepia esulenta*) 早期发育阶段内壳形态学指标的主成分分析. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 41–49]
- Li MJ, Yang PH. Study on selection breeding technology of *Hyriopsis cumingii*. *Inland Fisheries*, 2006, 31(3): 38–40 [李梦军, 杨品红. 三角帆蚌选择育种技术研究. 内陆水产, 2006, 31(3): 38–40]
- Li QQ, Bai ZY, Liu XJ, *et al.* Correlation analysis of non-nucleated pearl quality parameters with growth traits and inner shell color of *Hyriopsis cumingii*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1631–1639 [李清清, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌生长性状和内壳色与所产无核珍珠质量的相关性分析. 水产学报, 2015, 39(11): 1631–1639]
- Li XK, Tian YS, Li H, *et al.* Genetic effect analysis of growth traits in *Paralichthys olivaceus* families. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 39–50 [李祥孔, 田永胜, 李洪, 等. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 家系生长性状遗传效应分析. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 39–50]
- Liang FL, Xie SH, Lin WC. Progress on pearl production from *Hyriopsis cumingii*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015 (2): 113–118 [梁飞龙, 谢绍河, 林伟财. 三角帆蚌人工育珠研究进展. 海洋湖沼通报, 2015(2): 113–118]
- Liu Y. The effect of donor *Hyriopsis cumingii* on the quality of pearls. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [刘越. 三角帆蚌供片蚌对珍珠质量的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Lou YD. *Fish breeding*. Beijing: China Agriculture Press, 1999, 40 [楼允东. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社, 1999, 40]
- Luan S, Kong J, Wang QY. Methods and application of aquatic animal breeding value estimation: A review. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 101–107 [栾生, 孔杰, 王清印. 水产动物育种值估计方法及其应用的研究进展. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 101–107]
- Wang GL, Bai ZY, Liu XJ, *et al.* Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1618–1627 [汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展. 水产学报, 2014, 38(9): 1618–1627]
- Wang XL, Li Q, Yu H, *et al.* Estimates of genetic parameters for golden shell color and correlation with growth traits in the golden shell strain of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1889–1896 [王雪磊, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎壳金性状遗传参数评估及与生长性状的关联分析. 水产学报, 2016, 40(12): 1889–1896]
- Wang XY. Research on the key factor of triangle mussel (*Hyriopsis cumingii*) bread pearl. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2011 [王晓艳. 影响三角帆蚌育珠效果关键因子研究. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Wang ZQ, Han XK, Bai ZY, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 644–650 [王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系 1 龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计. 水产学报, 2014, 38(5): 644–650]
- Wu JL, Zhou WD, Jiang JF, *et al.* Comparison of different selection methods for Chinese Holstein bulls. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2011(2): 420–422 [吴建良, 周卫东, 姜俊芳, 等. 中国荷斯坦奶牛不同选择方法的比较. 浙江农业科学, 2011(2): 420–422]
- Wu LM, Bai ZY, Liu XJ, *et al.* Evaluation of shell color and growth traits for F₅ of the freshwater pearl mussel. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 547–554 [吴雷明, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌 F₅ 壳色及生长性状选育效果评价. 中国水产科学, 2016, 23(3): 547–554]
- Wu M, Liu BS, Huang GJ, *et al.* Analysis of shell nacre color in full-sib families of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 44–50 [吴曼, 刘宝锁, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝全同胞家系贝壳珍珠质颜色分析. 南方水产科学, 2014, 10(6): 44–50]
- Xu ZK, Xu DZ, Wu Q. The relationship between the supplier and the acceptor of mantle piece and its effects on pearl quality. *Journal of Aquaculture*, 1992(2): 16–18 [徐在宽, 徐大中, 武警. 小片与蚌间的关系对珍珠质量的影响. 水产养殖, 1992(2): 16–18]
- Zhang WF. Study on the families selection of the four shell colors *Pinctada martensii* as culturing pearl and mantle tissue donors. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2013 [张文府. 马氏珠母贝四种壳色选育系中育珠贝家系和小片贝家系的选育研究. 广东海洋大学硕士

研究生学位论文, 2013]

Zhang YP, Han DJ. Studies on optimum water layer for rearing pearls (*Hyriopsis cumingii*) in Yuanjiahu Lake. Journal of Lake Sciences, 1996, 8(1): 60–66 [张元培, 韩德举. 袁家湖三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii* 最佳育珠水层的试验研究.

湖泊科学, 1996, 8(1): 60–66]

Zhao YC, Bai ZY, Fu LL, *et al.* Comparison of growth and pearl production in males and females of the freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*, in China. Aquaculture International, 2013, 21(6): 1301–1310.

(编辑 陈严)

The Optimization of Early Compound Selection for Growth Traits and Shell Color in *Hyriopsis cumingii*

SUN Chaohu^{1,3}, BAI Zhiyi^{2,3①}, LI Qingqing^{1,3}, PENG Jianqing^{1,3}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306;

3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai 201306)

Abstract At the early stage, the shell of the strain F₁ of “Shenzi No.1” *Hyriopsis cumingii* is transparent, so the workload involved in selection and improving the breeding efficiency can be reduced at this stage. In this study, seven different selection methods were tested with different selection orders and retention rates of objective traits. When shell length (SL) was the first trait selected and a deep purple shell (PN) was the secondarily selected trait, the different methods used were SL 50% × PN 20%, SL 30% × PN 33%, and SL 20% × PN 50%. However, when the selection order was the opposite of this, the selection methods used were PN 50% × SL 20%, PN 30% × SL 33%, and PN 20% × SL 50%. Moreover, according to conventional experience, juveniles with a deep purple shell and large size were selected simultaneously in a seventh control group. This was done to compare the experimental results of this control group with those of the other six methods. The total retention rate of each method was 10%. After five months of culture, the growth traits (shell length, shell height, shell width, body weight, mantle weight, and shell weight) and the inner shell color parameters (*L*, *a*, *b*, and *dE*) of the selected mussels were measured to evaluate the early selection effects of these seven methods. The results showed that the different selection methods led to differences in the effects of early selection. The growth traits of individuals selected by the PN 50% × SL 20% and PN 20% × SL 50% methods were the best, while the selection effect of the SL 30% × PN 33% method was the worst. However, when the deep purple shell was selected as the objective trait, the other three methods (SL 50% × PN 20%, SL 30% × PN 33% and SL 20% × PN 50%) were better than the above methods. The selection effect of the SL 30% × PN 33% method was the worst for the growth traits. The traits of *H. cumingii* selected by the traditional method were not prominent in any of the experimental groups. The method of taking SL as the first selection trait was SL × PN, while the method of taking PN as the first selection trait was PN × SL. In the early stage, the SL × PN method can be used to select for clams with a deep purple shell color, while the PN × SL method can be used to select for larger clams. The results showed that the selection order had a significant impact on the selection effect. In addition, when the traits with higher expectations were selected at the end, the effect of the selection was better. Further more, both the retention rate and the compound selection response affected the selection effect.

Key words *Hyriopsis cumingii*; Early selection; Growth trait; Shell color; Selection order; Retention rate

① Corresponding author: BAI Zhiyi, E-mail: zybai@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180319001

http://www.yykxjz.cn/

赵捷杰, 陈四清, 徐大风, 常青, 张鹏飞. 短蛸的早期生长特征. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 98-105
Zhao JJ, Chen SQ, Xu DF, Chang Q, Zhang PF. Early growth characteristics of post-hatching *Octopus ocellatus* (Mollusca: Cephalopoda). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 98-105

短蛸的早期生长特征*



赵捷杰^{1,2} 陈四清² 徐大风^{1,2} 常青^{2①} 张鹏飞^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 对孵化后 1~50 日龄短蛸(*Octopus ocellatus*)幼体的体重、全长、腕长及胴长进行测量, 观察并分析其早期生长变化特征。在水温为 22℃~24℃的养殖条件下, 初孵短蛸平均全长为 10.03 mm。11 日龄幼体开始营底栖生活, 以此为分界线划分为浮游期和底栖期。结果显示, 1~11 日龄浮游短蛸体重增长为立方函数增长类型, $y = 0.0001x^3 - 0.0019x^2 + 0.0098x + 0.0409$; 11~50 日龄的底栖短蛸体重增长为指数函数增长类型, $y = 0.0284e^{0.092x}$ 。在 1~50 日龄短蛸幼体的生长过程中, 体重(g)与全长(mm)呈立方函数关系, $y = -8e - 07x^3 + 0.001x^2 - 0.011x + 0.099$; 全长(mm)与腕长(mm)呈线性关系, $y = 1.314x + 4.952$; 体重、全长及腕长分别与日龄呈立方函数关系, $y = 6e - 05x^3 - 0.003x^2 + 0.036x - 0.03$ 、 $y = 0.0004x^3 + 0.002x^2 + 0.307x + 10.604$ 、 $y = 0.0004x^3 - 0.007x^2 + 0.364x + 4.205$ 。通过研究短蛸幼体的生长发育特征, 从而加深了对幼体生长的了解, 并为短蛸人工繁育的研究提供参考依据。

关键词 短蛸; 腕长; 胴长; 浮游期; 底栖期

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0098-08

目前, 我国主要养殖的经济蛸类品种有短蛸(*Octopus ocellatus*)、长蛸(*Octopus variabilis*)和真蛸(*Octopus vulgaris*)等, 它们具有生长快速和食物转化率高的特点(林祥志等, 2006; 叶守建等, 2014)。短蛸隶属于软体动物门(Mollusca), 头足纲(Cephalopoda), 八腕目(Octopoda), 蛸科(Octopodidae); 体小腕短、生命周期短, 亲体有护卵行为; 为沿岸底栖种类, 游泳能力较弱, 有钻沙隐蔽的习性; 主要以虾、蟹、贝类和底栖鱼类为食(林祥志等, 2006; Mangold *et al.*, 1973; 叶守建等, 2014)。短蛸肉质鲜美, 是我国北方的重要海产品之一。

由于对蛸类幼体的生理和生物学知识缺乏了解,

我国对蛸类的繁育技术以及幼体发育阶段生物学研究还处于初期阶段, 短蛸幼体阶段的培育仍受到诸多因素的限制, 急需开展幼体的营养需求、适宜的开口饵料、成熟的饲养技术等研究。据报道, 短蛸在孵化后的第 1 个月死亡率极高, 尤其浮游幼体阶段是严重的瓶颈期, 转入底栖生活后随着个体不断生长, 存活率才逐渐提高(Iglesias *et al.*, 2014; Raquel *et al.*, 2017)。关于蛸类幼体人工培育及生长等的研究, 国内外已有相关报道(刘兆胜, 2013; Moguel *et al.*, 2010; Raquel *et al.*, 2017; 郑小东等, 2011)。对于短蛸幼体的研究主要集中在影响幼体成活的因素, 以及饵料和摄食方面(董根, 2014), 而关于短蛸幼体早期生长发育

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49)资助[This work was supported by the earmarked fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49)]. 赵捷杰, E-mail:1542039737@qq.com

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

收稿日期: 2018-03-19, 收修改稿日期: 2018-04-19

特征的研究未见报道。

本研究通过对短蛸幼体的培育和观察,研究了从孵化至 50 日龄短蛸幼体的生长发育特征,旨在加深对短蛸幼体生长的了解,为短蛸人工繁育的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与养殖条件

实验于 2017 年 6 月 20 日至 8 月 20 日在青岛金沙滩水产开发有限公司进行。选择即将孵化且有亲体看护的短蛸卵,将亲体和卵放置在上外径为 74 cm、下外径为 59 cm、高为 72 cm 的塑料水桶内(养殖水体 150 L),孵化水温为 21℃~22℃,盐度为 27~29, pH 为 7.8~8.3,光照强度 1000 lx 以下;连续充氧,日换水量为 1/2,直到幼体孵化出膜,得到同一天的初孵短蛸 400 只。随后,将亲体和卵移出水桶,并将 400 只短蛸幼体均分至与上述规格相同的 2 个水桶内养殖,养殖密度控制在 40 只/m² 以内。

1~11 日龄,卤虫无节幼体与糠虾无节幼体混合投喂。底栖后减少卤虫幼体的投喂,增加糠虾无节幼体的投喂量,适当投喂蛤蜊肉进行饵料转换,并投放大小合适的海螺壳做遮蔽物。20 日龄后,糠虾无节幼体和蛤蜊肉混合投喂。35 日龄后,增加蛤蜊肉的投喂量,期间根据幼体的生长情况更换大小适当的遮蔽物。每日投喂前换水,日换水量为 1/2。每日清晨饱食投喂,培育水温 22℃~24℃,培育水体和条件与孵化阶段相同。

1.2 实验方法

分别在第 1、3、5、11、15、20、25、30、35、38、42、44、46、48、50 天时,每次取样 10 只。称重前以 8~10 g/L 氯化镁(MgCl₂·6H₂O)麻醉幼体,然后用滤纸吸干幼体体表水分。分析天平称体重(Body weight, BW)(精确到 0.001 g),然后测量全长(Total length, TL),腕长(Arm length, AL)及胴长(Mantle length, ML)(精确到 0.01 mm)。全长(TL)为胴部底端至腕部顶端的距离;腕长(AL)为腕基部至顶端的距离;胴长(ML)为短蛸胴部底端至头部底端的距离。解剖镜(MODEL STAND SE220)下观察拍照(图 1)。

1.3 数据分析

以 Excel2010 和 SPSS20.0 软件分析全长与体重、全长与腕长、腕长与胴长以及体重、全长、腕长、胴

长分别与日龄的关系,做拟合曲线,选定 R² 值最大的函数关系式作为最佳曲线。以平均体重、全长及腕长的日均增长量、瞬时增长率来描述短蛸幼体的生长特征(李达等, 2017)。计算公式为:

$$\text{日均增长量(mm)}=(L_2-L_1)/(t_2-t_1);$$

$$\text{日均增重量(g)}=(W_2-W_1)/(t_2-t_1);$$

$$\text{瞬时增长率(%/d)}=[(\text{Ln}L_2-\text{Ln}L_1)/(t_2-t_1)]\times 100;$$

$$\text{瞬时增重率(%/d)}=[(\text{Ln}W_2-\text{Ln}W_1)/(t_2-t_1)]\times 100。$$

式中, W₁ 为 t₁ 时刻的体重(g); W₂ 为 t₂ 时刻的体重(g); L₁ 为 t₁ 时刻的全长或腕长(mm); L₂ 为 t₂ 时刻的全长或腕长(mm)。

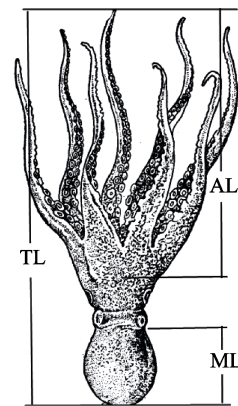


图 1 短蛸测量参数(蔡如星, 1991)

Fig.1 Scheme of morphometric measurements of *O. ocellatus*(Cai, 1991)

2 结果

2.1 短蛸幼体的阶段划分

观察短蛸自孵化出膜后生活习性的变化特征,以短蛸幼体伏底比例达 60%左右时为分界线,将幼体阶段划分为浮游期和底栖期。对浮游和底栖短蛸幼体进行体重与日龄模型分析与参数估计,并选取 R² 值最大的函数模型来描述各阶段的个体体重增长。

2.1.1 浮游期 1~11 日龄短蛸营浮游生活,为浮游期。平均体重与日龄的曲线参数估计结果显示,立方函数模型的 R² 值最大(表 1),因此选取立方函数模型来描述浮游期个体体重增长,平均体重(g)与日龄(d)的拟合方程为 $y = 0.0001x^3 - 0.0019x^2 + 0.0098x + 0.0409$,结果如图 2 所示。当天孵化出膜的短蛸卵黄囊吸收完全,即开口摄食。初孵短蛸平均腕长为 4.04 mm,小于平均胴长(4.12 mm),腕长/胴长的值小于 1(0.98); 3 日龄短蛸平均腕长为 5.00 mm,大于平均胴长(4.27 mm),腕长/胴长的值为大于 1(1.17)(图 3)。

表1 浮游短蛸体重与日龄的模型分析与参数估计

Tab.1 The model summary and parameter estimates between body weight and age of planktonic *O. ocellatus*

方程 Equation	模型汇总 Model summary					参数估计值 Parameter estimates			
	判定系数 Decision coefficient R^2	F	自由度 1 df_1	自由度 2 df_2	Sig.	常数项 Constant	系数 1 b_1	系数 2 b_2	系数 3 b_3
线性 Linearity	0.972	70.406	1	2	0.014	0.044	0.004		
对数 Logarithm	0.788	7.429	1	2	0.112	0.044	0.015		
倒数 Reciprocal	0.511	2.092	1	2	0.285	0.075	-0.030		
二次 Quadratic	0.989	44.880	2	1	0.105	0.048	0.002	0	
三次 Cubic	1.000		3	0		0.041	0.010	-0.002	0
复合 Compound	0.982	108.882	1	2	0.009	0.046	1.059		
幂 Power	0.842	10.667	1	2	0.082	0.046	0.228		
S	0.583	2.800	1	2	0.236	-2.595	-0.468		
增长 Growth	0.982	108.882	1	2	0.009	-3.072	0.057		
指数 Exponential	0.982	108.882	1	2	0.009	0.046	0.057		
Logistic	0.982	108.882	1	2	0.009	21.585	0.944		

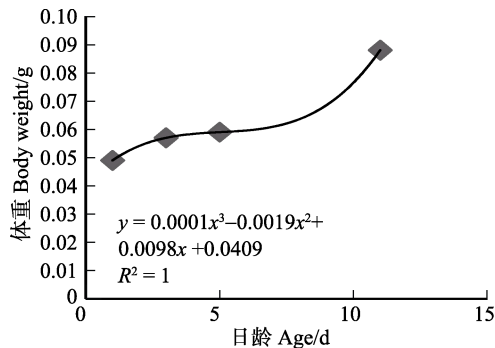


图2 浮游短蛸幼体体重与日龄的关系

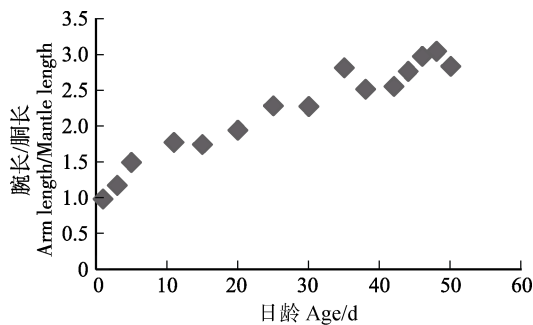
Fig.2 The relationship between body weight and age of planktonic *O. ocellatus* larvae

图3 短蛸幼体腕长与胴长的比值变化

Fig.3 The ratio of arm length with mantle length of *O. ocellatus* larvae

2.1.2 底栖期 11日龄底栖短蛸比例达60%，认为幼体开始进入底栖期。进入底栖期后，11~50日龄短蛸体重与日龄的曲线参数估计结果显示，复合函数、增长函数、指数函数和Logistic函数关系式的 R^2 值相同且最大(表2)，选择其中任何一种即可，本研究选择指数函数模型来描述底栖短蛸体重增长。平均

体重(g)与日龄(d)的拟合方程为 $y = 0.0284e^{0.092x}$ 。根据底栖幼体体重与日龄的关系作图，结果如图4所示。

2.2 短蛸幼体的生长规律

测量并记录短蛸幼体不同生长阶段的全长、腕长与体重，计算其平均全长、腕长及体重，日增长(重)量，瞬时增长(重)率等来描述短蛸幼体养殖阶段的生长特征。本实验初孵短蛸经50d生长期，平均全长从10.03 mm达到76.21 mm，平均日均增长量为1.50 mm，平均瞬时增长率为4.20%/d；平均腕长从4.04 mm达到54.34 mm，平均日均增长量为1.18 mm，平均瞬时增长率为5.67%/d；平均体重从0.049 g达到2.923 g，平均日均增重量为0.075 g，平均瞬时增重率为7.97%/d(表3)。

2.2.1 短蛸幼体体重与全长的关系 初孵短蛸的平均全长为10.03 mm，平均体重为0.049 g；11日龄开始底栖生活，平均全长为16.31 mm，平均体重0.088 g；生长至50日龄时，平均全长为76.21 mm的短蛸其体重为2.923 g。通过拟合方程可知，1~50日龄短蛸平均体重(g)与全长(mm)呈立方函数关系，方程为 $y = -8e-07x^3 + 0.001x^2 - 0.011x + 0.099$ 。根据幼体体重与全长的关系作图，结果如图5所示。

2.2.2 短蛸幼体全长与腕长的关系 初孵短蛸的平均腕长为4.04 mm；11日龄的底栖短蛸，平均腕长达到8.91 mm；培育至50日龄，平均全长为76.21 mm的短蛸其腕长为54.34 mm。通过拟合方程可知，1~50日龄短蛸平均全长(mm)与腕长(mm)呈线性，方程为 $y = 1.314x + 4.952$ 。根据幼体全长与腕长的关系作图，结果如图6所示。

表 2 底栖短蛸体重与日龄的模型分析与参数估计
Tab.2 The model summary and parameter estimates of body weight and age of benthic *O. ocellatus*

方程 Equation	模型汇总 Model summary					参数估计值 Parameter estimates			
	判定系数 Decision coefficient R^2	F	自由度 1 df_1	自由度 2 df_2	Sig.	常数项 Constant	系数 1 b_1	系数 2 b_2	系数 3 b_3
线性 Linearity	0.824	46.779	1	10	0	-1.150	0.066		
对数 Logarithm	0.676	20.868	1	10	0.001	-4.476	1.626		
倒数 Reciprocal	0.506	10.233	1	10	0.010	2.259	-31.586		
二次 Quadratic	0.980	222.433	2	9	0.000	1.094	-0.110	0.003	
三次 Cubic	0.994	456.532	3	8	0	-5.84	0.101	-0.005	8.192e-05
复合 Compound	0.995	2196.829	1	10	0	.028	1.096		
幂 Power	0.944	169.505	1	10	0	.000	2.421		
S	0.820	45.440	1	10	0	1.415	-50.649		
增长 Growth	0.995	2196.829	1	10	0	-3.561	0.092		
指数 Exponential	0.995	2196.829	1	10	0	.028	0.092		
Logistic	0.995	2196.829	1	10	0	35.198	0.912		

表 3 短蛸幼体的生长情况(平均值±标准误, $n=10$)
Tab.3 The growth of *O. ocellatus* larvae (mean±SE, $n=10$)

日龄 Age (d)	平均全长 Average body length (mm)	全长日增长 量 Daily growth of total length (mm)	全长瞬时增长率 Instantaneous growth rate of total length (%/d)	平均腕长 Average arm length(mm)	腕长日增 长量 Daily growth of arm length (mm)	腕长瞬时增长率 Instantaneous growth rate of arm length (%/d)	平均体重 Average body weight (g)	日增重量 Daily weight gain (g)	瞬时增重率 Instantaneous weight gain rate (%/d)
1	10.03±0.399			4.04±0.264			0.049±0.001		
3	11.45±0.110	0.71	6.62	5.00±0.095	0.48	10.66	0.057±0.001	0.004	7.56
5	13.03±0.367	0.79	6.46	6.64±0.269	0.82	14.18	0.059±0.002	0.001	1.72
11	16.31±0.102	0.55	3.74	8.91±0.076	0.38	4.90	0.088±0.001	0.005	6.66
15	16.75±0.112	0.11	0.67	9.09±0.157	0.05	0.50	0.113±0.004	0.006	6.25
20	18.85±0.137	0.42	2.36	10.88±0.124	0.36	3.60	0.166±0.009	0.011	7.69
25	23.57±0.441	0.94	4.47	13.98±0.362	0.62	5.01	0.267±0.012	0.020	9.51
30	31.24±1.019	1.53	5.63	19.71±0.500	1.15	6.87	0.449±0.037	0.036	10.40
35	41.43±0.864	2.04	5.65	27.94±0.925	1.65	6.98	0.735±0.023	0.057	9.86
38	43.2±1.108	0.59	1.39	28.06±0.622	0.04	0.14	0.774±0.024	0.013	1.72
42	56.1±1.575	3.23	6.53	36.44±0.517	2.10	6.53	1.481±0.066	0.177	16.22
44	57.36±1.924	0.63	1.11	40.18±1.832	1.87	4.89	1.721±0.089	0.120	7.51
46	61.61±2.089	2.13	3.57	44.15±2.063	1.99	4.71	1.894±0.130	0.087	4.79
48	69.54±2.664	3.97	6.05	50.09±2.115	2.97	6.31	2.439±0.134	0.273	12.64
50	76.21±1.966	3.34	4.58	54.34±1.800	2.13	4.07	2.923±0.164	0.242	9.05
平均值 Mean		1.50	4.20		1.18	5.67		0.075	7.97

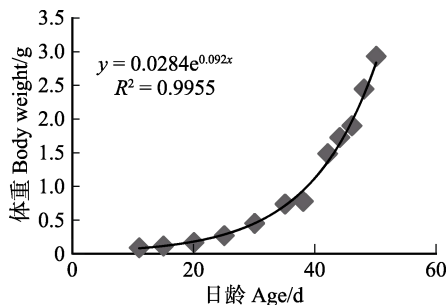


图 4 底栖短蛸幼体体重与日龄的关系
Fig.4 The relationship between body weight and age of benthic *O. ocellatus* larvae

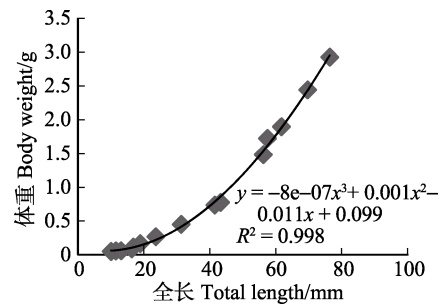


图 5 短蛸幼体体重与全长的关系
Fig.5 The relationship between body weight and total length of *O. ocellatus* larvae

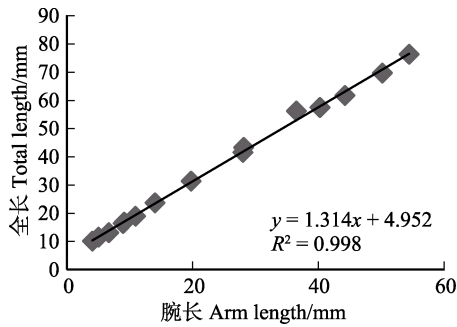


图6 短蛸幼体全长与腕长的关系

Fig.6 The relationship between total length and arm length of *O. ocellatus* larvae

2.2.3 短蛸幼体体重与日龄的关系 平均体重为0.049 g的初孵短蛸, 11日龄开始底栖时体重达到0.088 g, 经过50 d的生长期, 平均体重达到2.923 g, 平均每日增重量为0.075 g(表1)。通过拟合方程可知1~50日龄短蛸体重(g)与日龄(d)呈立方函数关系, 方程为 $y = 6e-05x^3 - 0.003x^2 + 0.036x - 0.03$ 。根据幼体体重与日龄的关系作图, 结果如图7所示。1~11日龄浮游期, 短蛸增重较慢, 平均日增重0.003 g; 进入底栖期后, 增重较浮游期快, 平均日增重0.087 g(表4)。

2.2.4 短蛸幼体全长与日龄的关系 初孵短蛸生长至50日龄时, 全长达到76.21 mm左右, 平均日增长量为1.5 mm。通过拟合方程可知, 1~50日龄短蛸全长(mm)与日龄(d)呈立方函数增长, 方程为 $y = 0.0004x^3 + 0.002x^2 + 0.307x + 10.604$ 。根据不同阶段幼体全长与日龄的关系作图, 结果如图8所示。浮游期短蛸, 全长增长较慢, 平均日增长0.68 mm; 11~50日龄底栖短蛸全长的增长较浮游期快, 平均日增长1.62 mm(表4)。

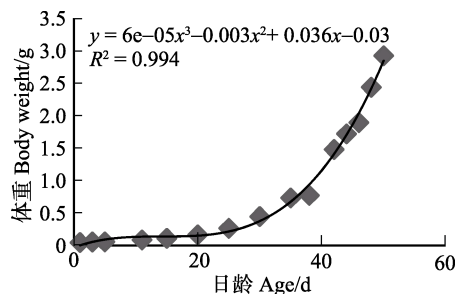


图7 短蛸幼体体重与日龄的关系

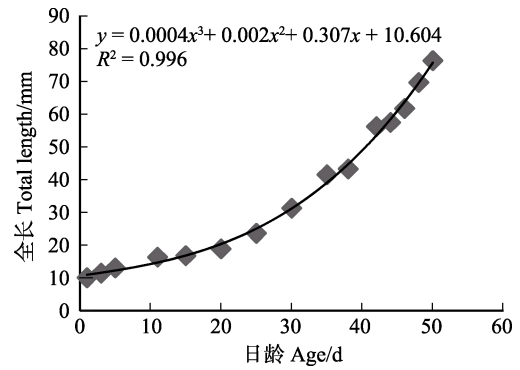
Fig.7 The relationship between body weight and age of *O. ocellatus* larvae

图8 短蛸幼体全长与日龄的关系

Fig.8 The relationship between total length and age of *O. ocellatus* larvae

2.2.5 短蛸幼体腕长与日龄的关系 初孵短蛸平均腕长为4.04 mm, 经过50 d的生长, 平均腕长达到54.34 mm, 平均每日增长量为1.18 mm。通过拟合方程可知, 1~50日龄短蛸腕长(mm)与日龄(d)呈立方函数增长, 方程为 $y = 0.0004x^3 - 0.007x^2 + 0.364x + 4.205$ 。根据不同阶段幼体腕长与日龄的关系作图, 结果如图9所示。浮游期短蛸的腕长生长较慢, 腕长平均日增长量为0.56 mm; 11~50日龄短蛸的腕长增长较浮游期快, 平均日增长为1.28 mm(表4)。

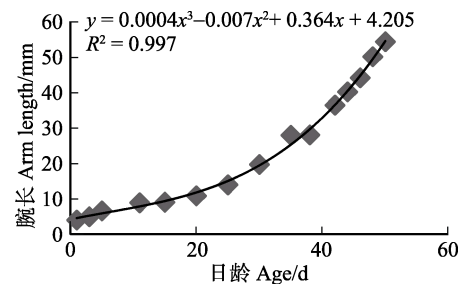


图9 短蛸幼体腕长与日龄的关系

Fig.9 The relationship between arm length and age of *O. ocellatus* larvae

2.3 短蛸幼体体色和吸盘数量的变化

1日龄短蛸(图10a)体色近似透明, 可见内脏团呈金黄色。浮游期短蛸(图10a和图10b)的体色浅, 底栖期体色逐渐加深(图10c和图10d), 变为黄褐色(图10e和图10f)。观察并统计了浮游期短蛸的吸盘数目, 初孵短蛸通常具有14~16个吸盘, 随着腕的增长吸盘

表4 短蛸幼体不同阶段的生长情况

Tab.4 The growth of *O. ocellatus* larvae in different phases

日龄 Age (d)	全长平均日增长量 Average daily growth of total length (mm)	腕长平均日增长量 Average daily growth of arm length (mm)	平均日增重量 Average daily weight gain (g)
1~11	0.68	0.56	0.003
11~50	1.62	1.28	0.087

数目随之增加, 新增吸盘从腕的末端处出现, 先隆起极小的凸起, 而后不断增大。8 日龄短蛸吸盘个数 18~20 个, 11 日龄短蛸开始底栖, 具有 26~28 个吸盘, 进入底栖期后, 吸盘数目随腕的增长继续增加。吸盘在腕上的排列方式为: 从腕的基部至顶端吸盘由大到小排列; 接近腕基部处前几个大吸盘呈单列分布, 至腕顶端方向随吸盘逐渐变小而呈 2 列分布, 且越至腕顶端方向吸盘越小、分布越密集。

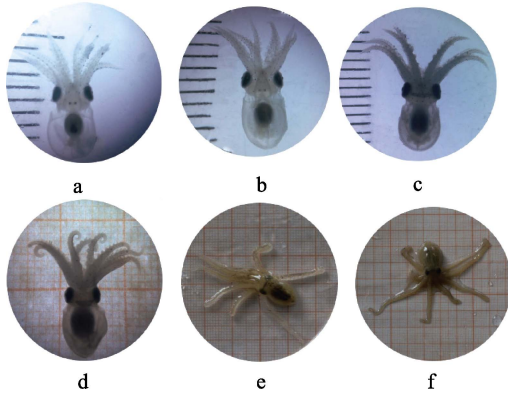


图 10 短蛸幼体的生长进程

Fig.10 The growth process of *O. ocellatus* larvae

a: 1 日龄; b: 8 日龄; c: 11 日龄; d: 20 日龄;
e: 35 日龄; f: 46 日龄(每一个刻度为 1 mm)
a: 1-day; b: 8-day; c: 11-day; d: 20-day; e: 35-day;
f: 46-day (Each calibration is 1mm)

3 讨论

3.1 短蛸幼体在不同阶段的生长规律

短蛸幼体的摄食行为不是直接吞食, 是用腕上的吸盘吸附食物, 而初孵短蛸腕长/胴长的值小于 1, 表明此阶段腕的发育相对不发达, 捕捉和摄取饵料的能力较弱, 即使食物充足, 幼体也未能很好摄食(Raquel *et al.*, 2017)。3 日龄后腕长/胴长的值大于 1 且呈逐渐增加趋势, 由此可初步推断浮游期短蛸的能量分配主要用于完成形态上的调整, 发育对生命活动起重要作用的腕和胴体等, 而不是主要用于体重增长, 以此增强幼体捕食和适应环境的能力, 提高其存活率(何滔等, 2012; 雷舒涵等, 2014; Moguel *et al.*, 2010; 单秀娟等, 2009; 王卫军等, 2010), 这可能是浮游期短蛸体重没有快速增加的原因之一。

11 日龄后短蛸进入底栖期, 随着短蛸腕和胴体不断生长, 幼体主动摄食能力也逐渐增强, 并开始摄取蛤蜊或蟹幼体。底栖期短蛸体重增长为指数函数增长类型, 体重平均日增重量比浮游期短蛸提高了

0.084 g/d, 全长和腕长的平均增长量分别比浮游期短蛸提高了 0.94 和 0.72 mm/d, 这可能是由于该时期短蛸的主要功能器官已逐渐发育完全, 能量主要用于体重的增加, 故生长较快(雷舒涵等, 2014; Moguel *et al.*, 2010)。

3.2 短蛸幼体的形态结构与捕食之间的关系

短蛸幼体捕食行为的发生是各捕食器官共同作用的结果。漏斗、腕和吸盘等结构都在幼体的摄食过程中起着关键作用。幼体捕捉饵料时, 8 条腕网向食物, 抓取饵料(王卫军等, 2017); 短蛸腕的吸盘具有角质环但不具齿(陈道海等, 2014), 吸盘具有丰富的肌纤维, 是强有力的吸附器官, 与猎物接触后呈漏斗状的管道边缘密封, 通过肌肉收缩产生吸力效应, 从而吸附食物防止挣脱(Bidder, 1966), 而后用腕卷至嘴前方抱食。

短蛸在不同阶段腕和吸盘的结构都存在差异, 这也体现了不同阶段的幼体在捕食能力上的差异(Kier *et al.*, 1990; Voight, 1991)。随着幼体不断生长, 腕和吸盘等结构的形态和功能逐渐完善, 各器官协同完成摄食过程。初孵阶段腕长/胴长值小于 1, 吸盘个数少, 因此, 抓取和吸附食物的能力较弱; 之后, 腕长/胴长值不断增大, 吸盘数量逐渐增多, 吸附作用增强, 更有利于摄食, 增强了主动摄食的能力(郑小东, 2011)。11 日龄的短蛸具有 26~28 个吸盘, 进入底栖期后, 腕不断增长, 腕上吸盘也进一步增大增多, 故而捕食能力较在浮游期更强。

参 考 文 献

- Bidder AM. Feeding and digestion in cephalopods. *Physiology of Mollusca*, 1966, 39 (3): 97-124
- Cai RX. *Zoology molluscs of Zhejiang*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1991, 302 [蔡如星. 浙江动物志·软体动物. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1991, 302]
- Chen DH, Qiu HM. Surface microstructures of suckers and their endoskeletons in cephalopods as revealed by SEM. *Chinese Journal of Zoology*, 2014, 49(5): 736-743 [陈道海, 邱海梅. 头足类腕上吸盘和内壳扫描电镜观察. 动物学杂志, 2014, 49(5): 736-743]
- Dong G. The basic biological studies on the artificial reproduction of *Octopus ocellatus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [董根. 短蛸人工繁育过程中的基础生物学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- He T, Xiao ZZ, Liu QH, *et al.* Allometric growth in rock bream

- larvae (*Oplegnathus fasciatus* Temminck et Schlegel 1844). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1242–1248 [何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷早期发育阶段的生长模式. *水产学报*, 2012, 36(8): 1242–1248]
- Iglesias J, Fuentes L. *Octopus vulgaris*. paralarval culture. cephalopod culture. Springer Netherlands, 2014: 427–450
- Kier WM, Smith AM. The morphology and mechanics of octopus suckers. *Biological Bulletin*, 1990, 178(2): 126–136
- Lei SH, Zhang XM, Zhang PD, et al. Early development of golden cuttlefish *Sepia esculenta*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(1): 37–43 [雷舒涵, 张秀梅, 张沛东, 等. 金乌贼的早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2014, 21(1): 37–43]
- Li D, Liu CL, Li A, et al. Principal component analysis of the morphometric traits of the cuttlebone of *Sepia esculenta* at early developmental stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 41–49 [李达, 刘长琳, 李昂, 等. 金乌贼 (*Sepia esculenta*) 早期发育阶段内壳形态学指标的主成分分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 41–49]
- Lin XZ, Zheng XD, Su YQ, et al. The status and prospect of octopus culture biology: A review. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 213–218 [林祥志, 郑小东, 苏永全, 等. 蛸类养殖生物学研究现状及展望. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(S2): 213–218]
- Liu ZS. Studies on fundamental biology and artificial reproductive technique of *Octopus vulgaris*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [刘兆胜. 真蛸基础生物学和繁育技术研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Mangold K, Boletzky SV. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 1973, 19(1): 7–12
- Moguel C, Mascaró M, Avila-Poveda OH, et al. Morphological, physiological and behavioural changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology*, 2010, 9(1): 35–48
- Fernández-Gago Raquel, Martin H, Heidemarie G, et al. 3D Reconstruction of the Digestive System in *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 Embryos and Paralarvae during the First Month of Life. *Frontiers in Physiology*, 2017(8): 462
- Shan XJ, Dou SZ. Allometric growth of croaker *miichthys miiuy* larvae and juveniles and its ecological implication. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(6): 714–719 [单秀娟, 窦硕增. 鳁鱼 (*Miichthys miiuy*) 仔、稚鱼发育生长方式及其生态学意义. *海洋与湖沼*, 2009, 40(6): 714–719]
- Voight JR. Ligula length and courtship in octopus *digueti*: A potential mechanism of mate choice. *Evolution*, 1991, 45(7): 1726–1730
- Wang WJ, Yang JM, Zhou QL, et al. Reproductive behavior and process of embryonic development of *Octopus ocellatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1157–1162 [王卫军, 杨建敏, 周全利, 等. 短蛸繁殖行为及胚胎发育过程. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1157–1162]
- Wang WJ, Dong G, Li HJ, et al. Feeding behavior of larval *Amphioctopus fangsiao* and the effect of different diets on its growth and survival. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 100–106 [王卫军, 董根, 李焕军, 等. 短蛸 (*Amphioctopus fangsiao*) 幼体摄食行为和不同饵料对其生长、存活的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 100–106]
- Ye SJ, Zhou JW, Yang MX, et al. Exploitation of cephalopod resources in the world and development suggestion. *Journal of Modern Fisheries Information*, 2014, 29(1): 11–17 [叶守建, 周劲望, 杨铭霞, 等. 全球头足类资源开发现状分析及发展建议. *渔业信息与战略*, 2014, 29(1): 11–17]
- Zheng XD, Liu ZS, Zhao N, et al. Embryonic development and paralarval growth of *Octopus vulgaris*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(2): 317–323 [郑小东, 刘兆胜, 赵娜, 等. 真蛸 (*Octopus vulgaris*) 胚胎发育及浮游期幼体生长研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(2): 317–323]

(编辑 江润林)

Early Growth Characteristics of Post-Hatching *Octopus ocellatus* (Mollusca: Cephalopoda)

ZHAO Jiejie^{1,2}, CHEN Siqing², XU Dafeng^{1,2}, CHANG Qing^{2①}, ZHANG Pengfei^{1,2}

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

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The early growth characteristics of *Octopus ocellatus* larvae raised under culture conditions were analyzed. Ten larvae were sampled at different periods from post-hatching to when larvae were 50-days-old, and their body weight, total length, arm length, and mantle length were measured. We described the growth characteristics of *O. ocellatus*, to define the different phases characterizing this species' post-hatching development. The larval stages of *O. ocellatus* were divided into a planktonic stage and a benthic stage, with benthic life beginning at the age of 11 d. At water temperatures of 22°C~24°C, the cultured larvae could grow from an average total length of 10.03 mm on the first day post-hatching to a benthic octopus with an average length of 16.21 mm by the 11th day post-hatching. The results showed that the body weight of planktonic *O. ocellatus* increased with time according to a cubic function, the equation of which was: $y = 0.0001x^3 - 0.0019x^2 + 0.0098x + 0.0409$. On the other hand, benthic *O. ocellatus* body weight increased according to an exponential function, the equation of which was: $y = 0.0284e^{0.092x}$. The total length of *O. ocellatus* larvae exhibited a cubic relationship with body weight, the equation of which was: $y = -8e-07x^3 + 0.001x^2 - 0.011x + 0.099$. Total length was linearly related with arm length, as represented by the equation: $y = 1.314x + 4.952$. Body weight, total length, and arm length exhibited cubic growth functions over time, as represented by the equations: $y = 6e-05x^3 - 0.003x^2 + 0.036x - 0.03$, $y = 0.0004x^3 + 0.002x^2 + 0.307x + 10.604$, and $y = 0.0004x^3 - 0.007x^2 + 0.364x + 4.205$, respectively. The larval body is transparent, and the visceral mass of the larva is a golden color during the first day post-hatching. As the individual grows, the color deepens to a yellowish brown. Newly hatched *O. ocellatus* usually have 14 to 16 suckers, and with the constant growth of the larval wrist the number of wrist suckers gradually increases. The new suckers appear at the end of the wrist, each beginning as a small, raised bulge that then increases in size until a new sucker is formed.

Key words *Octopus ocellatus*; Arm length; Mantle length; Planktonic stage; Benthic stage

① Corresponding author: CHANG Qing, E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180208003

http://www.yykxjz.cn/

赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 郑哲, 邓岳文. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP*基因的克隆及其对温度胁迫的响应. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 106–114

Lai ZX, Liu Y, Wang QH, Zheng Z, Deng YW. cDNA cloning of *FBP* gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 106–114

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP* 基因的克隆及其对温度胁迫的响应*

赖卓欣¹ 刘雅¹ 王庆恒^{1,2①} 郑哲^{1,2} 邓岳文^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心 湛江 524088)

摘要 果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)是催化糖异生过程中的限速酶, 当动植物处于温度胁迫等不良环境条件时, FBP 通过参与糖异生途径以维持机体的糖平衡, 在动植物抗逆过程中起着重要作用。本研究通过 RACE 技术获得了马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP*(*Pm-FBP*)基因 cDNA 全长, 并使用实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因在马氏珠母贝不同组织中的表达量, 以及在 17°C(低温组)、22°C(对照组)、32°C(高温组)条件下鳃中的时序表达模式。序列分析显示, *Pm-FBP* 全长为 1381 bp, 具有 54 bp 的 5' UTR 和 62 bp 的 3' UTR, 开放阅读框(ORF)为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸, 预测分子量为 37.13 kDa, 等电点为 6.02。Pm-FBP 具有一个 Pfam FBPase 保守结构域, 6 个潜在的 O-连接糖基化位点(Ser36、Ser56、Ser57、Ser76、Ser80 和 Thr115), 1 个潜在的 N-糖基化位点, 1 个金属结合位点(Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser)和 46 个磷酸化位点。多序列比对结果显示, *Pm-FBP* 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)*FBP* 的相似性最高, 为 83%; 系统进化树显示, *Pm-FBP* 与长牡蛎等贝类聚为一支, 然后再与其他软体动物聚为一大支, 节肢动物和脊椎动物分别聚类, 进化树总体聚为三大支。实时荧光定量结果显示, *Pm-FBP* 在所检测的闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜等组织中均有表达, 在性腺表达量最高, 肝胰腺和鳃中有较高表达; 对 *Pm-FBP* 时序表达的分析发现, *Pm-FBP* 在低温组和高温组实验时间范围内均出现先上升后下降的趋势, 且在 72 h 时达到最大值, 表明 *Pm-FBP* 参与了马氏珠母贝对温度胁迫的响应; 在 120 h 时, 高温组和低温组的 *Pm-FBP* 表达量均显著下降, 表明 *Pm-FBP* 可能主要在短期的温度胁迫中发挥作用。本研究结果为进一步探索马氏珠母贝对温度胁迫的适应性提供了参考资料。

关键词 马氏珠母贝; 果糖-1,6-二磷酸酶基因; 温度胁迫; 表达分析; 基因克隆

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0106-09

由非碳水化合物转变为葡萄糖或糖原的过程称为糖异生(Gluconeogenesis), 糖异生是增加葡萄糖产生的一个主要途径(Cota-Ruiz *et al*, 2015)。果糖-1,6-

二磷酸酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)又称果糖 1,6-二磷酸酯酶, 它催化果糖-1,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸和无机磷, 在糖的异生代谢过程中起关键性

* 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(Z2014009)和广东省科技计划(2017A030307024; 2017A030303076)共同资助 [This work was supported by Marine Fisheries Science and Industry Development Special Project of Guangdong Province (Z2014009), and Science and Technology Plan of Guangdong Province(2017A030307024; 2017A030303076)].

赖卓欣, E-mail: 582748856@qq.com

① 通讯作者: 王庆恒, 副教授, E-mail: wangqingheng@163.com

收稿日期: 2018-02-08, 收修改稿日期: 2018-03-16

的作用(Lozinska-Gabska *et al*, 2003; Kaiser *et al*, 1996)。FBP 几乎存在于所有生物体中, 包括细菌、真菌、植物和动物, 但不存在于有异源蛋白的古细菌中(Stec *et al*, 2000)。已有研究表明, 在高温、干旱(Xiao *et al*, 2014; 曲玲等, 2015)和缺氧(Cota-Ruiz *et al*, 2016)等非生物胁迫下, FBP 通过参与催化动植物体能量产生途径产生更多的能量, 在动植物体度过不良环境过程中起着重要的作用。第一个被人们所知的 FBP 序列全长是从小鼠(*Rattus norvegicus*)中克隆得到(el-Maghrabi *et al*, 1988)。已有关于部分水产经济动物 FBP 的研究报道, 如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肝胰腺具有糖异生的能力(Rosas *et al*, 1999); 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)在不同喂食情况下, 其 FBP 在各个组织中的表达量不同(Nie *et al*, 2015); 银鲫(*Carassius auratus gibelio*)被证实存在肝脏型和肌肉型 2 种 FBP 同工酶(王锐等, 2010)等。目前, 尚未有贝类 FBP 的报道。关于 FBP 在温度胁迫条件下的研究主要集中于植物(徐文亭等, 2013; 何斌等, 2015; 陈虎等, 2016; 曲玲等, 2015), 贝类 FBP 基因的相关功能有待进一步的研究。

贝类属于变温动物, 温度的变化对贝类的生命活动有显著的影响(Kim *et al*, 2009; Cotter *et al*, 2010; Ivanina *et al*, 2013)。马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)又称合浦珠母贝, 是中国海水珍珠养殖的主要品种, 广泛分布于广东、广西和海南沿海等地, 具有重要的经济价值(田荣荣等, 2015)。昼夜温差的变化、一年四季的更替及无法控制的自然灾害带来的温度骤变都会对马氏珠母贝造成很大的负面影响。目前, 有关马氏珠母贝对温度变化的响应机制研究较少。本研究采用 RACE 技术获得 *Pm-FBP* 的基因序列全长, 并研究了其在不同温度下的时序表达模式, 以为深入研究马氏珠母贝温度胁迫的响应机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的马氏珠母贝采自广东省雷州市后洪村海区, 将贝体表面的附着物清理干净后运回实验室, 22℃暂养 2 d 后, 选取鳞片旺盛、活力正常的马氏珠母贝用于实验, 实验贝壳长为(69.23±3.80) mm。其中, 随机取 6 只马氏珠母贝的全组织, 包括闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜, 经液氮速冻后置于-80℃冰箱备用。

150 只马氏珠母贝随机分为 3 组, 分别置于 3 个 300 L 的实验桶中, 微充气养殖, 水温分别设为 17℃(低温组)、22℃(对照组)和 32℃(高温组), 养殖过程中每天投喂等量的单胞藻, 每天换水 50%。在实验养殖开始后 6 h、24 h、72 h 和 120 h, 分别从每个实验桶中随机取 8 个个体, 剪取鳃组织, 经液氮速冻后置于-80℃冰箱保存。

1.2 主要试剂

Trizol、SYBR Select Master Mix 和 GeneJET Gel Extraction 购买于 Life Technologies 公司; DH5 α 大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及 RACE 试剂盒(Clontech)购买于 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 *Pm-FBP* 全长克隆

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成 采用 Trizol 法分别提取马氏珠母贝闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜的总 RNA。3' RACE 和 5' RACE 模板的制备参考 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书。

1.3.2 引物设计 实验采用 Primer Premier 5.0 软件设计了实验所需引物, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences (5'~3')	用途 Purpose
<i>Pm-FBP</i> -F	GTCATCAGCAGTGAGAAAGG	中间片段扩增 Middle fragment PCR
<i>Pm-FBP</i> -R	CCTGGGTACGCAAAGATA	中间片段扩增 Middle fragment PCR
5' inner Primer	CAGCGGTCTGAATGAAGT	5'RACE
5' outer Primer	TAGCCTGACGCAACCATC	5'RACE
3' inner Primer	TCCTAAAGGCAAACACTACG	3'RACE
3' outer Primer	ATCCAAAGAGTGGTAAGCC	3'RACE
<i>Pm-FBP</i> qRT-PCR-F	CCTGGGTACGCAAAGATA	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
<i>Pm-FBP</i> qRT-PCR-R	GCTTCGTCCCAGTATTGTT	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
β -actin-F	CGGTACCACCATGTTCTCAG	荧光定量(内参)Reference gene
β -actin-R	GACCGGATTCATCGTATTCC	荧光定量(内参)Reference gene

1.3.3 RACE PCR 获得 *Pm-FBP* 全长序列 利用引物 *Pm-FBP-F/Pm-FBP-R* 进行 *Pm-FBP* 中间片段的扩增。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，将与目的片段长度一致的 PCR 产物和载体 pMD18-T 连接，连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，用氨苄青霉素选择培养基培养后，挑取阳性菌送往生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序获得的 *Pm-FBP* 中间片段、3'和 5'序列与马氏珠母贝基因组(Du *et al.*, 2017)中已知的部分进行比对，利用软件将获得的 *Pm-FBP* 中间片段与 3'和 5'的序列片段进行拼接，最终得到 *Pm-FBP* 全长序列。

1.3.4 *Pm-FBP* 的生物信息学分析 利用 SMART 在线分析工具确定本研究克隆所得的 cDNA 序列为 *FBP* 基因;利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列推导; ORF Finder 软件找到 *Pm-FBP* 的开放阅读框; ExPASy-ProtParam tool 进行氨基酸的理化性质分析(王玉红等, 2018); SignalP 4.1 软件进行信号肽的预测; TMHMM Server 软件分析氨基酸的跨膜结构(王修芳等, 2016); SWISS-MODEL 软件进行氨基酸三级结构分析(曲玲等, 2015); 通过多序列比对, 将 *Pm-FBP* 与部分已知物种的 *FBP* 氨基酸序列进行同源性分析; 利用 Mega 6.0 构建生物系统进化树(王竹青等, 2018)。

1.3.5 *Pm-FBP* 在各组织以及不同温度下鳃中的时序表达差异 本研究以 β -actin 为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *Pm-FBP* 基因在不同组织以及实验温度下各时间点的相对表达量, 分别以外套膜和 22 $^{\circ}\text{C}$ 组为对照进行标准化处理以后, 利用 SPSS 软件以进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、组间表达量均值比较和 Duncan 多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *Pm-FBP* 序列分析

本研究通过 RACE 技术获得了 *Pm-FBP* 的全长序列。*Pm-FBP* 总长为 1381 bp, 5' UTR 为 54 bp, 3' UTR 为 62 bp, 开放阅读框(ORF)为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸(图 1)。*Pm-FBP* 无信号肽, 无跨膜结构, 具有 *FBP* 保守的 *FBPase* 结构域, 1 个潜在的 N-糖基化位点, 6 个潜在的 O-连接糖基化位点(Ser36、Ser56、Ser57、Ser76、Ser80 和 Thr115), 46 个磷酸化位点。

2.2 *Pm-FBP* 理化性质分析

Pm-FBP 的理论分子量为 37.13 kDa, 等电点为 6.02。其中, 含量较高的氨基酸有 Gly (G) 8.8%, Ser (S) 8.6%, Leu (L) 8.0%; 带负电的残基总数(Asp+Glu)

```

1 actgcttcaacagat aaggcaggataaaggcgcttgaacaaagt tagaagacaATGTCG
1 M S
61 GGAACGAAGGTCT ATAGATACAGAGCTGTAAAGCTCACCCGTTTATTCTGGCAGAA
3 G N E G P I D T E P V T L T R F I L A E
121 CAGAAGAAGCACCCC TCTGCAACAGGGGATTCTCCAGTTGGTGAACCTCATTACAGACC
23 Q K K H P S A T G D F S Q L V N F I Q T
181 GCTGTCAAAGCTGTG TCATCAGCAGTGAGAAAGGCTGGTATACATCGCCTATATGGTATC
43 A V K A V S S A V R K A G I H R L Y G I
241 TCAGGTACACAGAAT GTCACAGGAGATGAACAGAAGAAGCTGGATGTACTGGCAAATGAT
63 S G T Q N V T G D E Q K K L D V L A N D
301 TTGTTTATTAAACATG CTGAAATCATACCTGACATGCTACTGGTGTGAGAGGAGAAT
83 L F I N M L K S S Y L T C L L V S E E N
361 GATCAAGCCATAGTA GTAGAGACTGATAAACAGGGTAAATACATGTGGCATTGTGACCC
103 D Q A I V V E T D K Q G K Y I V A F D P
421 CTGGATGGTCATC CAATATTGACTGTCTGGTGTCCATTGGTTCATATCTCTATATTCT
123 L D G S S N I D C L V S I G S I F S I F
481 AGAAGAAGATGAC TCACCTGTACACAGAAGGATTCAGAAAGGCTGTGAGATG
143 R K K D D S P V T Q K D A L Q K G S E M
541 GTTGGCTCAGGCTAC GCTTTATACGGCAGTCCACCATGATTGTACTGGCCTGGAAGGT
163 V A S G Y A L Y G S A T M I V L A L E G
601 TCTGGGGTCAATGGT TTCATGTTAGATCCCGCTATGGAGAGTTTATCCTGACATACCT
183 S G V N G F M L D P A I G E F I L T L P
661 AGCATTCAAATCAA CCGCGAGGGAAAATATACTCCATCAATGAAGATATGAACAATAC
203 S I Q I K P R G K I Y S I N E G Y E Q Y
721 TGGGACGAAGCCACC AGGGAATA TGTCAAAAGTAAAAAATCCAAAGAGTGGTAAAGCCA
223 W D E A T R E Y V K S K K H P K S G K P
781 TATGGAGCTCGTTAT ATAGGGTCTATGGTGGCTGATGTACACAGGACGTGTGCTATGGT
243 Y G A R Y I G S M V A D V H R T L V Y G
841 GGTATCTTGGCTAC CCAGGTACATCTGAAGCTCC TAAAGGCAAAC TACGCTCTACTGTAT
263 G I F A Y P G T S E A P K G K L R L L Y
901 GAGAGTGCACCCATG GCATTTATAATGGAACAAGCAGGAGGTGTGGCTCAACGGGAAAA
283 E S A P M A F I M E Q A G G C A S T G K
961 CAACGAATCCTTGACATTGAGCCTACAGATATACATCAGAGATGTCCTGTGTCATGGGA
303 Q R I L D I E P T D I H Q R C P V F M G
1021 TCCAAGGATGATGTT CAAGATGACTGGATCTGTACCAAAAAGTACAGCAAATAGaaacgc
323 S K D D V Q D V L D L Y Q K Y S K *
1081 atacaatcaacactt gatgacaa tacgcaaaaaa aaaaaa aaaaaa aaaaaa

```

图 1 *Pm-FBP* 的核苷酸序列分析

Fig.1 The nucleotide sequence analysis of *Pm-FBP*

5'和 3'非编码区用小写字母表示; 开放阅读框及推导的氨基酸序列用大写字母表示; 阴影部分为保守结构域 Pfam *FBPase*; 下划线表示 6 个 O-连接糖基化位点; 双下划线表示 N-糖基化位点; 加粗字体表示金属离子结合位点
5' UTR and 3' UTR are indicated with small letters; Open reading frame and the deduced amino acid sequences are indicated with capital letters; The shaded portion is conserved domains of Pfam *FBPase*; The six O-linked glycosylation sites are underlined; Double underline denotes N-glycosylation site; The bold font represents the metal ion binding site

为 40 个, 正电的残基总数(Arg+Lys)为 37 个; 脂溶指数是 86.58, 平均亲水性(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.211, 为亲水性蛋白(图 2)。*FBP* 的二级结构预测结果显示, α 螺旋结构占整体的 30.97%, β 转角为 11.50%, 延伸链为 22.71%, 无规则卷曲为 34.81%。

2.3 *FBP* 多序列比对及进化树构建

为确定 *Pm-FBP* 与其他物种的同源性, 将 *Pm-FBP*

与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和果蝇(*Drosophila elegans*)的 FBP 序列进行比对,结果显示, Pm-FBP 与长牡蛎 FBP 相似度最高,为 83% (图 3)。对 Pm-FBP 进行三级结构的预测,与长牡蛎、虾夷扇贝 FBP 的三级结构进行比较分析,发现三者的相似性极高,都以无规则卷曲为主(图 4),说明 FBP 在三维结构上的保守性较高。

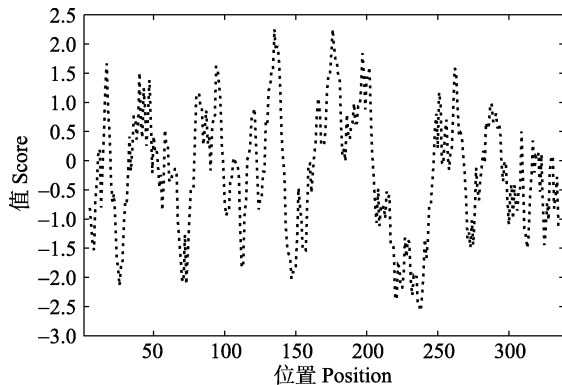


图 2 Pm-FBP 的疏水性
Fig.2 The hydrophobicity of Pm-FBP

将 Pm-FBP 与长牡蛎、虾夷扇贝、章鱼(*Octopus bimaculoides*)、海兔(*Aplysia californica*)、美洲鲎(*Limulus polyphemus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、凡纳滨对虾、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、文昌鱼、锦龟(*Chrysemys picta bellii*)、鲮鱼(*Cyprinodon variegatus*)、红树林鲷鱼(*Kryptolebias marmoratus*)的 FBP 基因序列建立系统进化树,结果显示,FBP 先与长牡蛎、虾夷扇贝汇聚一支,再与其他软体动物汇聚成一支,节肢动物和脊椎动物分别汇聚成两支(图 5),这与传统的分类基本一致。

2.4 Pm-FBP 在马氏珠母贝不同组织中的表达量检测

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术检测 Pm-FBP 在马氏珠母贝闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜的表达情况,结果如图 6 所示, Pm-FBP 基因在不同组织中表达量的变化从高到低依次为 GO>HE>GI>M>F>A, Pm-FBP 在性腺中表达量最高($P<0.05$),其次是肝胰腺和鳃,足和外套膜的表达量较低,闭壳肌中几乎不表达。

2.5 不同温度下马氏珠母贝鳃中 FBP 的时序表达

实验采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 Pm-FBP 在鳃中的表达量,结果显示, Pm-FBP 在高温组和低温组的表达量都出现了先升高后降低的趋势,且均在 72 h 时达到最大值($P<0.05$),由此可推测,

该基因与马氏珠母贝环境温度胁迫存在很强的相关性; 120 h 时,高温组和低温组 Pm-FBP 表达量均显著下降($P<0.05$),说明 Pm-FBP 很可能主要在短期温度胁迫中起重要作用(图 7)。

3 讨论

本研究利用 RACE 技术克隆获得 Pm-FBP 全长序列,该基因全长为 1381 bp,共编码 339 个氨基酸。Pm-FBP 具有 FBP 共有的一个保守结构域 Pfam FBPase(曲玲等, 2015; Cota-Ruiz *et al*, 2015),证实了本研究克隆所得到的序列为 Pm-FBP。FBP 是糖异生过程中的关键酶,受到异构调节、共价修饰和激素等机制的共同调节(王锐等, 2010)。其中,共价修饰又包括蛋白的磷酸化和去磷酸化(Wang *et al*, 2017)。Pm-FBP 中存在 46 个磷酸化位点、6 个 O-连接糖基化位点和 1 个 N-糖基化位点,也说明 FBP 可能通过蛋白质磷酸化修饰和糖基化来行使其蛋白功能(陈虎等, 2016)。此外, Pm-FBP 中存在 1 个 FBPase 序列基序 DPLDGSS (Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser),此基序已被证明能够结合金属离子参与催化(York *et al*, 1995),与 FBPase 需要金属离子催化的结论相符(Serrato *et al*, 2009; Rakus *et al*, 2013)。序列比对结果表明, Pm-FBP 与长牡蛎 FBP 同源性最高,为 83%; Pm-FBP 与长牡蛎、虾夷扇贝的 FBP 三级结构极为相似,说明 Pm-FBP 在双壳类动物进化过程中相对保守。

实时荧光定量 PCR 结果显示, Pm-FBP 在肝胰腺有较高水平的表达,与大菱鲆(Nie *et al*, 2015)、银鲫(王锐等, 2010)的研究结果一致。此外,研究表明,贝类处于繁殖期时,需要大量的能量储备用于精卵发育。在性腺发育过程中,贝体摄食获得的粗蛋白和粗脂肪含量随着精卵细胞的发育成熟不断增加,然后在休止期大量流失,糖类的含量在增殖期开始下降,成熟期达到最低,排放期后急剧升高,贝体饱满度及生化成分变化与繁殖周期的变化有着密切的关系(程亮等, 2013; Mendo *et al*, 2016)。本研究发现, Pm-FBP 在性腺中高表达($P<0.05$),说明 FBP 作为能量产生途径的关键酶,可能参与了性腺发育过程中的能量提供。

温度胁迫对贝类生理代谢具有显著影响。研究表明,海水温度剧烈变化时,急剧的水温变化对虾夷扇贝(吴彪等, 2016; 高振锟等, 2017)、栉孔扇贝(*Azumpecten farreri*)(Jiang *et al*, 2017)和文蛤(*Meretrix meretrix* L)(冯建彬等, 2004)等海洋贝类的摄食能力、呼吸及排泄等均有较大影响。此外,温度能够直接影响贝体的新陈代谢活动,进而影响贝体的能量收支和生长过

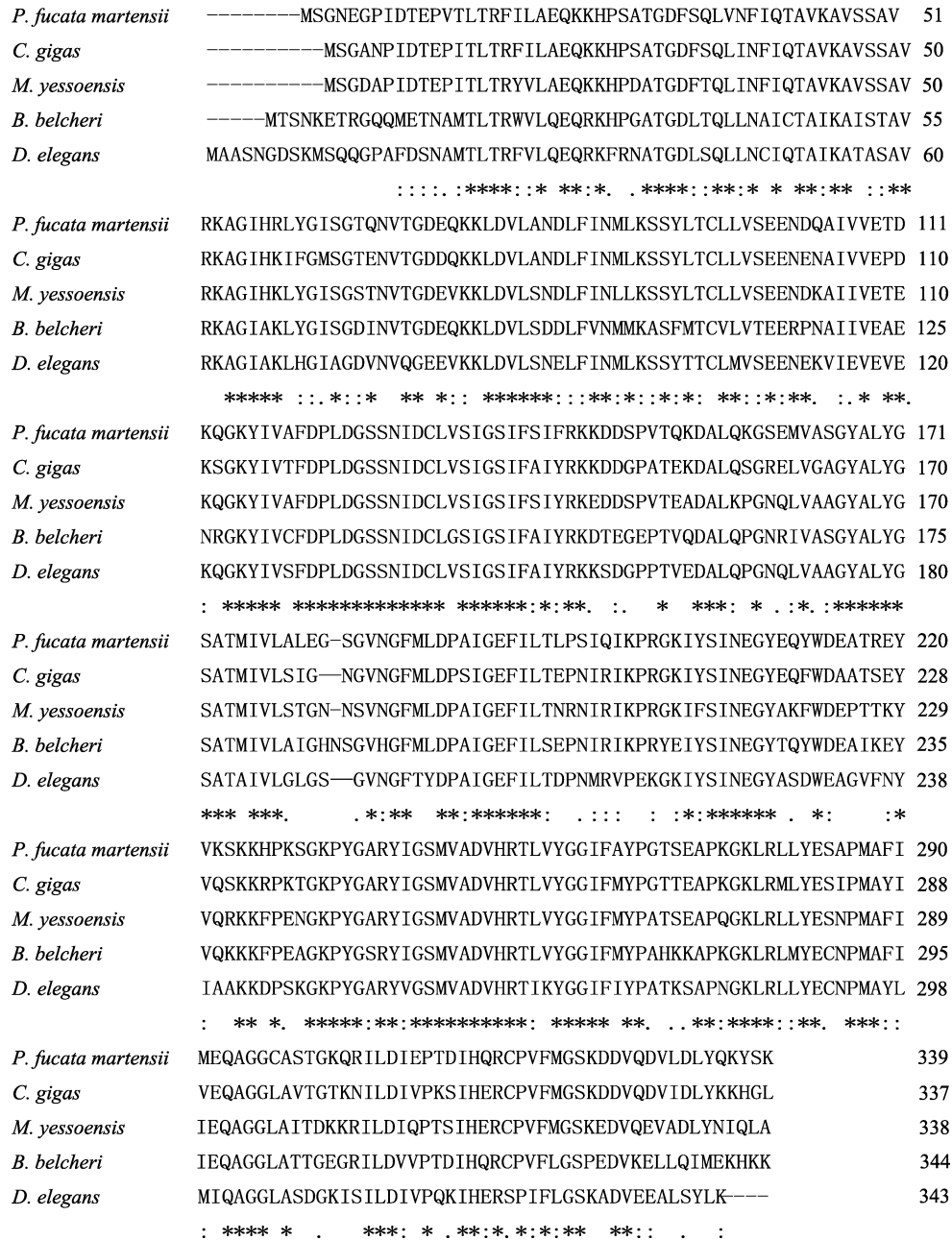


图3 Pm-FBP的多序列比对
Fig.3 Multisequence alignment of Pm-FBP

“*”表示保守的氨基酸；“:”表示具有强烈相似性的氨基酸；“.”表示具有弱相似性的氨基酸
 “*” indicates the conserved amino acid; “:” indicates amino acids with strong similarities;
 “.” indicates amino acids with weak similarities

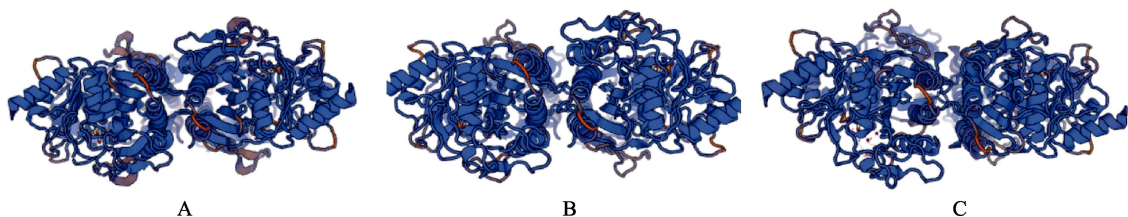


图4 马氏珠母贝(A)、长牡蛎(B)和虾夷扇贝(C)FBP蛋白质分子结构

Fig.4 The spatial structure of FBP Protein molecules in *P. fucata martensii* (A), *C. gigas* (B) and *M. yessoensis* (C)

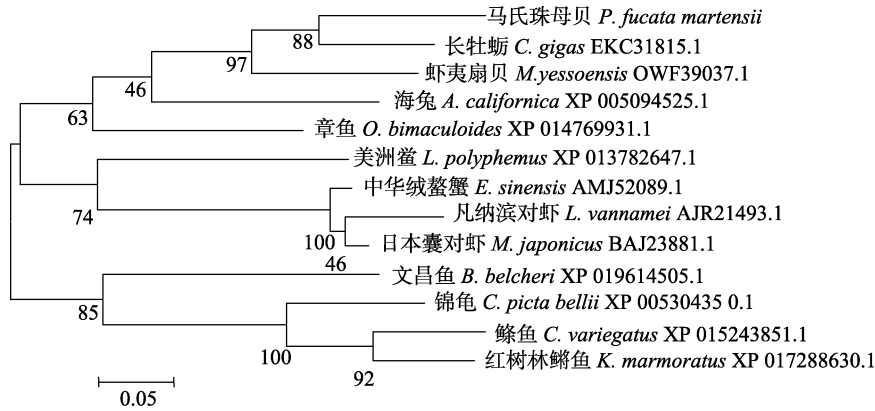


图 5 *Pm-FBP* 的系统进化树
Fig.5 The phylogenetic tree of *Pm-FBP*

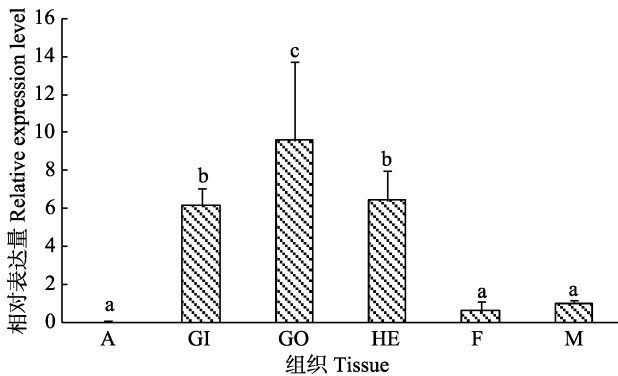


图 6 *Pm-FBP* 在马氏珠母贝不同组织中的表达分布
Fig.6 *Pm-FBP* gene expression profiles in different tissues of *P. fucata martensii*

A: 闭壳肌; GI: 鳃; GO: 性腺; HE: 肝胰腺; F: 足; M: 外套膜。不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同
A: Adductor muscle; GI: Gill; GO: Gonads; HE: Hepatopancreas; F: Foot; M: Mantle. Different letters represent significant difference ($P < 0.05$), the same as below

程(姜妮妮等, 2017)。糖异生作用是在机体处于饥饿状态下, 各种非糖苷底物经过一系列酶促反应合成内源性葡萄糖的过程, 以保证机体的血糖处于正常水平(宫官等, 2013)。FBP 作为催化糖异生过程中的限速酶, 关于 FBP 应对温度胁迫的研究主要集中在植物(徐文亭等, 2013; 何斌等, 2015), 贝类中关于温度胁迫与 FBP 的关系尚未明确。鳃是贝类的重要的代谢器官, 具有呼吸和滤食等多种功能。作为与外界接触的器官, 水温的变化能够直接影响鳃的功能以及作用。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *Pm-FBP* 在低温组、对照组和高温组马氏珠母贝鳃的时序表达模式。结果表明, *Pm-FBP* 表达量在高温组和低温组都出现了先升高后降低的趋势, 且均在 72 h 时达到最大值 ($P < 0.05$), 由此可推测, 该基因与马氏珠母贝生存环境温度 and 胁迫存在很强相关性; 120 h

时高温组和低温组 *Pm-FBP* 表达量均显著下降 ($P < 0.05$), 这说明 *Pm-FBP* 很可能主要在短期温度胁迫中起重要作用。在植物体处于高温情况下, *FBP* 基因在短期会有一个应激上调的过程, 但在长期高温情况下, *FBP* 表达会趋于稳定(陈虎等, 2016; 曲玲等, 2015), 与本研究的高温组结果一致。推测贝体处于温度胁迫条件下, 机体代谢水平下降, 总糖含量处于较低水平, *FBP* 通过参与糖异生过程使马氏珠母贝机体的糖含量处于正常水平。本研究结果证明了 *Pm-FBP* 基因可能是马氏珠母贝在适应温度骤变环境过程中的重要基因, 为马氏珠母贝抗逆基因筛选以及温度胁迫响应机制的深入研究提供参考资料。

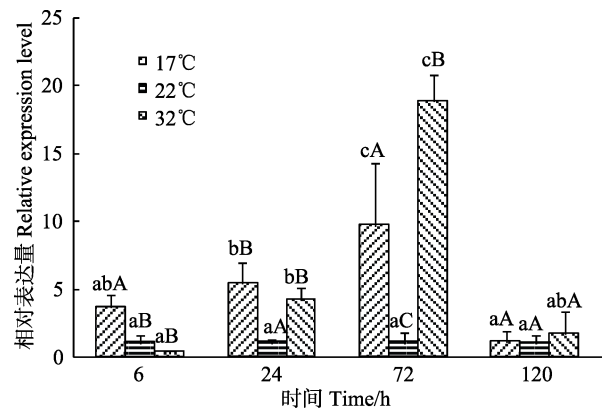


图 7 不同温度下马氏珠母贝鳃中 *Pm-FBP* 基因的时序表达
Fig.7 Temporal expression of the *Pm-FBP* gene in the gills of *P. fucata martensii* at 17°C, 22°C, and 32°C

大写字母表示同一时间点、不同实验组间的 *Pm-FBP* 表达量的统计结果; 小写字母为不同时间点、相同实验组间 *Pm-FBP* 表达量的统计结果

Capital letters indicate the statistical results of *Pm-FBP* expression levels at the same time point in different experimental groups; Lowercase letters are the statistical results of the *Pm-FBP* expression levels in the same experimental group at different time points

参 考 文 献

- Chen H, Tan JH, Yan PD, *et al.* Cloning and expression analysis of *PmFBP* gene in *Pinus massoniana*. *Guangxi Forestry Science*, 2016, 45(1): 12–18 [陈虎, 谭健晖, 颜培栋, 等. 马尾松果糖-1,6-二磷酸酶基因克隆及表达模式分析. *广西林业科学*, 2016, 45(1): 12–18]
- Cheng L, Xu SL, Liu F *et al.* Study on the meat condition index and biochemical compositions of *Mytilus coruscus* in different gonad development stages. *Journal of Marine Sciences*, 2013, 31(4): 68–73 [程亮, 徐善良, 刘飞, 等. 厚壳贻贝性腺不同发育时期肥满度与生化成分分析. *海洋学研究*, 2013, 31(4): 68–73]
- Cota-Ruiz K, Leyva-carrillo L, Peregrino-Uriarte AB, *et al.* Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 198: 1–7
- Cota-Ruiz K, Peregrino-Uriarte AB, Felix-Portillo M, *et al.* Expression of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Marine Environmental Research*, 2015, 106(1): 1–9
- Cotter E, Malham SK, O'keeffe S, *et al.* Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture*, 2010, 303(1–4): 8–21
- Du X, Fan G, Jiao Y, *et al.* The pearl oyster *Pinctada fucata martensii* genome and multi-omic analyses provide insights into biomineralization. *GigaScience*, 2017, 6(8): 1–12
- el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, *et al.* cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(22): 8430–8434
- Feng JB, Wang MZ, Chen HC, *et al.* Effects of temperature and body size on oxygen consumption rate of *Meretrix meretrix*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(2): 126–129 [冯建彬, 王美珍, 陈汉春, 等. 温度和规格对文蛤耗氧率的影响. *上海水产大学学报*, 2004, 13(2): 126–129]
- Gao ZK, Zhang JH, Li M, *et al.* Effects of temperature fluctuation on physiological and immune parameters of scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 148–154 [高振锟, 张继红, 李敏, 等. 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 148–154]
- Gong G, Xue M, Wang J, *et al.* Cloning and sequence analysis of full-length cDNAs of key enzymes of gluconeogenesis in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1504–1518 [高官, 薛敏, 王嘉, 等. 西伯利亚鲟糖异生途径关键酶基因全长 cDNA 的克隆和序列分析. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1504–1518]
- He B, Zhu JH, Long XY, *et al.* Cloning and expression analysis of a chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase gene in *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(3): 448–455 [何斌, 朱晋恒, 龙翔宇, 等. 巴西橡胶树叶绿体型果糖-1,6-二磷酸酶基因的全长 cDNA 克隆与表达分析. *热带作物学报*, 2015, 36(3): 448–455]
- Ivanina AV, Dickinson GH, Matoo OB, *et al.* Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(1): 101–111
- Jiang W, Jiang Z, Du M, *et al.* Physiological and biochemical responses of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, to different thermal stressors. *Aquaculture Research*, 2017, 48(9): 4783–4797
- Jiang WW, Fang JG, Li JQ, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 220–230 [姜娓娓, 方建光, 李加琦, 等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 220–230]
- Kaiser R, Olsson H, Erman M, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphatase. Primary structure of the rabbit liver enzyme. 'Intermediate' variability of an oligomeric protein. *FEBS Letters*, 1996, 389(3): 249–252
- Kim M, Ahn IY, Cheon J, *et al.* Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 152(2): 207–213
- Lozinska-Gabska M, Dziewulska-Szwajkowska D, Szalagan E. Isolation of fructose-1,6-bisphosphatase from the foot muscle of a snail *Helix aspersa maxima*. *Zoologica Poloniae*, 2003, 48(1–4): 81–91
- Mendo T, Semmens JM, Lyle JM, *et al.* Reproductive strategies and energy sources fuelling reproductive growth in a protracted spawner. *Marine Biology*, 2016, 163: 2
- Nie Q, Miao H, Miao S, *et al.* Effects of dietary glucose and dextrin on activity and gene expression of glucokinase and fructose-1,6-bisphosphatase in liver of turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(3): 819–832
- Qu L, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 34(3): 402–410 [曲玲, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜细胞质型果糖 1,6-二磷酸酶基因的克隆及表达分析. *应用海洋学学报*, 2015, 34(3): 402–410]

- Rakus D, Gizak A, Kasprzak AA, *et al.* The mechanism of calcium-induced inhibition of muscle fructose 1,6-bisphosphatase and destabilization of glyconeogenic complex. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76669
- Rosas C, Martinez E, Gaxiola G, *et al.* The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 234(1): 41–57
- Serrato AJ, de Dios Barajas-López JD, Chueca A, *et al.* Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(10): 2923–2931
- Stec B, Yang H, Johnson KA, *et al.* MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the ‘missing’ archaeal fructose-1,6-bisphosphatase. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(11): 1046–1050
- Tian RR, Tian QL, Du XD, *et al.* Molecular characterization and tissue specific expression of *SRF* gene from *Pinctada martensii*. *Genomics & Applied Biology*, 2015, 34(2): 272–278 [田荣荣, 田群莉, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝 *SRF* 基因的分子特征及组织特异性表达. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(2): 272–278]
- Wang J, Wang Z, Ling B, *et al.* Identification of a potential proton donor to the linking oxygen atom in a three-metal ion assisted catalysis pathway catalyzed by fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2017, 73: 191–199
- Wang R, Xiao Q, Gui JF. Molecular cloning and expression analysis of fructose-1,6-bisphosphatase in gibel carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(6): 1130–1135 [王锐, 肖青, 桂建芳. 银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的分子克隆与表达分析. *水生生物学报*, 2010, 34(6): 1130–1135]
- Wang XF, Liu QH, Wu Y, *et al.* cDNA cloning of coat-epsilon gene and its tissue distribution in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 147–152 [王修芳, 刘庆慧, 吴垠, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长 cDNA 克隆及组织分布. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 147–152]
- Wang YH, Yin XX, Ding MM, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *Xbp1-S* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 73–82 [王玉红, 尹晓雪, 丁明媚, 等. 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 73–82]
- Wang ZQ, Ren XY, Gao BQ, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of *F-ATPase β* subunit gene in *Portunus trituberculatus* and its variation in family inbreeding. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 97–106 [王竹青, 任宪云, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 β 亚基 (*F-ATPase β*) 基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 97–106]
- Wu B, Yang AG, Sun XJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 基因组 DNA 甲基化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 140–146]
- Xiao HD, Chen CS, Xu Y, *et al.* Cloning and expression analysis of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase gene from *Pyropia haitanensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33(4): 92–100
- Xu WT, Wang C, Xu XY, *et al.* Cloning and expression analysis of a novel gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase in cotton. *Cotton Science*, 2013, 25(6): 549–556 [徐文亭, 王诚, 徐晓洋, 等. 一个棉花果糖-1,6-二磷酸酶基因的克隆与表达特征. *棉花学报*, 2013, 25(6): 549–556]
- York JD, Ponder JW, Majerus PW. Definition of a metal-dependent/Li(+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(11): 5149–5153

(编辑 马瑾艳)

cDNA Cloning of *FBP* Gene in *Pinctada fucata martensii* and Its Response to Temperature Stress

LAI Zhuoxin¹, LIU Ya¹, WANG Qingheng^{1,2①}, ZHENG Zhe^{1,2}, DENG Yuewen^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Pearl Breeding and Processing Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Zhanjiang 524088)

Abstract Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP) is the rate-limiting enzyme in the gluconeogenesis process. When animals and plants are exposed to adverse environmental conditions, such as temperature stress, FBP participates in the gluconeogenesis pathway to maintain the body's sugar balance, playing an important role in animal and plant stress resistance. In this study, we obtained the *FBP* gene of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (*Pm-FBP*) using the RACE technique and detected the expression level of this gene in six tissues of *P. fucata martensii* as well as its temporal expression pattern in the gill at 17°C (low-temperature group), 22°C (control group), and 32°C (high-temperature group). According to the results of sequence analysis, the full-length *Pm-FBP* sequence was 1381 bp long, including a 54 bp 5' UTR and a 62 bp 3' UTR. The open reading frame was 1020 bp long, encoding a peptide of 339 amino acids with a predicted molecular mass of 37.13 kDa. The isoelectric point of *Pm-FBP* was 6.02. *Pm-FBP* had a Pfam FBPase conserved domain, 6 potential O-linked glycosylation sites (Ser36, Ser56, Ser57, Ser76, Ser80, and Thr115), a potential N-glycosylation site, a metal-binding site (Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser), and 46 phosphorylation sites. Multiple sequence alignment showed that *Pm-FBP* had the highest homology with the corresponding gene in *Crassostrea gigas*, with a similarity value of 83%. The phylogenetic tree indicated that *Pm-FBP* was clustered with shellfish such as *C. gigas*, and then clustered with other mollusks, and arthropods and vertebrates were clustered together, and the evolutionary tree was clustered into three branches. Real-time fluorescence quantitative results showed that *Pm-FBP* was expressed in the adductor muscle, gill, gonads, hepatopancreas, foot, mantle, and other tissues. The gonads had the highest expression of *Pm-FBP*, followed by the hepatopancreas and gill. Time-series analysis showed that *Pm-FBP* expression first increased and then decreased, reaching the maximum at 72 h, which indicates that it may be involved in the response of *P. fucata martensii* to temperature stress. The *Pm-FBP* expression levels in the high-temperature and low-temperature groups decreased significantly at 120 h, suggesting that *Pm-FBP* may play an important role in short-term temperature stress. The results of this study provide reference data for further exploration of the adaptability of *P. fucata martensii* under temperature stress.

Key words *Pinctada fucata martensii*; *FBP*; Temperature stress; Expression analysis; Gene cloning

① Corresponding author: WANG Qingheng, E-mail: wangqingheng@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180326001

http://www.yykxjz.cn/

孙藤芹, 汪文俊, 梁洲瑞, 刘福利, 孙修涛, 曹原, 王飞久. 紫菜养殖对养殖水体中细菌多样性分布及环境因子的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 115-121

Sun TQ, Wang WJ, Liang ZR, Liu FL, Sun XT, Cao Y, Wang FJ. Effect of *Pyropia* farming on bacterial communities and marine environmental factors. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 115-121

紫菜养殖对养殖水体中细菌多样性 分布及环境因子的影响*



孙藤芹^{1,2} 汪文俊^{2①} 梁洲瑞² 刘福利²
孙修涛² 曹原^{1,2} 王飞久²

(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)

摘要 采用基于16S rDNA的高通量测序技术对山东长岛紫菜养殖区的细菌多样性分布进行了研究, 并与环境因子进行关联分析, 以探究紫菜养殖对环境的影响。结果显示, 长岛海区水环境细菌多样性较丰富, 呈现由近岸区(CDCNS)、养殖区(CDPF)、外海区(CDCOS)递减的趋势。分别基于所有细菌组成以及相对丰度最高的前20个属/种的聚类结果均显示, CDCNS和CDCOS区聚在一起, 明显区别于CDPF区。CDPF区的特异优势菌包括鼠尾菌属(*Muricauda*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、海杆菌属(*Marinobacter*)。3个区域均未检测到河豚毒素假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tetraodonis*)、柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)等疑似紫菜致病菌。溶解氧(DO)和pH呈现由近岸向外海逐渐降低的趋势, 总颗粒悬浮物(TSS)反之。CDPF区氨氮(NH₄⁺-N)含量最低, 盐度最高。关联分析发现, 环境因子与环境微生物之间具有一定的相关性, 如嗜氨菌属(*Ammoniphilus*)的丰度与NH₄⁺-N浓度具显著正相关性, CDPF区最低, CDCOS区最高; 盐单胞菌属的分布与盐度具显著正相关性, CDPF区盐单胞菌属含量显著高于其他2个海区。研究表明, 紫菜养殖海区细菌群落结构特征与环境因子具有关联性, 其间的互作机制尚需进一步深入研究。

关键词 条斑紫菜; 环境因子; 细菌; 16S rDNA

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0115-07

紫菜味道鲜美, 营养丰富, 具有较高的经济价值, 是我国养殖面积最大的大型经济海藻(李晓蕾等, 2017)。近年来, 随着养殖需求增加, 主产区养殖海区饱和, 长期密集养殖, 加之全球气候变化、种质退

* 国家重点研发计划(2018YFD0901504)、山东省农业良种工程(南种北繁)项目(2017LZN013)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目(2015A02)和山东省重点研发计划项目(2016GSF115038)共同资助[This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901504), Shandong Agricultural Good Seed (South to North) Project (2017LZN013), the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2015A02), and Key Research and Development Plan of Shandong Province (2016GSF115038)]. 孙藤芹, E-mail: 1379882983@qq.com

① 通讯作者: 汪文俊, 副研究员, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-26, 收修改稿日期: 2018-03-29

化等原因,紫菜在主产区养殖过程中频繁出现病烂、生长迟缓、产量大幅下降等问题,我国紫菜养殖产业受到冲击。

一些学者针对紫菜养殖和育苗过程的病害问题展开了研究。杨锐等(2008)发现假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为健康紫菜表面的优势菌,且在周围海水和病烂紫菜上未分离到该菌。王洪斌等(2011)研究表明,河豚毒素假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tetraodonis*)可能是条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)丝状体黄斑病病原菌。陈国耀等(1999)研究表明,琼脂降解菌主要附着在紫菜网绳上,可能引起紫菜脱落。闫咏等(2002)研究表明,导致条斑紫菜叶状体绿斑病的致病菌是柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)。引起紫菜病变的致病菌大多数为条件致病菌。海洋环境瞬息万变,海水环境中的微生物组成复杂多变,健康稳定的水环境中微生物群落组成处于动态平衡,当某种或某些因素突然改变打破这种平衡,某一或某些条件致病菌就会在这种失衡的状态下迅速繁殖扩增,导致病害暴发。上述研究主要采用从病烂与健康紫菜藻体上分离、鉴定致病菌或藻际微生物方法展开研究,而针对紫菜养殖海区水环境微生物物种组成及群落结构的研究几乎没有。

通过培养、分离、鉴定等传统的方法研究微生物,受培养条件等限制,检测到的微生物物种较少,尤其对一些低丰度和培养条件特殊的细菌往往难以检测到。测序技术的发展带动宏基因组学的诞生,第2代测序技术的产生彻底弥补了第1代测序技术通量低、成本高的缺点,且可实现平行测序、可定量(张丁子等,2016)。基于第2代测序技术的微生物宏基因组研究方法,可高通量检测到样品中几乎全部微生物,包含一些新物种(盖珊珊,2016),能更精确的检测出海洋水环境中菌群的组成和数量。

本研究采用高通量测序技术对山东长岛紫菜养殖海区表层水环境中细菌多样性进行调查,以期掌握长岛紫菜养殖区水环境中的细菌多样性分布,通过与邻近非养殖海区水环境中微生物组成的比较,探索紫菜养殖活动对水环境细菌多样性分布的影响,为紫菜养殖病害的预测及防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

于2016年12月从山东长岛紫菜养殖区分别采集了近岸区(CDCNS)、紫菜养殖区(CDPF)、外海区

(CDCOS)的海水样品 3 L, 每组 6 个重复。现场用 0.22 μm 混合纤维滤膜抽滤海水样品,滤膜对折后置冻存管于干冰中保存,带回实验室,放入 -80°C 保存。

用塑料水桶或颠倒式采水器采集表层水样,测量指标包括温度、pH、溶解氧(DO)、盐度、氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)、硅酸盐($\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$)、总悬浮物(TSS)等。

1.2 实验方法

1.2.1 基于 16S rDNA 序列的第 2 代测序与分析

该项工作委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。样品微生物的提取采用 DNA 提取试剂盒(HiPureSoil DNA Kits)(Megan, 广州)。DNA 的质量检测采用琼脂糖凝胶电泳法,用带有 Barcode 的特异引物对扩增 16S rDNA V3+V4 区(引物序列为 F: CCTAYGGGR-BGCASCAG; R: GGACTACNNGGGTATCTAAT)。PCR 扩增产物切胶回收,用 Qubit 3.0 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,构建测序文库,进行 Hiseq 2500 PE250 (Illumina, 美国)测序。

对测序得到的原始数据进行处理,首先过滤掉低质量的序列,得到 Clean data。然后,根据 PE reads 之间的重叠关系,将成对双端 Reads 拼接为一条序列(Tag)。利用 Mothur(v.1.34.0)软件包对 Tag 序列进行去冗余处理(Patrick *et al*, 2009),挑选出 Unique tag 序列。使用基于 Naive Bayesian 方法的分类器 Rdp classifier 工具,对 Tag 进行物种注释。为了更好地获得样品中物种的多样性信息,进一步对 Tags 进行 OUT (Operating Taxonomic Unit)聚类,通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行比对和 OTU Pathway 注释。计算 Alpha 多样性指数(Chao、ACE、Shannon 和 Simpson)与样品间 Bray-Curtis 系数,并根据 Bray-Curtis 系数的计算结果对样品进行聚类分析。

1.2.2 环境因子分析 使用 YSI 多参数水质分析仪 Proplus(美国)现场测定水温、pH、盐度、DO,使用 AA3 连续流动分析仪(Seal, 德国)测定各项营养盐的浓度。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的测定采用靛酚蓝法, $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ 的测定采用硅钼蓝法, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的测定采用抗坏血酸还原磷钼蓝法(GB/T 12763.4-2007),检测限分别为 0.04、0.030、0.024 $\mu\text{mol/L}$ 。TSS 通过称量过滤前后滤膜的差值计算(GB17378.4-2007)。根据 R 语言的皮尔森相关系数计算环境因子与微生物的丰度之间的相关性。

2 结果

2.1 长岛海区海水中细菌组成

对长岛海区海水样品测序结果通过 KEGG 数据库进行比对和 OTU Pathway 注释分析, 共检测出细菌 42 门。变形细菌门(Proteobacteria)为整个海区优势菌, 其次为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、放线菌门(Actinobacteria)、SBR1093、疣微菌门(Verrucomicrobia)、广古菌门(Euryarchaeota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)。

长岛海区海水样品中共检测出 217 属。其中, 丰度最高的 10 个属分别为噬甲基菌属(*Methylophaga*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、嗜氨菌属(*Ammoniphilus*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、海洋粘细菌属(*Plesiocystis*)、南极杆菌属(*Antarctobacter*)、共生菌属(*Candidatus*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、十八杆菌属(*Octadecabacter*)。

2.2 长岛海区水环境微生物多样性分析

绘制不同海区样品在 0.03 距离下的 Alpha 丰富程度表, Chao、ACE 和 Shannon 3 种指数越大, Simpson 指数越接近于 0, 表示样品中的物种越丰富。

结果显示, 长岛整个海区海水微生物多样性都比较高, 其中, 以 CDCNS 的微生物物种组成最丰富, 且与其他 2 个海区差异明显(表 1)。

表 1 样品 Alpha 多样性统计结果

样品名称 Sample	Chao1 指数 Chao1	ACE 指数 ACE	香浓指数 Shannon	辛普森指数 Simpson
近岸区 CDCNS	16813	31122	4.94	0.0536
外海区 CDCOS	12154	22062	3.88	0.1215
养殖区 CDPF	13711	24566	4.08	0.1276

2.3 长岛海区海水菌群在各海区的聚类关系

根据在各个分类水平上各海区样品 OUT 数据, 计算样品间 Bray-Curtis 系数, 并根据 Bray-Curtis 系数的计算结果对样品进行聚类分析, 以判断在属分类水平上各样品的相似性与特异性。CDPF 明显区分于 CDCNS 和 CDCOS 区, 后二者优先聚为一组(图 1)。表明 CDCNS 和 CDCOS 区微生物群落结构更为相似, CDPF 区的细菌群落结构明显区别于 CDCNS 和 CDCOS 区。

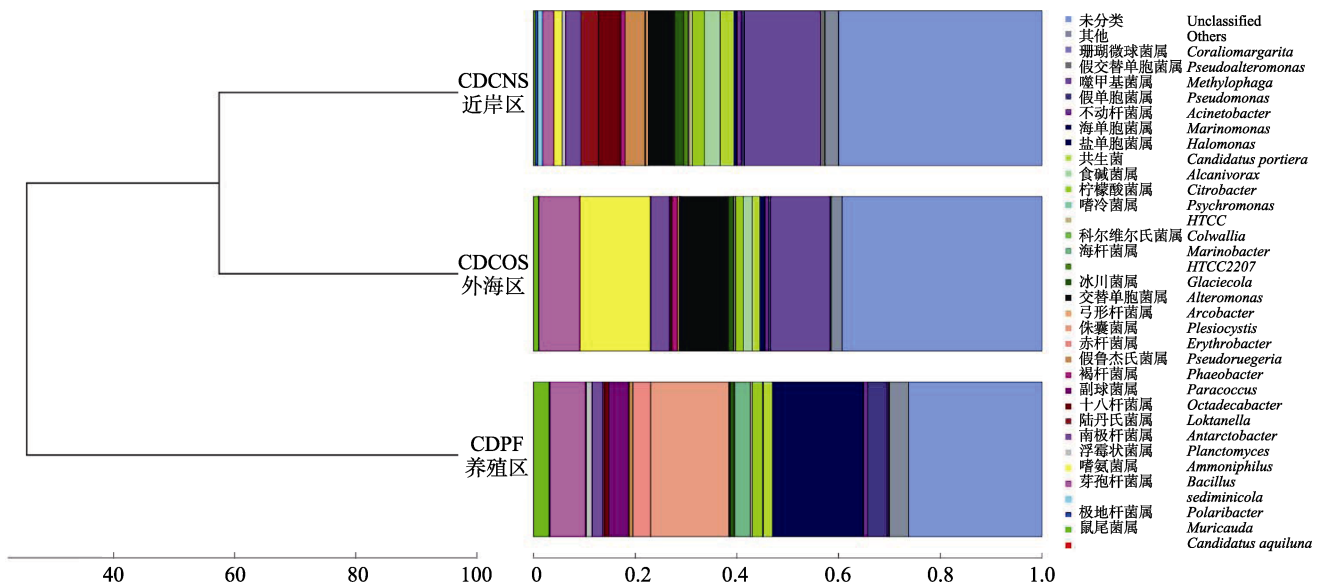


图 1 不同海区微生物群落结构的聚类关系
Fig.1 Cluster of microflora structure

2.4 养殖区较其他海区的细菌物种组成差异

根据长岛海水样品细菌物种分类的 OTU 数据绘制热图, 以展示丰度最高的前 20 个属/种在不同区域间的表达情况(图 2)。聚类结果与图 1 类似, CDCNS

与 CDCOS 区优先聚在一起。其中, 鼠尾菌属(*Muricauda*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、海洋粘细菌、副球菌属(*Paracoccus*)为 CDPF 区特异

性的优势菌。冰川菌属(*Glaciecola*)、共生菌、十八杆菌属、假鲁杰氏菌(*Pseudoruegeria*)、陆丹氏菌属(*Loktanella*)为 CDCNS 区特异性的优势菌。嗜氨菌属在 CDCOS 区相对丰度明显高于其他 2 个区域(图 2)。

2.5 典型菌属与环境因子的关联性分析

3 个区域海水盐度、pH、DO、营养盐等环境因子结果见表 2。从表 2 可以看出, CDPF 区的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$

含量最低, CDCOS 区最高。同时, 整个海区盐度较高, 尤以 CDPF 区盐度最高。DO 和 pH 呈现由近岸向外海逐渐降低的趋势, TSS 则由近岸向外海逐渐增高。环境因子与环境微生物关联分析发现, 嗜氨菌属的分布与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TSS 的空间分布呈正相关, CDPF 区的嗜氨菌属丰度最小, CDCOS 区嗜氨菌属丰度最大。盐单胞菌属和海杆菌属的分布与盐度具显著相关性, CDPF 区盐单胞菌属和海杆菌属含量最多, 其他 2 个海区盐单胞菌含量较少(表 3)。

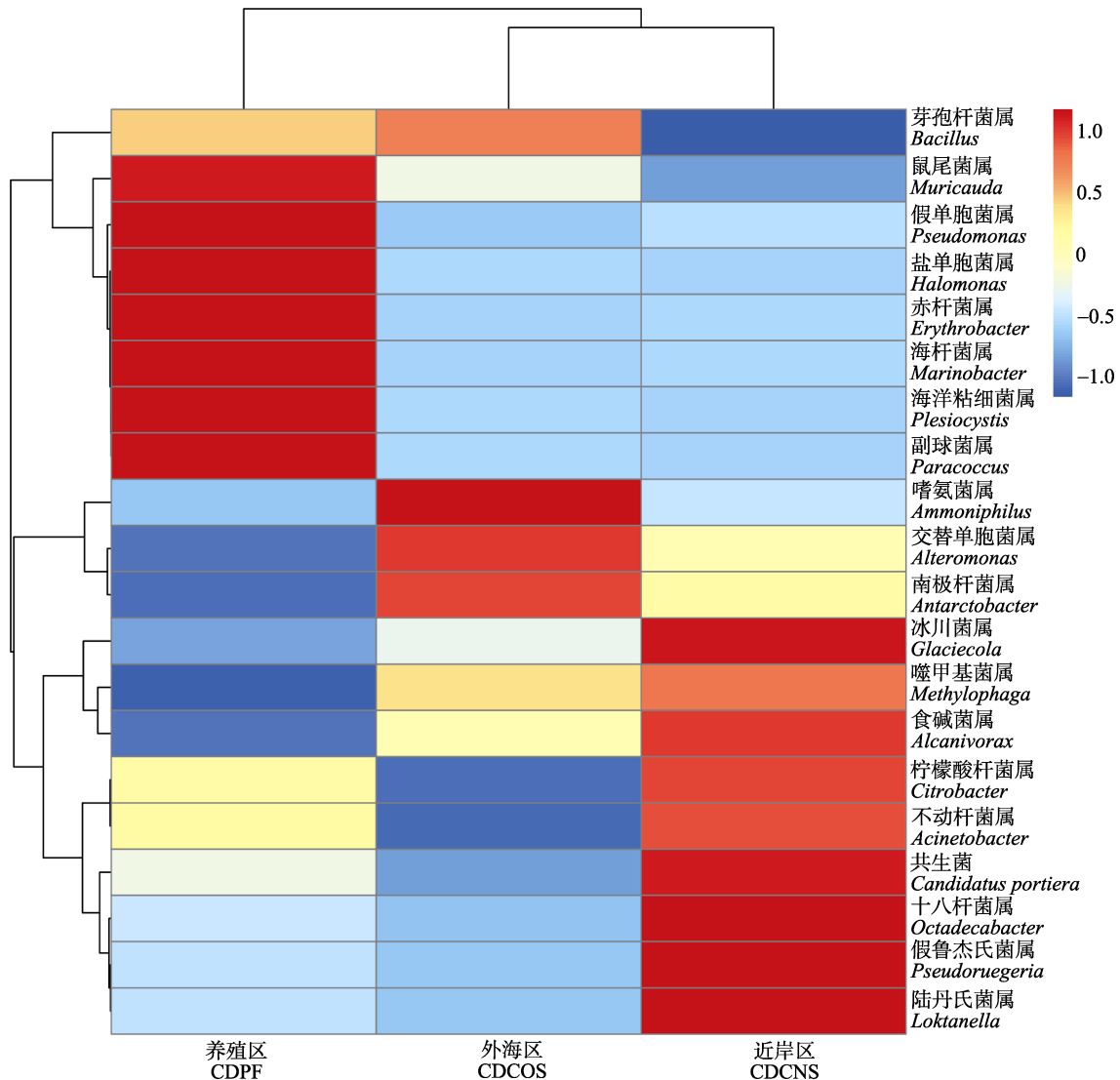


图 2 不同海区属分类水平的差异
Fig.2 Genus diversity among the three areas

3 讨论

紫菜富含蛋白质、维生素、矿物质和不饱和脂肪酸, 具有很高的营养价值, 是我国重要的大型经济海藻之一。紫菜养殖面积大, 养殖区域广, 其创造的经

济价值占全球大型海藻年总产值的 20% (陆勤勤等, 2016)。养殖紫菜还兼具修复近岸海洋环境的生态效益。条斑紫菜是我国北方地区主要养殖海藻品种, 近年来, 其养殖过程病烂、生长迟缓等问题日趋严重。微生物是环境重要组成, 其组成和结构变化将对养殖

表 2 各海区环境因子分析
Tab.2 Environmental parameters of the three areas

样品名称 Samples	氨氮 NH ₄ ⁺ -N (μmol/L)	硅酸盐 SiO ₃ ²⁻ -Si (μmol/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (μmol/L)	溶解氧 DO (mg/L)	盐度 Salinity	pH	总悬浮物 TSS (mg/L)
近岸区 CDCNS	0.49	5.73	0.71	10.2	32.1	8.06	23.80
养殖区 CDPF	0.18	8.08	1.02	10.0	32.3	7.89	28.53
外海区 CDCOS	0.89	9.92	1.05	9.7	32.1	7.76	45.47

表 3 环境因子与部分菌属之间的相关系数
Tab.3 Correlation between environmental parameters and the abundance of some microorganisms

样品名称 Samples	氨氮 NH ₄ ⁺ -N (μmol/L)	硅酸盐 SiO ₃ ²⁻ -Si (μmol/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (μmol/L)	溶解氧 DO (mg/L)	盐度 Salinity	pH	总悬浮物 TSS (mg/L)
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	-0.82	0.09	0.45	0.11	1.00	-0.08	-0.29
嗜氨菌属 <i>Ammoniphilus</i>	0.94	0.77	0.49	-0.88	-0.58	-0.78	0.95
海杆菌属 <i>Marinobacter</i>	-0.83	0.07	0.43	0.13	1.00	-0.06	-0.31

生物的生长产生重要影响。已有研究多从温度、气候、种质与特定致病菌分离鉴定着手,而缺乏对养殖环境微生物群落结构特征的解析。

本研究发现,山东长岛海域丰度最高的细菌菌群为变形细菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、放线菌门、SBR1093、疣微菌门等。付新华等(2017)和白洁等(2009)研究表明,环境微生物群落因海区和季节不同呈动态变化。对比不同采样时间,变形菌、拟杆菌、放线菌、浮霉菌等在渤海海洋保护区典型海域与黄海北部海域也被发现为主要优势菌,这些菌应该是海洋环境中普遍存在的细菌门类。疣微菌在秋季的渤海海域也是优势菌门(付新华等, 2017),但白洁等(2009)研究表明,在黄海北部海域水环境的优势菌组成中未包含该菌,推测疣微菌门可能为渤海海域特有的优势菌。在属分类水平上,本次调查海区发现 217 属,付新华等(2017)调查的渤海海区为 227 属,具有较好的区域一致性。然而,本次调查的长岛海域与付新华等(2017)调查的渤海保护区在蓝细菌门丰度上差异很大,这可能跟采样季节有关,本次采样时间在冬季,而付新华等(2017)采样时间在秋季,肖天等(2002)研究表明,低温不利于蓝细菌生存繁殖。

藻类和微生物群落之间相互利用、相互选择,在藻类周围形成特有的微生物群落结构(Fisher *et al.*, 1998)。通过聚类分析发现,长岛海域紫菜 CDPF 的微生物群落结构明显区别于相邻的 2 个区域,而相距较远的 CDCNS 和 CDCOS 区的微生物群落结构反而更为接近,这说明紫菜养殖确实对环境中微生物群落结构产生了影响。条斑紫菜养殖区水环境中特有的优势菌属包括鼠尾菌属、假单胞菌属、盐单胞菌属、赤杆菌

属、海杆菌属、海洋粘细菌属、副球菌属,其中,部分种属已在不同海区、不同紫菜样品的藻际微生物中被证实为优势菌。杨锐等(2008)从山东青岛的条斑紫菜叶状体表面分离得到海杆菌;武洪庆(2012)分别在射阳、连云港和大平三地的条斑紫菜表面分离得到了假单胞菌属;沈梅丽等(2013)在坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)特有的共附生细菌中分离到赤杆菌属和副球菌属。在不同海区不同紫菜样品或紫菜养殖区中,海杆菌属、假单胞菌属、赤杆菌属和副球菌属作为优势菌被检测或分离到,因此,作者推测,它们是典型的紫菜外生细菌组成,应与紫菜生长息息相关,但是,彼此间的互作关系尚需进一步深入探明。

通过藻际微生物研究发现,假交替单胞菌为条斑紫菜优势附生菌,且对条斑紫菜叶状体和丝状体生长均无不良影响(杨锐等, 2008)。杨锐等(2008)没有在其紫菜样品的相应生活水体中分离到该菌,可能由于所采用的第 1 代测序技术通量低,难以检测到水体中的低丰度菌,而假交替单胞菌在水体中丰度较低。通过对条斑紫菜丝状体黄斑病进行培养、分离等研究发现,河豚毒素假交替单胞菌可能为重要的致病菌组成(王洪斌等, 2011)。对条斑紫菜叶状体绿斑病的研究发现,柠檬假交替单胞菌是致病的直接因素(闫咏等, 2002)。本研究对长岛紫菜养殖区与非养殖区调查发现少量假交替单胞菌,其相对丰度小于 0.1%,且不同区域间假交替单胞菌的分布没有差异。调查结果未发现河豚毒素假交替单胞菌和柠檬假交替单胞菌,可能由于其丰度极低而未被检测到。

水环境中细菌多样性既与附近生物体的代谢活动、生理特征有关,又与环境因子(温度、盐度、DO、

pH、营养盐等)相关(胡晓娟, 2013)。本次调查结果发现, 环境因子在区域间具有较为明显的规律性, 如 DO、pH 呈现由近岸到外海逐渐递减, TSS、Si 和 P 呈由近岸到外海逐渐递增, $\text{NH}_4\text{-N}$ 的含量也在 CDCOS 区最高。由于调查海域有贝类养殖, 且与 CDCOS 区较近, 而离 CDCNS 区最远。贝类养殖消耗 O_2 造成 DO 下降, 排泄造成 TSS 和 N、P 等无机营养盐升高。而 CDPF 区 $\text{NH}_4\text{-N}$ 大大低于 CDCNS 区, 则是由紫菜生长消耗而致。而 CDPF 区的盐度也略高于其他 2 个区域, 其原因尚未知。通过关联以上环境参数与环境微生物分析发现, 二者在空间分布上具有一定的关联性, 如嗜氨菌属需生长在高浓度氨离子的环境中, 对氨有很强的依赖性(Zaitsev *et al*, 1998), 因此, 其分布与 NH_4^+ 的空间分布呈显著正相关, 成为 CDCOS 区典型的优势菌。盐单胞菌属为嗜盐菌, 喜繁盛于盐度较高的盐场附近或海洋中(刘军华等, 2009)。本研究发现, 盐单胞菌属的分布受盐度影响较大。CDPF 区盐度较 CDCNS 和 CDCOS 区略高, 盐单胞菌属则成为 CDPF 区特异性的优势菌。由于盐单胞菌属具有反硝化作用(赵贵成等, 2011), 可将海水中的 NO_3^- 还原为 NH_4^+ , 而紫菜在摄取氮盐的过程中, 优先消耗 $\text{NH}_4\text{-N}$ (Bronk *et al*, 1994), 因此, 盐单胞菌属的富集对紫菜生长应是有利的。

参 考 文 献

- Bai J, Li HY, Zhao YG. Bacterial distribution at different stations in the Northern Yellow Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 343–350 [白洁, 李海艳, 赵阳国. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征. *微生物学报*, 2009, 49(3): 343–350]
- Bronk DA, Glibert PM, Ward BB. Nitrogen uptake dissolved organic nitrogen release and new production. *Science*, 1994, 265(5180): 1843–1846
- Chen GY, Shen HS, Zhu MX, *et al*. Preliminary investigation on attaching bacteria and disease bacteria in thalli of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Aquaculture*, 1999(1): 17–19 [陈国耀, 沈怀舜, 朱庙先, 等. 条斑紫菜叶状体附生菌及病原菌的初步调查. *水产养殖*, 1999(1): 17–19]
- Fisher MM, Wilcox LW, Graham LE. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on Charophycean green algae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4384–4389
- Fu XH, Liu GN, He JL, *et al*. Analysis of microbial community diversity in the Bohai Sea marine protected areas of the Shandong Province. *Marine Sciences*, 2017, 41(1): 39–47 [付新华, 刘国宁, 何健龙, 等. 山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落多样性分析. *海洋科学*, 2017, 41(1): 39–47]
- Gai SS, Zhang WD. Microbiota of shell-boring conchocelis of *Pyropia yezoensis* determined by the next-generation sequencing. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(5): 990–996 [盖珊珊, 张伟东. 基于第二代测序技术的条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)贝壳丝状体附生菌群研究. *海洋与湖沼*, 2016, 47(5): 990–996]
- Hu XJ. Analysis on microbial community characteristics in the typical sea areas in Guangdong Province. Master's Thesis of Jinan University, 2013, 46–49 [胡晓娟. 广东典型海域微生物群落特征分析. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2013, 46–49]
- 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. 野生条斑紫菜叶状体对干旱胁迫的抗氧化生理响应特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 156–163]
- Li W, Mamat O, Xu JL, *et al*. Comparative study of volatile components from tow strains of *Pyropia haitanensis* in different culture areas. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 147–156 [李微, 阿曼尼萨·买买提, 徐继林, 等. 不同海域不同品种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)挥发性成分的比较分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 147–156]
- Liu JH, Long C, Lu XL, *et al*. Identification and bioassays of a strain of *Halomonas* sp. from the East China Sea. *Chinese Journal Marine Drugs*, 2009, 28(6): 5–10 [刘军华, 龙聪, 卢小玲, 等. 一株来源于东海的盐单胞菌的鉴定及活性筛选. *中国海洋药物杂志*, 2009, 28(6): 5–10]
- Patrick DS, Sarah LW, Thomas R, *et al*. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541
- Shen ML, Yang R, Luo QJ, *et al*. Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087–1102 [沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1087–1102]
- Wang HB, Li XS, Xia YM, *et al*. Isolation, identification and biological pathogen of yellow spot disease in conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(3): 361–364, 408 [王洪斌, 李信书, 夏亚明, 等. 条斑紫菜丝状体黄斑病原体分离鉴定及生物学特性研究. *海洋环境科学*, 2011, 30(3): 361–364, 408]
- Wu HQ. Epibacterial community structure of several macroalgae. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2012, 50–51 [武洪庆. 不同养殖海藻表面附着细菌多样性分析. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2012, 50–51]
- Xiao T, Wang R. Distribution of *Synechococcus* in the Bohai Sea in Autumn and Spring. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(12): 2071–2078 [肖天, 王荣. 春季与秋季渤海蓝细菌(聚球蓝细菌属)的分布特点. *生态学报*, 2002, 22(12): 2071–2078]
- Yan Y, Ma JH, Xu P, *et al*. *Pseudoalteromonas citrea*, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 353–358 [闫咏, 马家海, 许璞, 等. 1株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 353–358]
- Yang R, Fang WY, Shan YY, *et al*. Genetic diversity of epiphytic bacteria in *Porphyra yezoensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(4): 161–168 [杨锐, 方文雅, 单媛媛, 等. 条斑紫菜外生细菌的遗传多样性. *海洋学报*, 2008, 30(4): 161–168]
- Zaitsev GM, Tsitko IV, Rainey FA, *et al*. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: Description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *International*

Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(1): 151–163
 Zhang DY, Zhang TX, Wang GX. Development and application of second-generation sequencing technology. Environmental Science and Technology, 2016, 39(9): 96–102 [张丁予, 章婷曦, 王国祥. 第二代测序技术的发展及应用. 环境科学与技术, 2016, 39(9): 96–102]

Zhao GC, Zhang T, Gao Y, *et al.* Identification and bioactivities analysis of *Halomonas* sp. from seawater. Academic Journal of Second Military Medical University, 2011, 32(8): 813–817 [赵贵成, 张韬, 高云, 等. 海洋盐单胞菌属微生物的鉴定及生物学活性分析. 第二军医大学学报, 2011, 32(8): 813–817]

(编辑 陈严)

Effect of *Pyropia* Farming on Bacterial Communities and Marine Environmental Factors

SUN Tengqin^{1,2}, WANG Wenjun^{2①}, LIANG Zhouhui², LIU Fuli²,
 SUN Xiutao², CAO Yuan^{1,2}, WANG Feijiu²

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

Abstract *Pyropia* is one of the most economically important seaweeds, which is mainly cultured in China. In recent years, water quality deterioration caused by long-term and intensive culture have led to problems for *Pyropia* aquaculture, such as disease outbreaks, decreased yields, and lower product quality. Microorganisms are important components of the environment and have important effects on the growth of other organisms. In this study, the microbial community structure in a *Pyropia yezoensis* aquafarm in Changdao, China, was studied using 16S rDNA-based high-throughput sequencing technology. Whether there were correlations between different environmental factors and the abundance of some predominant bacterial taxa was also tested to explore the environmental impacts of *Pyropia* farming. The results showed that microbial diversity was rich in the surveyed marine area. The abundance of Proteobacteria was the highest among all of the identified bacterial phyla. When the *Pyropia* farming area was compared with nearby non-farming areas, it was found that the highest abundances of microbial species occurred in the near-shore area (CDCNS), followed by the *Pyropia* farming area (CDPF), and the microbial diversity was the lowest in the offshore area (CDCOS). Cluster analysis of the samples was carried out based on Bray-Curtis similarity coefficient values calculated among them. The microbial community structure of CDCNS and CDCOS formed a clade that was separated from CDPF. Furthermore, the twenty genera with the highest abundances were used for a further cluster analysis, and the results showed that CDCNS and CDCOS clustered together, with more genera being especially abundant in CDPF. The predominant bacteria from CDPF included *Muricauda*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Erythrobacter*, and *Marinobacter*. Suspected pathogenic bacteria of *Pyropia*, such as *Pseudoalteromonas tetraodonis* and *Pseudoalteromonas citrea*, were not identified in the surveyed areas. Indeed, the abundance of the genus *Pseudoalteromonas* was lower than 0.1%, suggesting that the environment was safe for *Pyropia* farming. Dissolved oxygen (DO) and pH decreased gradually from CDCNS to CDCOS, and TSS increased gradually from CDCNS to CDCOS. The content of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was the lowest in CDPF and the highest in CDCOS, while the salinity was the highest in CDPF. Correlation analyses showed that there were relationships between environmental factors and environmental microorganisms. The abundance of *Ammoniphilus* was positively correlated with the content of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, which was the lowest in CDPF and the highest in CDCOS. The distribution of *Halomonas* was related to salinity, and the abundance of *Halomonas* was significantly higher in CDPF than in the other two areas. *Halomonas* functions in denitrification, and thus can promote the conversion of N from an oxidized state to reduced forms that are more easily absorbed by algae. In conclusion, this study represented the first report of the structure of the microbial community in a *Pyropia* aquafarm and its correlation with environmental factors. The results showed that farming *Pyropia* had significant influences on the environmental microbial community, which were closely related to variations in environmental factors caused by *Pyropia* farming. Such changes in environmental factors and microbial structure had corresponding effects on *Pyropia* growth. The mechanisms of these interactions between environmental microorganisms and *Pyropia* growth should be further investigated in the future.

Key words *Pyropia yezoensis*; Environment factors; Bacteria; 16S rDNA

① Corresponding author: WANG Wenjun, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180406003

http://www.yykxjz.cn/

李靖, 廖梅杰, 李彬, 王印庚, 荣小军, 张正, 范瑞用, 刘安然. 养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的菌群特征及其与环境菌群相关性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 122-131

Li J, Liao MJ, Li B, Wang YG, Rong XJ, Zhang Z, Liu AR, Fan RY. The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during the early developmental stage and its relationship with environmental flora. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40 (2): 122-131

养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的 菌群特征及其与环境菌群相关性分析*

李 靖^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 李 彬^{2,3} 王印庚^{2,3}
荣小军^{2,3} 张 正^{2,3} 范瑞用⁴ 刘安然^{1,2}



(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. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400)

摘要 采用传统细菌培养方法, 对养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)早期发育各阶段幼体体内及环境(投入饵料及培育用水)菌群的组成与结构展开研究, 对分离的优势细菌进行分子鉴定, 在此基础上, 进行了刺参幼体体内菌群结构与环境菌群结构相关性分析。幼体各发育期的细菌培养结果显示, 在幼体开口前的各发育时期(性腺、卵、受精卵、原肠胚)均无可培养细菌, 在投饵以后, 耳状幼体、樽形幼体体内可分离到可培养细菌, 幼体发育到稚参以后, 消化道可培养细菌总数急剧增加, 并在 4 月龄时达到 10^8 CFU/g 数量级。在幼体体内可培养细菌中, 弧菌(*Vibrio*)占比为 2.2%~77.3%。对环境菌群的细菌培养结果显示, 培育用水中细菌含量变化不显著, 随着幼体发育期饵料的转变, 不同时期饵料中细菌含量差异显著。整个养殖系统中共分离到 65 株优势细菌, 16S rDNA 鉴定结果显示, 所分离的 65 株优势菌鉴定为 14 个属 43 种细菌。相关性分析结果显示, 随着幼体的发育, 生物饵料中的细菌对消化道中的菌群结构影响越来越大。本研究结果为解析刺参消化道菌群的形成过程和演替规律以及养殖用益生菌的筛选与应用奠定了基础。

关键词 刺参; 早期发育; 可培养细菌; 菌群特征

中图分类号 S947 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0122-10

刺参(*Apostichopus japonicus*), 又名仿刺参, 在 方地区重要的海珍品之一, 具有很高的药用与营养价
中国主要分布于山东半岛和辽东半岛沿海, 是中国北 值(Bordbar *et al*, 2011)。随着刺参集约化养殖的发展,

* 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(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(20603022016008)和山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)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 Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016008), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010)]. 李 靖, E-mail: 362477084@qq.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 副研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-06, 收修改稿日期: 2018-04-24

各种传染性疾病也频频发生,如耳状幼体时期的烂边病、烂胃病,稚参时期的化板症、肠炎病和腐皮综合征(王印庚等,2012、2013;张文泽等,2015;逢慧娟等,2017),给刺参养殖业造成了巨大的经济损失。

感染微生态学认为,细菌性疾病的发生与体内菌群失调密切相关。解析刺参早期发育时期体内菌群结构及其与环境菌群相关性对其健康养殖具有重要意义。近年来,对于刺参肠道菌群结构的研究已成为热点,肠道内的细菌群落组成直接受到刺参栖息环境中的菌群变化影响(李彬等,2012),且与疾病发生密切相关。现已对刺参肠道、肠含物及养殖环境(水、底泥、附着基)菌群(Gao *et al.*, 2014a, b; Zhang *et al.*, 2013; 李彬等,2016),以及不同季节、养殖时期和盐度下刺参肠道菌群结构开展了相关研究(关晓燕等,2011;李建光等,2014;李彬等,2012;王姣姣等,2015a, b),而关于刺参早期发育各阶段体内菌群结构的研究未见报道。刺参早期发育过程包括受精卵、囊胚期、原肠期、耳状幼体、樽形幼体、五触手幼体和稚参几个时期。其中,耳状幼体摄食单胞藻等饵料,樽形幼体不摄食,五触手幼体和稚参之后阶段属沉积性食性。解析其肠道菌群的发生、发展以及变化,将为建立纠正肠道菌群失调、增强机体体质、提高抗病力的微生态学方法提供理论依据。本研究以传统培养方法,对养殖刺参早期发育各阶段幼体体内及环境(投入饵料及培育用水)菌群的组成与结构开展研究,对分离的优势细菌进行分子鉴定,在此基础上,进行了刺参幼体体内菌群结构与环境菌群结构相关性分析,以期解析刺参消化道菌群的形成过程和演替规律以及养殖用益生菌的筛选与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 早期发育阶段养殖刺参样品的采集及处理

2017年3~10月,在山东青岛瑞滋海珍品发展有限公司采集样品。亲参为升温促熟的成熟刺参,育苗用水为砂滤海水。分别采集发育成熟的雌性性腺(CX)、雄性性腺(XX)以及未受精卵(L)、受精卵(SJL)、原肠胚(YC)、耳状幼体(EZ)、樽形幼体(ZX)和附着后1月龄(ZS5)、2月龄(ZS6)、4月龄(ZS8)、6月龄(ZS10)时期的稚参,同时,采集同期培育池进水口水样(W)与饵料(EL)。

1.1.1 刺参幼体肠道的采样及处理 鉴于浮游期无法区分肠道,故这几个发育期的幼体经250目灭菌筛绢收集后,用灭菌3% NaCl溶液反复冲洗数次,对

幼体计数后,研磨、匀浆、梯度稀释,然后涂布于含1.5% NaCl的TSA和TCBS琼脂培养基,每梯度3个平行。对于稚参时期后的样本,采样方法为停食12h,空胃后解剖摘取稚参肠道,用灭菌3% NaCl溶液冲洗肠道。对采集的肠道称重后研磨、匀浆、梯度稀释,然后涂布TSA和TCBS琼脂培养基,每梯度3个平行。涂布后的平板在28℃恒温培养箱中培养24h,根据TSA和TCBS琼脂培养基上的菌落数,计算各样品中的可培养细菌总数和可培养弧菌(*Vibrio*)总数。

1.1.2 培育用水与饵料的采样及处理 分别收集各幼体发育时期培育用进水口水样和所投喂饵料样本。初耳幼体时期的饵料主要为代用饵料(海洋红酵母、干酵母等)与螺旋藻混合而成,大耳幼体向樽形幼体转变时期的饵料又添加了EM菌、食母生片,稚参时期的饵料主要为基础配合饲料[原料为马尾藻(*Scagassum*)、海带(*Laminaria japonica*)、扇贝边]与新鲜海泥混合而成。培养及计数方法同1.1.1,计算各样本中的可培养细菌总数和弧菌总数。

1.2 菌株的分离、纯化与保藏

根据菌落形态、颜色、大小等特征,对不同时期幼体、培育用水和饵料样本TSA培养基获得的可培养细菌进行分类和优势度统计,对优势菌进行分离、纯化并保种。

1.3 细菌16S rDNA序列测定

采用热裂解法制备细菌DNA,采用16S rDNA序列进行细菌鉴定,所用引物:27F 5'-AGAGTTG-ATC(C/A)TGGCTCAG-3',1492R 5'-TACGG(C/T)TACCCTTGTTACGACTT-3。反应体系及扩增条件采用史秀清等(2015)方法。扩增产物由生工生物工程(上海)有限公司进行测序,测序结果采用Contigexpress软件拼接后与EzBioCloud数据库进行同源性比对,选出相似性最高、分类地位清楚的标准菌株,对各样品中的菌株进行汇总及分类分析。

1.4 数据分析

菌落计数统计结果采用SPSS 17.0软件,用单因子方差分析(One-way ANOVA)和Duncan's多重比较进行差异显著性检验,结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示, $P < 0.05$ 为差异性显著。根据16S rDNA鉴定结果,统计各菌株在刺参幼体不同时期、不同样本的分布情况,基于属的分类水平利用R语言软件包对各样本相关性进行主成分分析(PCA分析)。

2 结果

2.1 幼体不同发育期体内及环境可培养细菌的定量分析

以 TSA 培养获得的菌落数对各样本可培养细菌的定量分析结果见表 1。从表 1 可以看出, 在幼体开口前的各发育时期(性腺、未受精卵、受精卵、原肠胚)所采集的样本均未培养出可培养细菌; 当胚胎发育到耳状幼体以后, 开始投喂饵料, 此后的耳状幼体、樽形幼体体内可分离获得可培养细菌, 但数量级较

低, 为 10^1 CFU/ind.; 至幼体发育到稚参以后, 消化道可培养细菌总数急剧增加, 数量级为 $10^5\sim 10^8$ CFU/g, 并在 4 月龄时达到最大数量级(10^8 CFU/g)。整个育苗期用水中可培养细菌数量级较低, 且维持在一个相对稳定的水平, 为 10^2 CFU/ml; 鉴于不同发育期饵料种类不同, 各发育时期投喂的饵料中可培养细菌数量差异显著, 数量级为 $10^3\sim 10^7$ CFU/ml。

以 TCBS 琼脂平板培养获得的菌落数对各样本可培养弧菌的定量分析结果见表 2。从表 2 可以看出, 在幼体开口前的各发育时期(性腺、未受精卵、

表 1 不同发育时期刺参幼体体内及养殖系统中可培养细菌总数(对数值)
Tab.1 The total number (Logarithm) of culturable bacteria in gastrointestinal tract of sea cucumber larva at different developmental stages and its aquaculture system

发育时期 Developmental stage	幼体 Larva (10^N CFU/ind or CFU/g)	培育用水 Water (10^N CFU/ml)	饵料 Feeds (10^N CFU/ml)
性腺 Sexual gland	---(雄 Male) ---(雌 Female)	---	---
卵 Egg	---	---	---
受精卵 Zygote	---	2.46 ± 0.15^b	---
原肠胚 Gastrula	---	2.47 ± 0.06^b	---
耳状幼体 Auricularia	1.29 ± 0.11^c	2.48 ± 0.03^b	3.88 ± 0.20^d
樽形幼体 Doliolaria	0.91 ± 0.25^c	2.09 ± 0.08^c	3.58 ± 0.02^c
1 月龄稚参 One-month-old juvenile	7.03 ± 0.40^b	2.91 ± 0.10^a	6.32 ± 0.06^b
2 月龄稚参 Two-month-old juvenile	6.27 ± 0.06^c	2.86 ± 0.10^a	7.31 ± 0.01^a
4 月龄稚参 Four-month-old juvenile	8.10 ± 0.19^a	2.69 ± 0.07^{ab}	5.06 ± 0.08^c
6 月龄稚参 Six-month-old juvenile	5.64 ± 0.17^d	1.36 ± 0.39^d	4.94 ± 0.05^c

“—”为无此项样品; “---”为未培养出菌落; “N”为表中的数值; 同一列上标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$), 下同

“—” Sample absence; “---” No bacterial colony was cultured; “N” represents the value in the table; Different lowercase superscripts mean significant difference ($P<0.05$), the same as below

表 2 不同发育时期刺参幼体体内及养殖系统中可培养弧菌数量(对数值)及占比
Tab.2 The number (Logarithm) and proportion of culturable *Vibrios* in gastrointestinal tract of sea cucumber larva at different developmental stages and its aquaculture system

发育时期 Developmental stage	幼体 Larva (10^N CFU/ind or CFU/g)	培育用水 Water (10^N CFU/ml)	饵料 Feeds (10^N CFU/ml)
性腺 Sexual gland	---(雄 Male) ---(雌 Female)	---	---
卵 Egg	---	---	---
受精卵 Zygote	---	$2.07\pm 0.02^{ab}(37.3\%)$	---
原肠胚 Gastrula	---	---	---
耳状幼体 Auricularia	---	---	---
樽形幼体 Doliolaria	---	$2.06\pm 0.19^{ab}(97.3\%)$	---
1 月龄稚参 One-month-old juvenile	$6.48\pm 0.78^a(57.2\%)$	$2.30\pm 0.14^a(24.6\%)$	$6.18\pm 0.15(75.7\%)$
2 月龄稚参 Two-month-old juvenile	$6.16\pm 0.08^a(77.3\%)$	$2.00\pm 0.13^b(14.0\%)$	$7.01\pm 0.60(83.7\%)$
4 月龄稚参 Four-month-old juvenile	$7.07\pm 0.25^a(10.6\%)$	$2.09\pm 0.12^{ab}(25.9\%)$	---
6 月龄稚参 Six-month-old juvenile	$4.01\pm 0.43^b(2.2\%)$	---	---

受精卵、原肠胚)及投饵后的耳状幼体、樽形幼体时期均未获得可培养弧菌;至幼体发育到稚参以后,消化道可培养弧菌急剧增加,数量级为 $10^4\sim 10^7$ CFU/g,并在4月龄时达到最高。在养殖系统中,虽然,整个育苗期用水中可培养弧菌数量级变化不明显,且维持在一个相对稳定的水平(10^2 CFU/ml),但可培养弧菌占可培养细菌的比例波动较大,幅度为14.0%~97.3%;各发育时期所投喂的饵料中,可培养弧菌数量差异显著,除了1~2月龄稚参时期中可培养弧菌数量级达到 $10^6\sim 10^7$ CFU/ml,且可培养弧菌占可培养细菌的比例分别为75.7%和83.7%外,其他饵料中均未检测到弧菌。

2.2 不同发育期消化道及养殖系统(培育用水、饵料)可培养优势菌的分离及鉴定结果

根据各时期不同样品中 TSA 上所培养细菌的菌落形态,共获得优势细菌 65 株,其中,幼体、培育用水、饵料中的菌株数量分别为 27 株、18 株和 20 株。将获得的 16S rDNA 测序结果与 EzBioCloud 数据库中标准菌株的 16S rDNA 序列进行同源性比对分析的鉴定结果见表 3 和表 4。从表 3 和表 4 可以看出,65 株细菌共鉴定到 3 门 4 纲 14 属 43 种,分属于放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形杆菌门(Proteobacteria) 3 个门,放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria) 4 个纲,优势属包括弧菌属(*Vibrio*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等,其中,弧菌属种类最多,为 18 种。

从不同发育期刺参消化道内优势菌鉴定结果可以看出,耳状幼体期,幼体体内分离出 4 株优势菌,优势度最高的为海水嗜冷杆菌(*Psychrobacter aquimaris*),优势度占 60.0%;樽形幼体时期,幼体体内菌种多样性很高(10 株,6 个属),各菌株的优势度为 2.2%~36.2%,优势度最高的属为盐单胞菌属(*Holomonas*),占 47.2%;发育到稚参以后,1、2、4 和 6 月龄时期,稚参消化道中的优势菌株分别为 5 株、5 株、2 株和 1 株,但鉴定后集中到弧菌属、芽孢杆菌属和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*),6 月龄时,稚参消化道中的优势属仅有芽孢杆菌属。由此可以看出,随着幼体的发育,幼体时期体内的菌群多样性较高,而发育到稚参以后,其肠道菌群相对稳定。

从各发育期培育用水分离的优势菌可以看出,尽管培育用水中可培养细菌总数较低,但水样中细菌的种类却很丰富,在耳状幼体、樽形幼体、1、2、4 和 6 月龄稚参培育期水样中的优势菌株分别为 2 株、5 株、3 株、4 株、1 株和 3 株。根据鉴定结果可以看出,

水样中弧菌种类所占优势度较高,为 22.3%~52.1%。

从同期培育所用饵料中分离得到的优势菌鉴定结果可以看出,由于不同发育期所使用的饵料种类不同,各时期细菌种类和丰度差异显著,在耳状幼体时期所用饵料共分离出 5 株优势菌,其中,大西洋弧菌(*Vibrio atlanticus*)丰度最高,达到 76.0%;樽形幼体时期所用饵料仅分离出 1 株优势菌,为特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*),优势度达到 85.4%;幼体发育到底栖生活的稚参以后,其优势细菌种类较为丰富,在 1、2、4 和 6 月龄稚参培育期,饵料中的优势菌种类分别为 4 株、6 株、1 株和 3 株,饵料中以芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和弧菌为主要种类,优势度分别为 8.0%~100.0%和 6.8%~80.0%。

2.3 不同发育期幼体体内菌群与环境菌群相关性分析

对比不同发育期幼体、培育用水和饵料的优势细菌组成可以看出,从时间轴来看,盐单胞菌(*Halomonas alkaliarctica*)成为耳状幼体、樽形幼体共有优势菌;2~4 月龄时,强壮弧菌(*Vibrio fortis*)是其消化道的共有优势菌;从养殖系统这一空间轴来看,在耳状幼体和樽形幼体时期,幼体、水和饵料中无共有优势菌;1 月龄时,饵料、水中的大西洋弧菌、需纳弧菌(*Vibrio natriegens*)在幼体中完成了较好的定植,其次是饵料中的特基拉芽孢杆菌;2 月龄时,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是消化道和饵料中的共同优势菌;6 月龄时,来自饵料、水中的暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)在消化道内完成了较好的定植。相应结果显示,在幼体发育到底栖生活以后,其体内的菌株与饵料中的优势菌株具有较好的相关性。

鉴于 16S rDNA 鉴定结果在属水平上的准确性高,从属水平上分析相应菌株的分类地位及在整个培育时期养殖系统的分布结果见表 4。从表 4 可以看出,检出率较高的属为弧菌属(41.9%)、芽孢杆菌属(9.3%)、假交替单胞菌属(9.3%)、盐单胞菌属(9.3%)。对比幼体、培育用水和饵料中各细菌属水平上的分布可以看出,芽孢杆菌属、假交替单胞菌属和弧菌属是在 3 个系统中同时检出的菌属,嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)是在幼体及水中共检出的菌。进一步对比,共检出菌在系统中的分布可以看出,在幼体发育早期(樽形时期)幼体与水中的共有菌较多,而发育到底栖生活(1、2、4 和 6 月龄)时期,幼体中与饵料中的共有菌较多。

在属的水平进行各样本相关性的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)结果见图 1。从图 1 可以看出,第 1 主成分 PC1 对样品差异的贡献值为 69.6%,第 2 主成分 PC2 对样品差异的贡献值

表3 不同发育时期刺参幼体体内及养殖系统可培养优势菌鉴定结果
 Tab.3 The results of identification of culturable dominant bacteria in gastrointestinal tract of sea cucumber at different developmental stages and its aquaculture system

发育时期 Developmental stage	幼体消化道 Gastrointestinal tract				培育用水 Water				饵料 Feeds						
	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database			
耳状幼体 Auricularia	YB-EZ-A	60.0	海水嗜冷杆菌 <i>P. aquimaris</i>	W-EZ-A	16.7	大西洋假交替单胞菌 <i>P. atlantica</i>	EL-EZ-A	76.0	大西洋弧菌 <i>V. atlanticus</i>	YB-EZ-B	10.0	太平洋莱茵海默氏菌 <i>Rheinheimera pacifica</i>	EL-EZ-B	4.0	塔斯马尼亚弧菌 <i>V. tasmaniensis</i>
	YB-EZ-C	20.0	海床游动微菌 <i>Planomicrobium okeanokoites</i>	W-EZ-B	50.0	<i>V. atlanticus</i>	EL-EZ-C	4.0	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	YB-EZ-D	10.0	<i>H. alkaliantarctica</i>	EL-EZ-D	8.0	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>
	YB-ZX-A	16.2	巴氏葡萄球菌 <i>S. pasteuri</i>	W-ZX-A	35.5	大西洋弧菌 <i>V. atlanticus</i>	EL-EZ-E	8.0	<i>P. distincta</i>	YB-ZX-B	6.7	海雪嗜冷杆菌 <i>P. nivimaris</i>	EL-ZX-A	85.4	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>
	YB-ZX-C	36.2	<i>H. alkaliantarctica</i>	W-ZX-B	2.6	岸滨盐单胞菌 <i>Cobetia litoralis</i>	EL-EZ-F	4.4	土黄盐单胞菌 <i>H. lutescens</i>	YB-ZX-D	6.7	马氏副球菌 <i>Paracoccus marcusii</i>			
樽形幼体 Doliolaria	YB-ZX-E	2.2	沃氏葡萄球菌 <i>S. warner</i>	W-ZX-C	4.9	粪嗜冷杆菌 <i>P. faecalis</i>				YB-ZX-F	4.4	嗜盐假单胞菌 <i>H. sulfidaeris</i>			
	YB-ZX-G	2.2	泰坦尼克单胞菌 <i>H. titanicae</i>	W-ZX-D	41.9	氧化微杆菌 <i>Microbacterium oxydans</i>				YB-ZX-G	2.2	泰坦尼克单胞菌 <i>H. titanicae</i>			
	YB-ZX-H	4.4	嗜盐假单胞菌 <i>H. sulfidaeris</i>	W-ZX-E	2.4	塔斯马尼亚弧菌 <i>V. tasmaniensis</i>				YB-ZX-H	4.4	嗜盐假单胞菌 <i>H. sulfidaeris</i>			
	YB-ZX-I	4.4	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>							YB-ZX-I	4.4	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>			
	YB-ZX-J	4.8	河豚毒素假交替单胞菌 <i>P. tetraodonis</i>							YB-ZX-J	4.8	河豚毒素假交替单胞菌 <i>P. tetraodonis</i>			

续表 3

发育时期 Developmental stage	幼体消化道 Gastrointestinal tract				培育用水 Water				饵料 Feeds			
	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database	菌株编号 Strain number	优势度 Dominance (%)	EzBioCloud 比对 同源性最高标准株 Closest standard strain in EzBioCloud database
1 月龄稚参 One-month-old juvenile	YB-ZS5-A	8.2	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	W-ZS5-A	26.8	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	EL-ZS5-A	93.2	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>			
	YB-ZS5-B	11.9	大西洋弧菌 <i>V. atlanticus</i>	W-ZS5-B	17.1	大西洋弧菌 <i>V. atlanticus</i>	EL-ZS5-B	0.4	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>			
	YB-ZS5-C	18.7	灿烂弧菌 <i>V. splendendus</i>	W-ZS5-C	8.2	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	EL-ZS5-C	1.6	贻贝弧菌 <i>V. mytili</i>			
	YB-ZS5-D	9.0	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>				EL-ZS5-D	4.8	大西洋弧菌 <i>V. atlanticus</i>			
	YB-ZS5-E	9.9	波氏弧菌 <i>V. pomeroyi</i>									
	YB-ZS6-A	15.1	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	W-ZS6-A	21.7	巴西弧菌 <i>V. brasiliensis</i>	EL-ZS6-A	22.4	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>			
2 月龄稚参 Two-month-old juvenile	YB-ZS6-B	3.8	叶氏假交替单胞菌 <i>P. elyakovii</i>	W-ZS6-B	31.3	海交替单胞菌 <i>Alteromonas marina</i>	EL-ZS6-B	6.5	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>			
	YB-ZS6-C	23.8	强壮弧菌 <i>V. fortis</i>	W-ZS6-C	14.4	日本弧菌 <i>V. japonicus</i>	EL-ZS6-C	21.0	牡蛎弧菌 <i>V. crassostreae</i>			
	YB-ZS6-D	7.1	加拉太弧菌 <i>V. galathea</i>	W-ZS6-D	7.2	塔氏弧菌 <i>V. tubiashii</i>	EL-ZS6-D	13.1	轮虫弧菌 <i>V. ibrio rotiferianus</i>			
	YB-ZS6-E	7.3	科萨弧菌 <i>V. ibrio crosai</i>				EL-ZS6-E	6.3	洛森氏发光杆菌 <i>Photobacterium rosenbergii</i>			
							EL-ZS6-F	4.8	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>			
							EL-ZS8-A	38.6	肝弧菌 <i>V. hepatarius</i>			
4 月龄稚参 Four-month-old juvenile	YB-ZS8-A	59.1	日本弧菌 <i>V. japonicus</i>	W-ZS8-A	44.8	塔氏弧菌 <i>V. tubiashii</i>	EL-ZS10-A	96.4	暹罗芽孢杆菌 <i>B. stamensis</i>			
	YB-ZS8-B	20.0	强壮弧菌 <i>V. fortis</i>	W-ZS10-A	72.2	暹罗芽孢杆菌 <i>B. stamensis</i>	EL-ZS10-B	1.2	韩国芽孢杆菌 <i>B. koreensis</i>			
	YB-ZS10-A	97.1	暹罗芽孢杆菌 <i>B. stamensis</i>	W-ZS10-B	16.7	巨蛎弧菌 <i>V. gigantis</i>	EL-ZS10-C	2.3	阿氏芽孢杆菌 <i>B. aryabhatai</i>			
6 月龄稚参 Six-month-old juvenile				W-ZS10-C	5.6	高卢弧菌 <i>V. gallicus</i>						

表4 不同发育时期刺参幼体体内及养殖环境可培养优势菌系统分类
Tab.4 Classification of culturable dominant bacteria in gastrointestinal tract of sea cucumber at different developmental stages and its aquaculture system

门 Phylum	纲(占比) Class (Proportion)	属 Genus	菌株种类 (占比) Speices number of strains (Proportion)	来源(时期及菌株数) Source (Developmental stage and number of strains)
放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria (2.3%)	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	1(2.3%)	水(樽形 1)
厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli (16.3%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	4(9.3%)	幼体(樽形 1,1月龄 1,6月龄 1) 水(6月龄 1) 饵料(耳状 1,樽形 1,1月龄 1,2月龄 1,6月龄 3)
		葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	2(4.7%)	幼体(樽形 2)
		动性微菌属 <i>Planomicrobium</i>	1(2.3%)	幼体(耳状 1)
变形菌门 Proteobacteria	α -变形杆菌纲 Alpha-proteobacteria (2.3%)	副球菌属 <i>Paracoccus</i>	1(2.3%)	幼体(樽形 1)
	γ -变形菌纲 Gamma-proteobacteria (79.1%)	单胞菌属 <i>Alteromonas</i>	1(2.3%)	水(2月龄 1)
		科贝特氏菌属 <i>Cobetia</i>	1(2.3%)	水(樽形 1)
		盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	4(9.3%)	幼体(耳状 1,樽形 4)
		发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	1(2.3%)	饵料(2月龄 1)
		假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	4(9.3%)	幼体(樽形 1,2月龄 1) 水(耳状 1) 饵料(耳状 1,2月龄 1)
		假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	1(2.3%)	饵料(耳状 1)
		嗜冷杆菌属 <i>Psychrobacter</i>	3(7.0%)	幼体(耳状 1,樽形 1) 水(樽形 1)
		莱茵海默氏菌属 <i>Rheinheimera</i>	1(2.3%)	幼体(耳状 1)
		弧菌属 <i>Vibrio</i>	18(41.9%)	幼体(1月龄 4,2月龄 4,4月龄 2) 水(耳状 1,樽形 2,1月龄 3,2月龄 3,4月龄 1,6月龄 2) 饵料(耳状 2,1月龄 3,2月龄 4,4月龄 1)

为 18%。根据不同发育期各样本所处的位置可以看出,第 2 主成分对浮游期(耳状幼体和樽形幼体)和底栖生活期(1、2、4 月龄)差异贡献较大,而发育到 6 月龄时,第 1 主成分则对样品差异贡献显著。根据相同时期幼体与水与饵料所处的位置可以看出,浮游幼体时期,幼体菌群与培育用水菌群和饵料菌群相距较远,表明二者对幼体菌群影响均不大;随着幼体的发育,当幼体发育到 1 月龄后,幼体菌群与培育用水菌群相距小于其与饵料菌群的距离,表明水对幼体菌群

影响较大,当发育到 6 月龄时,其幼体体内肠道菌群与饵料距离最近,表明受饵料影响较大。

3 讨论

肠道菌群作为肠道的重要组成部分,与宿主以及所处的环境存在相互依赖和相互制约的关系,不仅影响着食物中营养物质的消化、吸收,还在宿主免疫反应中发挥重要作用(Schrijver *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2012)。以刺参早期发育期体内菌群结构为研究对象,

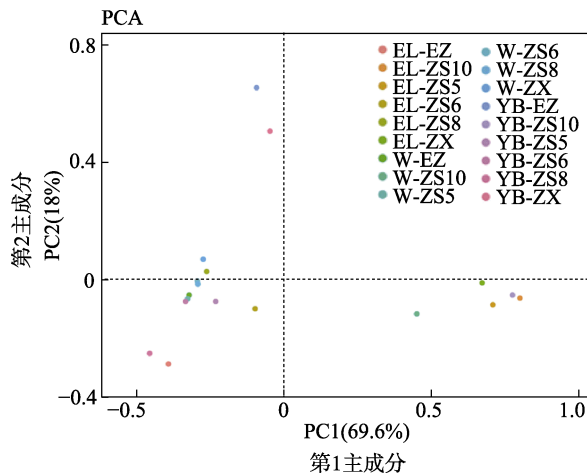


图1 不同发育时期刺参幼体体内菌群与环境菌群差异的主成分分析

Fig.1 PCA of the samples among the gastrointestinal tract of sea cucumber at different developmental stages and its aquaculture system

解析体内菌群结构演替和变化规律以及其与环境菌群的相关性, 将为刺参苗种的健康管理提供理论基础。

本研究通过传统细菌学培养方法结合优势菌鉴定, 对养殖刺参早期发育各时期幼体体内可培养细菌进行了定量分析。在幼体开口摄食前, 体内没有培养出可培养细菌; 开口并摄食后, 从浮游时期发育到底栖生活, 其体内的可培养细菌总数急剧增加, 表明肠道细菌是随着摄食行为的进行而使特定菌株在肠道内逐步定植的过程。通过 TCBS 弧菌选择性培养基对幼体体内弧菌数量进行测定, 表明自刺参发育到营底栖生活后, 弧菌开始检出, 且一直是占据体内菌群的优势菌属。史秀清等(2015)对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征进行分析发现, 消化道中的细菌数量逐渐增加, 且弧菌已成为仔稚鱼后期消化道中的优势菌群。Zhao 等(2012)对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)不同发育阶段幼体消化道菌群的研究发现, 幼体开始摄食后的消化道细菌数量要比未摄食时高, 弧菌属的细菌成为之后3个发育阶段中消化道的优势菌。Verner-Jeffreys 等(2003)研究了3个不同孵化场的大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)仔稚鱼消化道菌群演替时发现, 在仔稚鱼开口摄食后, 消化道菌群的数量呈稳定增长; 随着仔稚鱼的生长, 弧菌属细菌逐渐取代假交替单胞菌属细菌成为消化道中的优势菌种。这些研究均表明, 水产动物肠道菌群的形成是动物摄食饵料后, 对饵料中特定菌株的选择性定植和扩增的过程, 弧菌作为海洋细菌的重要种类, 也在海水养殖动物肠道菌群中占有重要地位。

根据各优势菌株分类鉴定结果可以看出, 早期发育阶段耳状幼体(含4属)、樽形幼体(含6属)的消化道菌群多样性较高, 1~6月龄稚参的消化道菌群趋于单一, 仅含弧菌属和芽孢杆菌属2个属, 推测刺参消化系统在幼体发育完全后, 才对定植的细菌具有较强的选择性, 且其消化道对弧菌属和芽孢杆菌属细菌的选择性更强, 与本研究结果相似。Grisez 等(1997)对金头鲷(*Sparus aurata*)和欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)的研究结果推测, 消化系统在稚鱼和成鱼发育完全后, 才对弧菌属细菌具有选择性。

本研究从分离优势菌的属水平、种水平并利用PCA方法, 分析了刺参早期发育阶段幼体体内菌群与养殖系统中培育用水和饵料菌群的相关性。结果表明, 在幼体发育初期, 其体内菌群与培育用水的相关性较大, 而随着幼体发育的进行, 其体内菌群结构与饵料的相关性逐渐增加。Verner-Jeffreys 等(2003)研究表明, 大西洋庸鲽仔稚鱼开口摄食后, 其消化道内菌群存在明显演替现象, 优势菌属由未开口的卵黄囊阶段时, 假交替单胞菌属变为以灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、溶藻弧菌的弧菌属, 且饵料中仅有一部分细菌能够定植于仔稚鱼的消化道。史秀清等(2015)对大菱鲆仔稚鱼发育期消化道的可培养细菌菌群进行分析发现, 生物饵料中的细菌对仔稚鱼消化道中可培养菌群结构的形成产生的影响相对较大, 而水中的细菌似乎没有对仔稚鱼的消化道菌群产生影响。Sugita 等(2002)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚鱼消化道细菌的种类和数量的研究也发现, 消化道菌群会随投喂不同饵料而变化, 受水体中菌群的影响较小。但也有学者认为, 水中的微生物菌群对水生动物消化道菌群影响显著, Tanasomwang 等(1989)研究牙鲆仔稚鱼时发现, 水中的菌群组成会明显影响仔稚鱼的消化道菌群组成。周金敏等(2010)对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肠道和养殖水体中的微生物菌群进行研究时发现, 黄颡鱼肠道与养殖水体中的优势菌基本相同, 均为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌。本研究表明, 刺参幼体发育过程中, 体内的细菌菌群经历了由培育用水到发育后期与饵料密切相关的过程, 可见养殖环境中水和饵料对体内菌群的建立和演替均起到重要作用。

参 考 文 献

- Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—A review. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1761–1805
- Gao F, Li FH, Tan J, et al. Bacterial community composition in

- the gut content and ambient sediment of sea cucumber *Apostichopus japonicus* revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing. *Public Library of Science*, 2014a, 9(6): 1–10
- Gao F, Tan J, Sun HL, *et al.* Bacterial diversity of gut content in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its habitat surface sediment. *Journal of Ocean University of China*, 2014b, 13(2): 303–310
- Grisez L, Reyniers J, Verdonck L, *et al.* Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 1997, 155(1–4): 387–399
- Guan XY, Zhou ZC, Jiang B, *et al.* Environmental bacterial diversity in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture under different salinities based on DGGE fingerprint. *Fisheries Science*, 2011, 30(5): 276–280 [关晓燕, 周遵春, 姜冰, 等. DGGE 分析不同盐度仿刺参养殖环境中菌群多样性. *水产科学*, 2011, 30(5): 276–280]
- Li B, Liao MJ, Rong XJ, *et al.* Correlation analysis of flora in the habitat environment and in the gut contents of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 127–132 [李彬, 廖梅杰, 荣小军, 等. 池塘养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠含物、附着基和底泥中的菌群结构及其相关性. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 127–132]
- Li B, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Annual changes of total heterotrophic bacteria and *Vibriosis* in the intestine of *Apostichopus japonicus* and its culture pond. *Marine Sciences*, 2012, 36(4): 63–67 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. *海洋科学*, 2012, 36(4): 63–67]
- Li JG, Xu YP, Li XY, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different culture seasons. *Fisheries Science*, 2014, 33(9): 562–568 [李建光, 徐永平, 李晓宇, 等. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. *水产科学*, 2014, 33(9): 562–568]
- Pang HJ, Liao MJ, Li B, *et al.* 2017. Etiology and treatment of enteritis disease in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus*. *Progress in fishery Sciences*, 2017, 38(3): 188–197 [逢慧娟, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗期“肠炎病”及其治疗方法. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 188–197]
- Schrijver RD, Ollevier F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 2000, 186(1–2): 107–116
- Shi XQ, Zhang Z, Wang YG, *et al.* The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 73–82 [史秀清, 张正, 王印庚, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 73–82]
- Sugita H, Okano R, Suzuki Y, *et al.* Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*, 2002, 68(5): 1004–1011
- Tanasomwang V, Muroga K. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 55(8): 1371–1377
- Verner-Jeffreys DW, Shields RJ, Bricknell IR, *et al.* Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture*, 2003, 219(1–4): 21–42
- Wang JJ, Li D, Song J, *et al.* Structural analysis of seawater bacterial community from culture pond of *Apostichopus japonicus* at different periods. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015a, 17(2): 134–140 [王姣姣, 李丹, 宋坚, 等. 不同时期刺参养殖池塘海水菌群结构分析. *中国农业科技导报*, 2015a, 17(2): 134–140]
- Wang JJ, Li D, Wang YN, *et al.* Bacterial flora in gut contents of sea cucumber *Apostichopus japonicus* at different culture periods. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015b, 30(4): 345–350 [王姣姣, 李丹, 王轶南, 等. 不同养殖时期刺参肠道内菌群结构的分析. *大连海洋大学学报*, 2015b, 30(4): 345–350]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2013, 1–206 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2013, 1–206]
- Wang YG, Guo WL, Rong XJ, *et al.* Isolation and identification of a pathogenic bacterium associated with off-plate syndrome from *Apostichopus japonicus* cultured in Liaoning Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 81–86 [王印庚, 郭伟丽, 荣小军, 等. 养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 81–86]
- Zhang WZ, Wang YG, Liao MJ, *et al.* Isolation and identification of the pathogenic bacteria of skin ulcerative syndrome (SUS) from *Apostichopus japonicus* juveniles in summer and study on its pathogenic threshold. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 81–89 [张文泽, 王印庚, 廖梅杰, 等. 夏季保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 81–89]
- Zhang XC, Nakahara T, Murase S, *et al.* Physiological characterization of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2013, 59(1): 1–10
- Zhao J, Shi B, Jiang QR, *et al.* Changes in gut-associated flora and bacterial digestive enzymes during the development

stages of abalone (*Haliotis diversicolor*). *Aquaculture*, 2012, 338–341(1): 147–153
 Zhou JM, Wu ZX, Zeng LB, *et al.* Microflora in digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water.

Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(5): 613–617 [周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 613–617]

(编辑 陈严)

The Characteristics of Culturable Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Cultured Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) During the Early Developmental Stage and its Relationship with Environmental Flora

LI Jing^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3①}, LI Bin^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3},
 RONG Xiaojun^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, LIU Anran^{1,2}

(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. Qingdao Ruizi Seafood Development Co., Ltd, Qingdao 266400)

Abstract Conventional bacteriological culture techniques and molecular identification methods were used to reveal the composition and structure of the intestinal microflora in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) larvae at different developmental stages and the microflora in the aquaculture environment (feeds and aquaculture water), and then the correlations between these were analyzed. The results of bacterial culture from sea cucumber larvae showed that there were no culturable bacteria during the stages preceding the development of the mouth (gonads, eggs, zygotes, and gastrula), but culturable bacteria did occur after larvae developed a mouth and began feeding. From the auricularia to doliolaria larval stages, the number of culturable bacteria in the gastrointestinal (GI) tract was low. After the larvae reached one month of age, the abundance of culturable bacteria in the GI tract increased significantly, and the highest level (10^8 CFU/g) was reached in four-month-old juveniles. The proportion of culturable bacteria that were made up of culturable *Vibrio* species ranged from 2.2% to 77.3% across the different developmental stages. The results of bacterial culture from the environment showed that there was no significant change in the bacterial content in the aquaculture water over time. However, as the ingredients in the feed used for different early developmental stages of sea cucumber changed, there were significant differences in the bacterial content in these feeds. Sixty-five dominant strains isolated from the aquaculture system were identified by sequencing their 16S rDNA. They were classified into 14 genera and 43 species. Correlation analyses revealed that over the course of the development of the sea cucumber larvae, the bacteria obtained from their feed likely had a great impact on the microbial flora in their GI tracts. This study laid the foundation for the analysis of the formation processes and succession patterns of GI tract microflora in sea cucumber, as well as for the screening and application of probiotics in aquaculture.

Key words *Apostichopus japonicus*; Early development; Culturable bacteria; Characteristics of microflora

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180305002

http://www.yykxjz.cn/

黄梦诗, 杨倩倩, 张艳, 姜晓瑜, 赵俊, 张旭志, 丁东生, 曲克明. 响应面法研究温度、盐度、pH及磷酸盐、硝氮、氨氮对副溶血弧菌生长的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 132-140

Huang MS, Yang QQ, Zhang Y, Jiang XY, Zhao J, Zhang XZ, Ding DS, Qu KM. Study on the effects of temperature, salinity, pH, phosphate, nitrate, and ammonium on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* using response surface methodology. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 132-140

响应面法研究温度、盐度、pH 及磷酸盐、硝氮、氨氮对副溶血弧菌生长的影响*



黄梦诗^{1,2} 杨倩倩^{1,2} 张艳² 姜晓瑜^{1,2}
赵俊² 张旭志^{2,3} 丁东生² 曲克明^{2,3①}

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)在海洋环境中普遍存在,是能够引起人类中毒的重要食源性病原菌之一,研究其生长受环境因子的影响规律对科研和社会生活都具有重要意义。本研究采用响应面法研究温度、盐度、pH、磷酸盐、硝氮和氨氮对VP的生长影响,以探讨、评估这6种理化因子的综合作用结果。首先用Design-Expert软件中的Box Behnken中心组合原则设计三因素三水平响应面实验,再进行响应面分析,以培养基光密度(OD_{600nm})值为生长状态参数,获得该菌的最佳培养参数:温度为34.5℃,盐度为3%,酸碱度pH为8.0。在此基础上,考察NaNO₃、NH₄Cl和Na₃PO₄对VP生长的影响并建立模型。回归方程决定系数R²=0.9217,校正系数R²=0.8211,回归模型F=9.16,P=0.004,表明该模型具有较好的准确性。实验所得实测值与模型演算理论值拟合良好,皆表明磷酸盐、硝氮和氨氮对VP的生长都具有抑制作用。

关键词 副溶血弧菌; 生长; 理化因子; 影响分析; 响应面法

中图分类号 S965.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0132-09

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)嗜盐畏酸,广泛存在于海洋环境及海产品中,可以感染多种动物,甚至危害人类健康(如食用受其污染的海产品可能会导致急性肠胃炎)(Bakeraustin *et al*, 2010; Bonninjusserand *et al*, 2017; Ham *et al*, 2012; Liu *et al*, 2017; 黄梦诗等, 2017)。无论是从科学研究角度还是

从保障食品安全等生产与生活需求方面来讲,对影响该病原菌生长的环境因子作用机理进行研究都具有重要现实意义(Young *et al*, 2015)。截至目前,相关研究已经获得了初步的成果,如Johnson等(2010、2012)从生态学角度研究了美国近岸海域中VP与环境温度和盐度的关系,发现无论是水体、生物体还是

* 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2019ZD0101)、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(20603022018020)和山东省重点研发计划项目(2016GSF120008)共同资助[This work was supported by Central Public Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2019ZD0101), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022018020) and Key R&D Program of Shandong Province (2016GSF120008)]. 黄梦诗, E-mail: m15800715082@163.com

① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-05, 收修改稿日期: 2018-04-16

沉积物中,其总量与这2个参数都呈正相关;Young等(2015)研究了海产品和渔业水域中VP受温度和盐度的影响,结果显示,在一定范围内温度的升高利于该病原菌的生长,而盐度的影响则不明确;然而,Johnson等(2010)的研究表明,水体中盐度和VP总量呈负相关;孙博悻等(2015)发现,pH、电导率、盐度较其他海域偏低的长江入海口水样中VP总量较多,但多元线性回归方程分析却表明盐度和温度与该菌含量呈正相关;Kaper等(1979)和Rehnstam-Holm等(2014)的研究皆表明,水体中VP总量与pH呈负相关。此外,由于海水中营养盐等其他理化因子也对该菌的生长、分布具有重要的影响,诸如氨氮(Blackwell *et al.*, 2008)、浊度(Johnson *et al.*, 2012)、生物需氧量(Johnson *et al.*, 2010)等也得到了较多的研究(Johnson, 2015)。上述研究多基于单因子效应分析,数据间关联性较差,不能充分反映交互作用,很可能是结论不能统一的主要原因。因此,具有较高契合度的综合性分析预评估方法有待建立。

响应面方法(Response surface methodology, RSM)是数学和统计方法结合的产物,常被应用于寻找多参数系统中的最佳条件(Karami *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2012; 韩建荣等, 2017; 蒋彪等, 2017; 陈晓彤等, 2017),该方法不仅可以同时对影响生物量的各因素和各因素的相互作用进行比较和优化,还可以快速确定出各因素的最优水平,减少实验次数,节约时间,目前已被广泛应用于微生物培养基优化中(韩建荣等, 2017; 蒋彪等, 2017)。本研究采用RSM研究温度、盐度、pH、磷酸盐、硝氮和氨氮对VP的生长影响,获得具有较好准确性的响应模型,并探讨、评估了这6种理化因子的综合作用结果。

1 材料与方法

1.1 生物、化学材料与主要设备

实验所用副溶血弧菌(ACTT17802)为本实验室保存。胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)为青岛高科海博生物技术公司产品。 NaNO_3 、 NH_4Cl 、 Na_3PO_4 、 NaCl 和其他化学试剂皆为分析纯,其中, NaNO_3 和 NH_4Cl 为上海强顺化工有限公司产品,余者皆购自于国药集团化学试剂有限公司。细菌培养采用上海知楚仪器公司生产的ZQZY-BG型振荡培养箱。细菌培养液光密度($\text{OD}_{600\text{nm}}$)值采用TU-1901/TU-1901型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)测定。溶液酸碱度采用上海精科仪器有限公司生产的PHS-3C型pH计完成。接种实验在10000级洁净无菌室内完成。

1.2 实验方法

所有培养基都选用TSB。将本实验室于 -80°C 冰箱中保藏的菌种接种到斜面培养基上, 30°C 培养24h以活化菌种。将活化好的菌种接种到TSB液体培养基中,同时做3组平行,置于恒温培养箱中 30°C 培养12h,每隔1h取样1次, 600nm 下测定培养液吸光度($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值)。

温度、盐度和pH对VP生长的影响实验参照刘代新等(2008),简言之:以向TSB培养液中添加NaCl的百分含量作为盐度,配制1%~10%共10个梯度;温度实验为 10°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 37°C 、 43°C 共7个梯度;采用1mol/L的HCl和NaOH调节TSB培养液酸碱度,配制pH5.00、6.00、7.00、7.50、8.00、8.50、9.00和10.00共8个梯度。向上述各液体培养基中各接菌1环,分别培养并测定OD值。分析结果,确定适合VP生长的最佳单因素条件范围,并依据RSM中的Box Behnken中心组合原则,采用Design-Expert软件进行分析。然后选用分析所得的最佳生长复合参数培养VP,并测定培养18h后培养液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值($n=3$)以证实该方法的可靠性。

磷酸盐、硝酸盐和氨盐对VP的生长影响实验如下:在上述优化参数基础上,分别以 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 作为磷酸盐、硝氮和氨氮的代表种类,分别配制含有0.2%~1%共9个梯度的TSB培养液。然后按照上述方法培养8h后测定VP的生长情况。为了保证合适的盐度,如非特殊说明,实验所用的培养液含3%NaCl。

1.3 数据处理

RSM是通过一系列确定性实验,用多项式函数来近似隐式极限状态函数。通过合理地选取试验点和迭代策略,来保证多项式函数能够在失效概率上收敛于真实的隐式极限状态函数的失效概率。实验采用Design expert 8.0软件进行数据处理,对温度、盐度等环境理化因子与VP生长响应值进行二次方程回归拟合,建立数学模型,用决定系数和回归方程的校正系数来判断数学模型的拟合程度,多变量方差分析决定方程的意义(Karami *et al.*, 2016)。优化得到的实验条件重复3次,以验证模型的准确性。

2 结果与分析

2.1 温度、盐度和pH对VP生长的单因子影响

如图1A所示,环境温度为 10°C 时,VP基本上

没有增殖；在 20℃~35℃ 范围内，随着温度的增加，8 h 后 VP 培养液的 OD 值持续增加，最高值可达约 1.5；而超过 35℃ 时，OD 值则明显下降，说明 35℃ 左右的环境温度最有利于 VP 的生长。由图 1B 可见，在 1%~3% 范围内，随着盐度的增加，8 h 后 VP 培养液的 OD 值持续增加，最高值可达 1.8；盐度高于 3%

情况下，8 h 后 VP 培养液的 OD 值随之增加而降低；盐度为 10% 时，VP 则几乎不能生长。同样，由图 1C 可知，在 pH 5.0~8.0 范围内，其值的增加有利于 VP 的生长，而超过 pH 8.0 后，酸碱度值与 OD 值呈负相关。这些结果和前人的报道(Beuchat *et al*, 1973; 刘代新等, 2008)吻合良好。

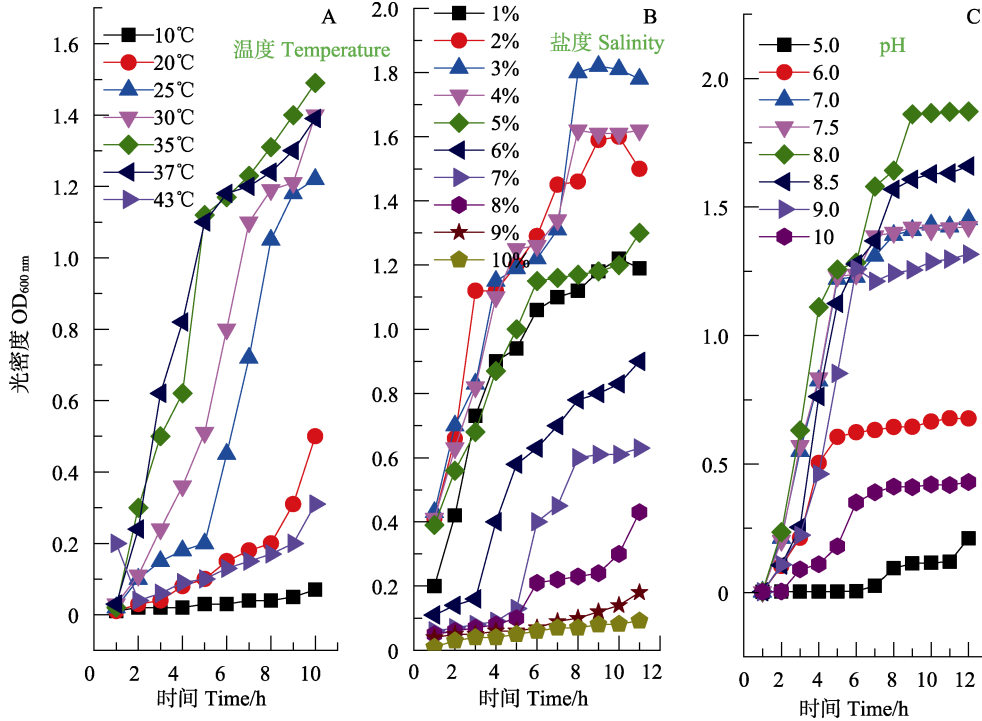


图1 温度(A)、盐度(B)和 pH(C)对 VP 生长的影响

Fig.1 Effects of the temperature (A), salinity (B) and pH (C) on the growth of VP

2.2 温度、盐度和 pH 对 VP 生长交互作用的 RSM 分析方案与结果

根据单因子影响结果，我们选择合适的参数范围进行三因素三水平 RSM 设计与实验，其方案与结果见表 1。利用 Design expert 8.0 统计软件对实验数据进行多元回归拟合，得到 VP 培养 8 h 后的 OD_{600 nm} 值与 x_1 (温度)、 x_2 (盐度)、 x_3 (pH)之间的二元多项回归方程为：

$$OD_{600} = -33.01 + 6.88x_2 + 0.32x_3 + 1.40x_1 - 0.011xx_2 - 0.07x_1x_2 + 6.42E - 0.03xx_1 - 0.40x_2^2 - 3.61E - 003x^2 - 0.16x_1^2$$

对该模型进行方差分析见表 2。表 2 结果显示，基于 OD 值所建立的回归模型是显著的($P < 0.01$)，但是失拟检测结果也十分显著($P = 0.0014 < 0.01$)，所以这个方程由于失拟检测很小，表明拟合方程可能会无效。但是实验中的纯误差均方较小($MS = 0.005$)，决定系数 $R^2 = 0.9649$ ，校正系数 $R = 0.9198$ ，所以综合考虑所有因素在内，拟合方程满足有效要求。

表 3 为回归模型系数显著性检验结果。由表 3 可以看出，pH 的一次效应对 VP 的生长影响达到显著水平($P < 0.05$)，但温度和盐度的一次效应对其生长影响不显著($P > 0.05$)；温度和盐度的二次效应对 VP 的生长影响达到显著水平($P < 0.01$)；但温度、盐度和 pH 三者之间的交互作用对特定生长率的影响都不显著($P > 0.05$)。

利用 Design-Expert 软件对表 1 的数据进行二次多元回归拟合，所得到的二次回归方程的响应面及其等高线见图 2。等高线的形状反映交互效应的强弱大小，圆形表示 2 个因素交互作用不显著，椭圆形表示 2 个因素交互作用显著(Karami *et al*, 2016; 刘代新等, 2008)。由图 2 可见，温度和盐度对 OD 值的影响都是随着数值的增大先升高后降低，所以可以找到一个极值点；等高线图接近椭圆形，表明温度、盐度交互作用对 VP 的生长影响显著。利用 Design-Expert 软件对代表培养液中菌体浓度的 OD 值的二次多项式

数学模型解逆矩阵, 得知 pH 为 8.00 时, 温度和盐度的最优实验条件分别为: 34.5°C 和 3%。

表 1 温度、盐度、pH 响应面分析方案与实验结果
Tab.1 Experimental results and RSM scheme of temperature, salinity and pH

序号 No	pH	温度 Temperature (°C)	盐度 Salinity	OD _{600 nm}
1	8.00	33.50	3.00	1.50
2	7.50	33.50	2.00	1.22
3	8.00	33.50	3.00	1.50
4	8.00	33.50	3.00	1.50
5	8.50	33.00	3.00	1.20
6	8.00	33.50	3.00	1.51
7	8.00	33.50	3.00	1.52
8	8.00	37.00	4.00	1.40
9	7.50	37.00	3.00	1.56
10	7.50	33.50	4.00	1.40
11	8.50	33.50	4.00	1.18
12	8.00	30.00	2.00	1.23
13	8.50	33.50	2.00	1.14
14	8.00	30.00	4.00	1.25
15	7.50	30.00	3.00	1.45
16	8.00	37.00	2.00	1.29
17	8.50	37.00	3.00	1.23

表 2 温度、盐度和 pH 对 VP 生长情况的回归模型方差分析
Tab.2 Analysis of variance for effects of temperature, salinity and pH on the growth of VP

项目 Item	平方和 Sum of square	df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.320	9	0.036	21.4	0.003
残差 Residual	0.012	7	1.678		
失拟 Lack of fit	0.011	3	3.808	47.6	0.001
纯误差 Pure error	3.200	4	0.005		
总和 Total	0.330	16			

注: 决定系数 $R^2=0.9649$, 校正系数 $R^2=0.9198$
Note: $R^2=0.9649$, Adj. $R^2=0.9198$

2.3 磷酸盐、硝氮和氨氮对 VP 生长的单因子影响

选用最优的温度、盐度和 pH 参数, 实验继续探讨了磷酸盐、硝酸盐和氨盐对 VP 生长的单因子影响。如图 3A 所示, 当浓度超过 0.2% 后, 培养液中 Na_3PO_4 与 OD 值呈明显的负相关, 当其值 $\geq 0.6\%$ 时几乎彻底抑制了 VP 的生长。图 3B 显示在加入 0.2%~0.4% NaNO_3

表 3 温度、盐度和 pH 回归方程系数显著性检测
Tab.3 The significance test for coefficients of established regression equation for temperature, salinity and pH

项目 Item	系数估值 Coefficient estimate	标准 Standard	95%CI 低 95%CI low	95%CI 高 95%CI high	P 值 P value
Intercept	1.510	0.018	1.460	1.550	
pH	-0.110	0.014	-0.140	-0.076	0.0001
T 温度	0.044	0.014	9.505	0.078	0.0094
S 盐度	0.044	0.014	9.505	0.078	0.0194
pH×T	-0.020	0.020	-0.068	0.028	0.3613
pH×S	-0.035	0.020	-0.083	0.013	0.1312
T×S	0.022	0.020	-0.026	0.071	0.3083
pH ²	-0.100	0.020	-0.150	-0.055	0.0014
T ²	-0.044	0.020	-0.091	2.953	0.0022
S ²	-0.170	0.020	-0.220	-0.120	<0.0001

时, OD 值随培养时间的增加快速增大(12 h 范围内), 但是加入浓度在 0.6%~1% 范围内时, OD 值增长则明显减慢, 因而呈明显的负相关。由图 3C 可知, 类似于 NaNO_3 对 VP 生长的影响, 在 0.2%~1% 范围内, 培养液中 NH_4Cl 浓度的增加与 OD 值增速也呈明显的负相关, 虽然其值为 1% 时还不至于彻底抑制 VP 的生长。比较而言, 同浓度的 Na_3PO_4 抑制作用明显强于硝酸盐和氨盐; NaNO_3 和 NH_4Cl 的抑制作用则没有明显差别。

2.4 磷酸盐、硝氮和氨氮对 VP 生长交互作用的 RSM 分析方案与结果

根据单因子影响结果, 我们选择合适的参数范围进行三因素三水平 RSM 设计与实验, 其方案与结果见表 4。利用 Design expert 8.0 统计软件对实验数据进行多元回归拟合, 得到以 $x_3(\text{Na}_3\text{PO}_4)$ 、 $x_4(\text{NaNO}_3)$ 、 $x_5(\text{NH}_4\text{Cl})$ 为自变量, 以 VP 培养 8 h 后的 OD_{600 nm} 值为因变量的二元多项回归方程为:

$$\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 1.26 - 2.01 - 0.003 \times 7.85x_4 - 0.03 \times x_4 - 0.09x_3 - 1.96 - 0.04x_4x_5 + 2.32 - 0.04x_4x_3 + 3.075 - 0.04x_3x_5 - 1.47 - 0.04 \times x_4^2 - 1.12 - 0.05 \times x_5^2 + 2.42 - 0.03 \times x_1^2$$

对实验数据进行多元回归拟合, 表 5 为 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 对 VP 生长影响的回归模拟分析表。从表 5 可知, 模型非常显著 ($P < 0.01$)。失拟误差不显著 ($P > 0.01$), 并且回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9217$, 校正系数 $R^2 = 0.8211$, 这些结果说明回归模型能解释 92.17% OD_{600 nm} 响应值的变化。回归模型 $F = 9.16$, $P = 0.004 < 0.01$, 说明 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 对 VP 生长的影响的模型是有效的。因此可以用上述的回归模型来分析和预测磷酸盐、硝氮和氨氮对该菌生长的影响。

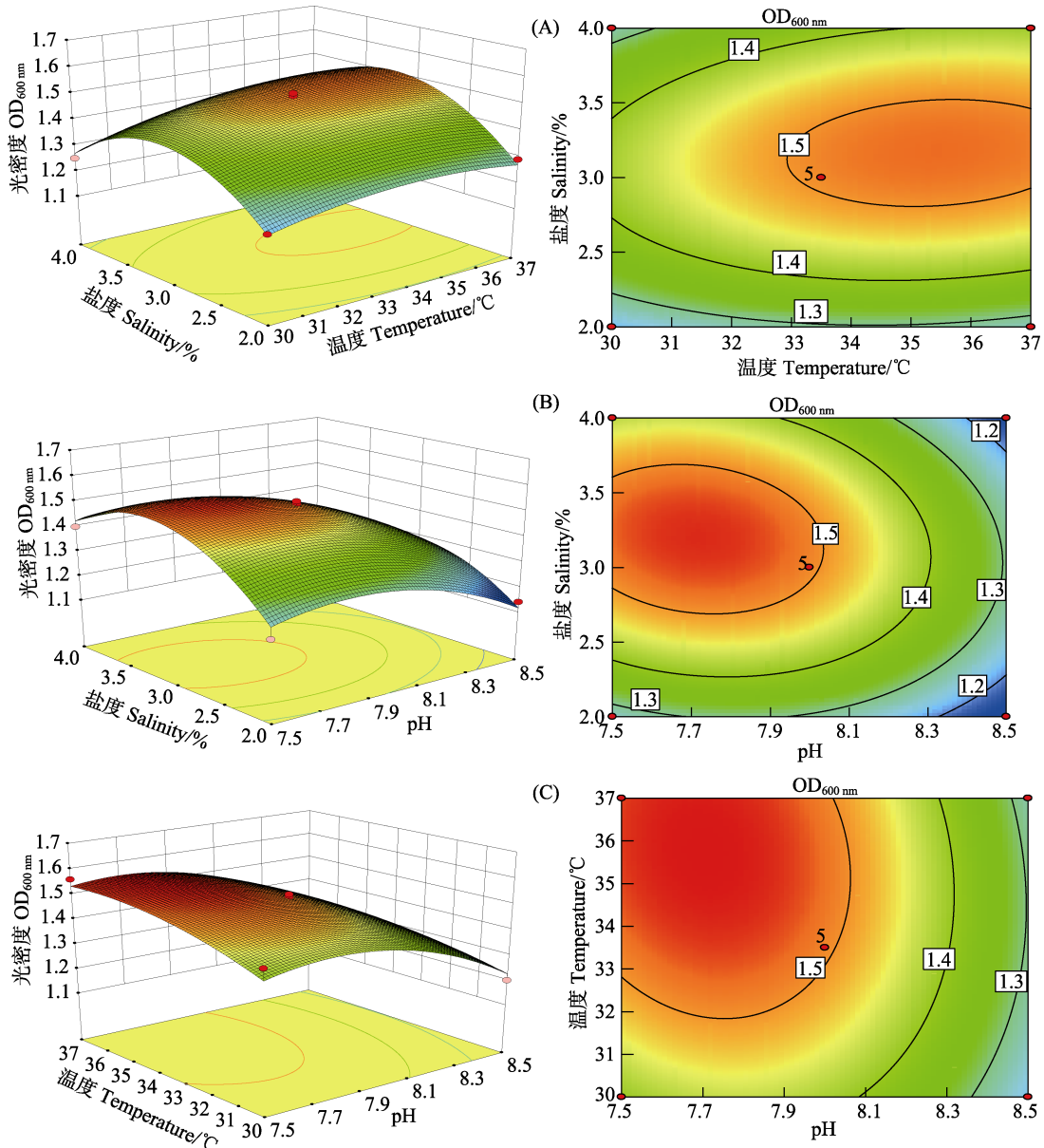


图2 温度和盐度(A)、pH和盐度(B)、pH和温度(C)交互作用对VP生长影响的响应曲面和等高线
Fig.2 Response surface plots and contour plots of the temperature & salinity (A), pH & salinity (B) and pH & temperature (C) and their mutual interactions on the growth of VP

对其回归模型方差分析进行显著性检验(表6), 一次方程中 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 对VP生长的影响具有良好的线性($P < 0.01$), 三者之间进行正交的相互效应结果对该菌生长的影响不显著($P > 0.05$), 只有 Na_3PO_4 的二次方程显著($P < 0.05$)。

利用 Design-Expert 软件对表4的数据进行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程的响应面及其等高线见图4。由图4可知, 代表VP数量的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值随着 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 中任意一种物质浓度的增加而明显降低, 意味着磷酸盐、硝氮和氨氮对该菌生长都具有显著影响; 等高线近似椭圆形说明磷

酸盐、硝氮和氨氮对VP的生长影响都无明显的交互效应($P > 0.05$)。

3 讨论

温度、盐度、pH及营养盐等多种理化因子对VP的生长都具有不同程度的影响, 对其进行系统探讨有助于人们深入了解生态系统发展与演变规律。其中, 温度、盐度和pH三种因子的作用自20世纪70年代就得到了科学界的重视(Beuchat *et al*, 1973; Young *et al*, 2015)。采用单因子分析, Beuchat等(1973)研究了温度、盐度和pH对VP生存与存活规律

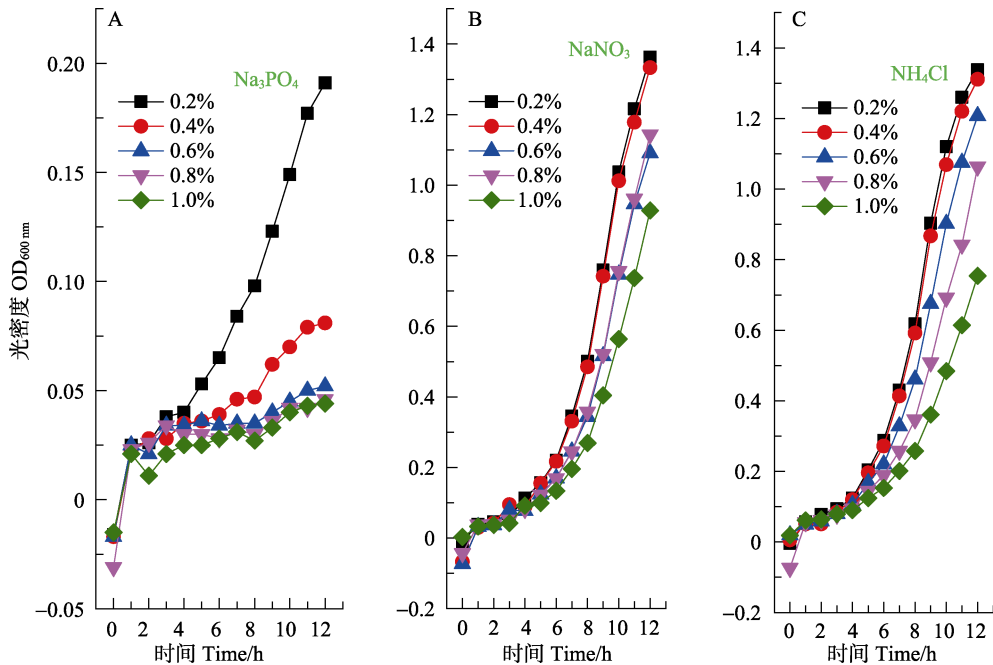


图 3 Na₃PO₄(A)、NaNO₃(B)和 NH₄Cl(C)对 VP 生长的影响
Fig.3 Effects of the Na₃PO₄ (A), NaNO₃ (B) and NH₄Cl (C) on the growth of VP

表 4 Na₃PO₄、NaNO₃ 和 NH₄Cl 响应面分析方案与实验结果
Tab.4 Experimental results and RSM scheme of Na₃PO₄, NaNO₃ and NH₄Cl

序号 No	NaNO ₃ 浓度 Concentration of NaNO ₃ (g/L)	NH ₄ Cl 浓度 Concentration of NH ₄ Cl (g/L)	Na ₃ PO ₄ 浓度 Concentration of Na ₃ PO ₄ (g/L)	OD _{600nm}
1	0.00	1.00	0.30	0.140
2	0.00	0.50	0.00	0.582
3	0.50	1.00	0.60	0.096
4	0.50	0.50	0.30	0.127
5	1.00	0.50	0.60	0.084
6	0.00	0.50	0.30	0.261
7	1.00	1.00	0.30	0.109
8	0.50	1.00	0.00	0.572
9	0.50	0.00	0.00	0.450
10	0.50	0.50	0.30	0.136
11	1.00	0.50	0.00	0.536
12	1.00	0.50	0.60	0.076
13	0.50	0.50	0.30	0.132
14	0.50	0.00	0.60	0.093
15	0.00	0.00	0.30	0.102
16	0.50	0.50	0.30	0.113
17	1.00	0.00	0.30	0.101

的影响; Randa 等(2004)研究了温度和盐度对弧菌种群动力学的影响。而本实验不但分析了这 3 种因子的单因素作用效果, 还采用 RSM 建立了多因素复合

表 5 Na₃PO₄、NaNO₃ 和 NH₄Cl 对副溶血弧菌生长情况的回归模型方差分析
Tab.5 Analysis of variance for effects of Na₃PO₄, NaNO₃ and NH₄Cl on the growth of VP

项目 Item	平方和 Sum of square	df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	1.750	9	0.190	9.2	0.004
残差 Residual	0.150	7	0.021		
失拟 Lack of fit	0.130	3	0.042	7.3	0.042
纯误差 Pure error	0.023	4	5.750		
Total	1.900	16			

注: 决定系数 R²=0.9217, 校正系数 R²=0.8211
Note: R²=0.9217, Adj. R²=0.8211

表 6 Na₃PO₄、NaNO₃ 和 NH₄Cl 回归方程系数显著性检测
Tab.6 The significance test for coefficients of established regression equation for Na₃PO₄, NaNO₃ and NH₄Cl

项目 Item	系数估值 Coefficient estimate	标准 Standard	95%CI 低 95%CI low	95%CI 高 95%CI high	P 值 P value
Intercept	0.350	0.065	0.200	0.500	
A-NaNO ₃	-0.190	0.052	-0.310	-0.068	0.0077
B-NH ₄ Cl	-0.180	0.052	-0.300	-0.061	0.0093
C-Na ₃ PO ₄	-0.330	0.052	-0.460	-0.210	0.0003
AB	-0.079	0.073	-0.250	0.094	0.3172
AC	0.047	0.073	-0.130	0.220	0.5438
BC	0.061	0.073	-0.110	0.230	0.4267
A ²	-0.059	0.071	-0.230	0.110	0.4337
B ²	-4.500	0.071	-0.170	0.160	0.9513
C ²	0.240	0.071	0.074	0.410	0.0113

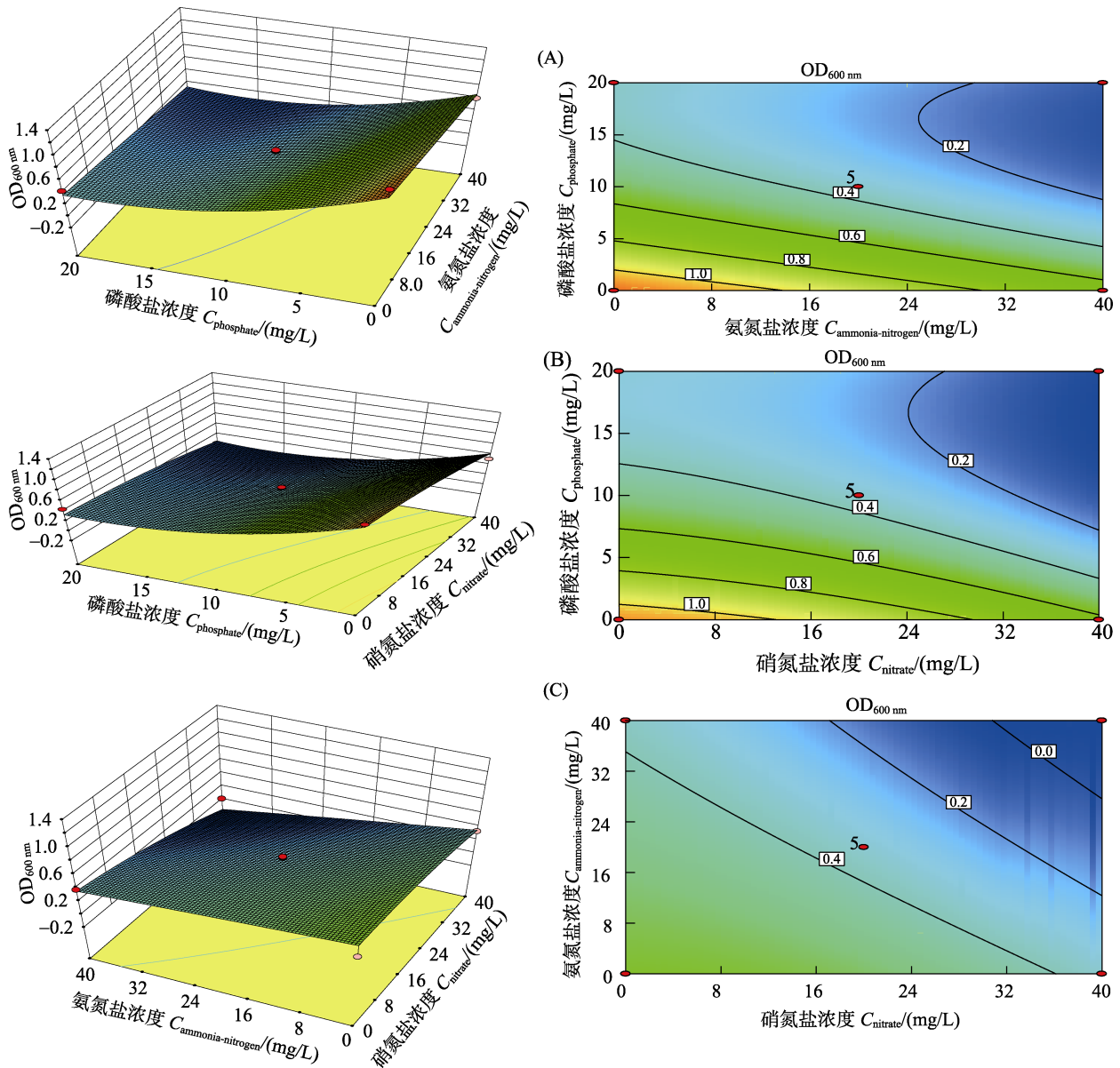


图4 Na_3PO_4 和 NH_4Cl (A)、 Na_3PO_4 和 NaNO_3 (B)、 NaNO_3 和 NH_4Cl (C)交互作用对 VP 生长影响的响应曲面和等高线

Fig.4 Response surface plots and contour plots of Na_3PO_4 & NH_4Cl (A), Na_3PO_4 & NaNO_3 (B) and NaNO_3 & NH_4Cl (C) and their mutual interactions on the growth of VP

作用下 VP 的生长模型,获得了该菌的最佳培养参数,其值与前人报道吻合良好。此外,二次回归模型决定系数 $R^2=0.9649$,校正系数 $R^2=0.9198$,再次说明本实验所建 RSM 分析的可靠性。较之于历史上的其他研究方法,RSM 最大的优点是实验次数少、灵活、方便,可以全面考虑各因素间的交互作用,并把待分析因子的实验结果函数化,从而快速得到研究对象(们)与响应值之间的关系(韩建荣等,2017)。因此,新方法有助于人们更便捷地理解和预测环境因子变化对 VP 生态动力学带来的影响。

营养盐,如磷酸盐、硝氮和氨氮对 VP 的生长代谢也具有显著的影响(Bjk *et al*, 2017; Criminger *et al*,

2007; Oliver *et al*, 1983)。由于 PO_4^{3-} 能整合二价金属阳离子,且降低细胞壁的稳定性和许多细胞的热稳定性,因而抑制细菌的生长(Mccarter *et al*, 1987; 尹守亮等,2015)。氨氮参与生物体内氧化还原循环,影响细胞壁上蛋白的运转(梁艳等,2011)。目前对其毒性的研究主要集中在鱼虾类神经元去极化(Hermenegildo *et al*, 2000)及导致机体酶失活(Ching *et al*, 2009; 尹守亮等,2015)等方面。虽然高氨氮水域中细菌的种群较少(Zhang *et al*, 2014),但其对细菌的具体毒理作用目前鲜有报道。目前硝氮对 VP 的生长也尚未得到详细的研究。本实验中,在单因素实验基础上利用 RSM 针对培养基中的营养盐-VP 生长进行

分析,建立了 Na_3PO_4 、 NaNO_3 和 NH_4Cl 含量变化对 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值的二次回归方程模型。通过回归模型方差分析得知,磷酸盐、硝氮和氨氮对 VP 生长影响都很显著(负相关)。这个结论很好地从侧面印证了前人的报道(Bjk *et al.*, 2017; Mccarter *et al.*, 1987)。通过响应曲面和等高线图的直观分析可知,磷酸盐、硝氮和氨氮之间的交互作用影响不明显。

参 考 文 献

- Bakeraustin C, Stockley L, Rangdale R, *et al.* Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 7–18
- Beuchat LR. Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, 1973, 25(5): 844
- Bjk D, Jacobs JM, Davis MF, *et al.* Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Applied & Environmental Microbiology*, 2017, 83(21): e01147–17
- Blackwell KD, Oliver JD. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. *Journal of Microbiology*, 2008, 46(2): 146–153
- Bonninjusserand M, Copin S, Le CB, *et al.* *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, in press, DOI: 10.1080/10408398.2017.1384715
- Chen XT, Huang LP, Sun M, *et al.* Optimization of conversion process of α -cyclodextrin with enzyme using response surface methodology. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 143–151 [陈晓彤, 黄立萍, 孙谧, 等. 响应面分析法优化 α -环糊精的酶转化工艺. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 143–151]
- Ching B, Chew SF, Wong WP, *et al.* Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). *Aquatic Toxicology*, 2009, 95(3): 203–212
- Criminger JD, Hazen TH, Sobczyk PA, *et al.* Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(18): 5959–5961
- Ham H, Orth K. The role of type III secretion System 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(5): 719
- Hernenegildo C, Monfort P, Felipe V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: Characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology*, 2000, 31(3): 709
- Han JR, Zhang FH. Optimization of submerged fermentation medium for *agaricus bisporus* by response surface methodology. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2017, 40(3): 602–608 [韩建荣, 翟飞红. 响应面法优化双孢蘑菇液态发酵培养基. *山西大学学报(自然科学版)*, 2017, 40(3): 602–608]
- Huang MS, Yang QQ, Zhang Y *et al.* Rapid detection method of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater based on visual LAMP. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2017, 7(6): 58–65 [黄梦诗, 杨倩倩, 张艳, 等. 海水中副溶血弧菌的可视化 LAMP 快速检测方法. *中国渔业质量与标准*, 2017, 7(6): 58–65]
- Jiang B, Wang CG, Du X, *et al.* Optimization of fermentation medium for keratinase production from *Bacillus sp.* CJPE209 using response surface methodology. *China Brewing*, 2017, 36(5): 76–80 [蒋彪, 王常高, 杜馨, 等. 响应面法优化芽孢杆菌 CJPE209 产角蛋白酶发酵培养基的研究. *中国酿造*, 2017, 36(5): 76–80]
- Johnson CN. Influence of environmental factors on *Vibrio* spp. in coastal ecosystems. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(3): 2008–2014
- Johnson CN, Bowers JC, Griffith KJ, *et al.* Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(20): 7249–7257
- Johnson CN, Flowers AR, Iii NFN, *et al.* Relationships between environmental factors and pathogenic *Vibrios* in the Northern Gulf of Mexico. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7076–7084
- Kaper J, Lockman H, Colwell RR, *et al.* Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied & Environmental Microbiology*, 1979, 37(1): 91
- Karami HR, Keyhani M, Mowla D. Experimental analysis of drag reduction in the pipelines with response surface methodology. *Journal of Petroleum Science & Engineering*, 2016, 138(2): 104–112
- Kumar M, Jain AK, Ghosh M, *et al.* Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2012, 17(3): 606–616
- Liu N, Zou D, Dong D, *et al.* Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45601
- Liu DW, Ning XB, Zhang JL. Optimization of growth condition of *Vibrio parahaemolyticus* via response surface methodology. *Microbiology China*, 2008, 35(2): 306–310 [刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件. *微生物学通报*, 2008, 35(2): 306–310]
- Liang Y, Lu GH, Qi PD, *et al.* Influence of nutrients on absorption and ecotoxicological effects of contaminants in aquatic ecosystem: A review of recent researches. *Journal of Environment and Health*, 2011, 28(2): 181–184 [梁艳, 陆光华, 齐鹏德, 等. 水体中营养盐对污染物生物吸收及生物毒性的影响. *环境与健康杂志*, 2011, 28(2): 181–184]
- Mccarter LL, Silverman M. Phosphate regulation of gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 1987,

- 169(8): 34–41
- Oliver JD, Warner RA, Cleland DR. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Applied & Environmental Microbiology*, 1983, 45(3): 985–998
- Randa MA, Polz MF, Lim E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5469–5476
- Rehnstam-Holm AS, Atnur V, Godhe A. Defining the niche of *Vibrio parahaemolyticus* during pre- and post-monsoon seasons in the Coastal Arabian Sea. *Microbial Ecology*, 2014, 67(1): 57–65
- Sun BY, Yang DD, Chen LM. A multivariate reciprocity analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in the inshore waters along China East Coast. *Journal of Microbiology*, 2015(2): 109–112 [孙博博, 杨丹丹, 陈兰明. 我国东部海域近岸水体中副溶血性弧菌的多元相关性分析. *微生物学杂志*, 2015(2): 109–112]
- Young I, Gropp K, Fazil A, *et al.* Knowledge synthesis to support risk assessment of climate change impacts on food and water safety: A case study of the effects of water temperature and salinity on *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters and harvest waters. *Food Research International*, 2015, 68: 86–93
- Yin SL, Zhang YX, Zhang Q, *et al.* The Effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of secondary metabolites in streptomycetes. *China Biotechnology*, 2015,35(9): 105–113 [尹守亮, 张玉秀, 张琪, 等. 无机磷酸盐对链霉菌合成次级代谢产物的影响. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(9): 105–113]
- Zhang C, Yuan Q, Lu Y. Inhibitory effects of ammonia on methanogen *mcrA* transcripts in anaerobic digester sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(2): 368–377

(编辑 江润林)

Study on the Effects of Temperature, Salinity, pH, Phosphate, Nitrate, and Ammonium on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus* Using Response Surface Methodology

HUANG Mengshi^{1,2}, YANG Qianqian^{1,2}, ZHANG Yan², JIANG Xiaoyu^{1,2}, ZHAO Jun², ZHANG Xuzhi^{2,3}, DING Dongsheng², QU Keming^{2,3①}

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

Abstract *Vibrio parahaemolyticus* (VP), which is ubiquitous in the marine environment, is one of the key foodborne pathogens affecting humans. It is thus of great significance for both scientific research and public safety that we understand how and what environmental factors affect its growth. To determine the functional relationship between a combination of environmental factors and VP growth, in this study the effects of temperature, salinity, pH, phosphate, nitrate, and ammonium on the growth of this kind of bacteria were investigated using response surface methodology (RSM). First, a Box-Behnken design was used to optimize the three critical internal factors of temperature, salinity and pH for this species, using optical density (OD_{600 nm}) as a marker for the growth of VP. It was found that for these factors, the optimum parameters were 34.5°C, 3‰, and 8.0, respectively. Based on these results, the combined effects of phosphate, nitrate, and ammonium on the growth of VP were then further studied with the same method to develop a response model. The coefficient of determination (R^2) of the model equation was 0.9217, while the correction coefficient (R^2) was 0.8211. The regression model had an F-value of 9.16, and was thus statistically significant ($P=0.004$). These results indicated that the model proposed herein had satisfactory accuracy. Results obtained from verified testing were also in good agreement with those obtained with the model. Clearly, phosphate, nitrate, and ammonium all exhibited negative effects on the growth of VP. These outcomes are beneficial to the culture of VP, and even to the establishment of early warning systems for marine environments and seafood safety.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*; Growth; Physical and chemical factors; Impact analysis; Response surface methodology

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180814002

http://www.yykxjz.cn/

王睿迪, 刘胜男, 王玉, 赵延宁, 薛勇. 咸干蓝点马鲛品质特征与优势菌群分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 141-147
Wang RD, Liu SN, Wang Y, Zhao YN, Xue Y. Analysis on quality characteristics and dominant strains of bacteria in dried salted Spanish mackerel. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 141-147

咸干蓝点马鲛品质特征与优势菌群分析*

王睿迪 刘胜男 王玉 赵延宁 薛勇^①

(中国海洋大学食品科学与工程学院 食品科学与人类健康实验室 青岛 266003)



摘要 为了更好地了解传统咸干蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)(鲛鱼)的品质特征,以市售产品中感官品质较为突出的咸干鲛鱼作为研究对象,对其水分、含盐量、NaNO₂含量、挥发性盐基氮(TVB-N)、硫代巴比妥酸值(TBARS)等理化指标进行了测定,并进一步对咸干鲛鱼中的优势菌进行了分离、纯化与鉴定。结果显示,咸干鲛鱼样品含水量为 54.40%、含盐量为 3.1%,属于半干低盐制品;NaNO₂含量为 5.07 mg/kg,符合相关食品安全标准的规定;TVB-N 含量高达 40.12 mg/100 g,说明发酵过程蛋白质降解程度较大;TBARS 值为 10.00 mg/kg,脂质氧化程度在感官可接受的范围内。咸干鲛鱼中的微生物以细菌为主,清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、长赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus macrolides*)和香坊肠杆菌(*Enterobacter xiangfangensis*)为优势菌。其中,清酒乳杆菌具有发酵菌的典型特征,可能在咸干鲛鱼发酵过程中起主要作用。

关键词 咸干鲛鱼;感官评价;品质特征;菌种鉴定

中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0141-07

蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*),俗称鲛鱼,具有鱼刺少、味道鲜美、营养丰富等特点,是北方沿海地区常见的食用鱼类。咸干鲛鱼是以鲜(冻)鲛鱼肉为主要原料,采用食盐腌制和干燥工艺加工而成的典型咸干鱼制品,也是我国沿海地区最具代表性的传统水产制品。咸干鲛鱼具有风味独特、易于贮藏的特点,但目前加工方式仍以手工作坊式加工和自然晾晒为主,产品存在含盐量高、风味不稳定等问题。目前我国对传统咸干鱼制品的研究还缺乏系统性,尤其是针对咸干鲛鱼的研究还非常少。

为了了解市售咸干鲛鱼产品的品质情况,本研究采集了 7 种不同产地的咸干鲛鱼产品,通过感官评价筛选出青岛产一卤鲜咸干鲛鱼作为代表性研究对象,对品质相关的理化指标进行了检测分析。另外,由于优势菌对干腌水产品发酵过程及风味的形成具有重

要的作用(吴海燕等,2010),本研究还对咸干鲛鱼中的优势菌进行了分离纯化和种类鉴定,并对菌株的基本生理生化性质进行了研究,以期对咸干鲛鱼的现代化加工和质量控制提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

从烟台、威海、青岛、日照、连云港、温州、大连 7 个地区分别采集咸干鲛鱼样品,分别编号为 1~7。样品体长为 25~30 cm,质量为 250~300 g。

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司);组胺测定试剂盒(Kikkoman 公司,日本);革兰氏染色试剂盒(日水制药公司,日本)。

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0400404)资助[This work was supported by the National Key Research and Development Program (2016YFD0400404)]. 王睿迪, E-mail: wrd0186@outlook.com

^① 通讯作者:薛勇,教授, E-mail: xueyong@ouc.edu.cn

收稿日期:2018-08-14, 收修改稿日期:2018-08-21

MRS 培养基、MRS 肉汤、RBA 培养基、PCA 培养基、营养肉汤培养基、营养琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司); AgNO_3 、 K_2CrO_4 、三氯乙酸、 MgO 、硫代巴比妥酸、三氯甲烷、 FeCl_2 、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、乙酸锌、对氨基苯磺酸、溴甲酚紫均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 甲醇为色谱纯(天津博迪化工股份有限公司)。

1.2 主要仪器

Kjeltec 8400 型全自动凯氏定氮仪(FOSS 有限公司, 瑞士); 7200 型可见分光光度计(UNIC 公司, 德国); IKA-TI8 型高速分散机(IKA 有限公司, 德国); 台式高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); Fluo ViewTM FV1000 型激光共聚焦显微镜(Olympus 公司, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 感官评价 将 7 份样品分别清洗干净并浸泡脱盐后, 在蒸锅上蒸 15 min。由 15 名经过培训的感官评价人员按照表 1 综合组织状态、色泽、气味、滋味、咀嚼度 5 个方面进行评分。

1.3.2 理化指标测定方法 参照 GB 5009.44-2016《食品安全国家标准 食品中氯化物的测定》(2016), 采用银量法测定 NaCl 含量; 参照 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》(2016), 采用直接干燥法测定水分含量; 参照 GB 5009.33-2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》(2016), 采用分光光度法测定 NaNO_2 含量; 参照 GB 5009.228-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》(2016), 采用自动凯氏定氮仪法测定 TVB-N 含量。

表 1 咸干鱼感官评分标准
Tab.1 Sensory evaluation standard for dried salted *S. niphonius*

分值 Score	评分标准 Evaluation standard						
	组织状态 Texture	色泽 Color	气味 Smell	滋味 Taste	咀嚼度 Chewiness		
76~100	组织均匀紧实, 保持咸鱼原有形态	肉色正常, 靠近表皮边缘肌肉呈粉红色	有咸鱼特有香气	咸度适中, 有咸鱼特有厚味感, 鲜味足	肉质有弹性和嚼劲		
51~75	组织较紧实	肉色正常, 有轻微褐变	较清香, 无异味	偏咸或偏淡、厚味感较好	有弹性, 咀嚼度一般		
26~50	组织稍微不完整, 质地柔软	肉色较差, 无光泽	清香味较淡, 有腥味	很咸或很淡, 厚味感和回味感弱	咀嚼度差, 有碎肉感		
1~25	组织质地不均匀, 糜烂	褐变严重或颜色发白	腥臭味严重	很咸或很淡, 无鲜味和回味感	肉质松散, 有明显碎肉感		

TBARS 值的测定参照刘昌华(2012)的方法, 并略作修改。取 5 g 鱼肉切碎, 加 10% TCA 溶液 45 ml, 匀浆后静置 1 h, 2000 r/min 离心 10 min, 过滤, 用 H_2O_2 定容至 50 ml。取 2 ml 滤液加 0.02 mol/L 的 TBA 溶液 2 ml, 在沸水浴中反应 20 min, 冷却后用分光光度计测定 532 nm 处的吸光值。

1.3.3 微生物计数与分离纯化 参照贺林娟(2013)的方法, 并略作修改。无菌条件下取咸干鱼样品 25 g, 剪碎后加入装有 225 ml 无菌生理盐水和玻璃珠的锥形瓶中, 振摇充分得到样品原液。用无菌生理盐水将样品原液按 1: 10 的比例进行梯度稀释。采用平板涂布法, 将各稀释液分别接种于 PCA、MRS 和 RBA 固体培养基中, 分别按照 GB 4789.2-2016(2016)、GB 4789.35-2016(2016)、GB 4789.15-2016(2016)进行菌落总数、乳酸菌菌落数、霉菌及酵母菌菌落数测定。

从 PCA、MRS 和 RBA 平板上挑取优势菌落于相

应分离培养基上划线分离, 30℃ 培养 48 h, 重复 2~3 次获得纯的单菌落。

1.3.4 生理生化实验 参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文等, 1999)以及相关文献(卢晓莉, 2007; 朱雯娟, 2015)对纯化的菌株进行革兰氏染色、过氧化氢酶、葡萄糖产酸产气、耐盐性等生理生化实验。

1.3.5 优势菌株的种类鉴定 将纯化后的菌株接种于相应的种子培养基, 30℃ 条件下 200 r/min 振荡培养 24 h, 离心收集菌体, 采用 DNA 抽提试剂盒提取 DNA。将提取出的 DNA 样品交由生工生物工程股份有限公司进行后续的 PCR 扩增及 16S rDNA 测序。

测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性检索和比对分析, 从 GenBank 中调取与其同源性较高的相似序列, 使用 MEGA 7.0 进行序列比对, 比对结果用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发

育树, 通过自举分析检测置信度(1000 次重复)(姚学良等, 2015)。

2 结果与分析

2.1 咸干鲛鱼感官评价结果

不同产地咸干鲛鱼产品的感官评价结果如图 1 所示。从气味方面来看, 1、3 号样品清香纯正, 有咸干鱼特有风味, 2、4 号气味稍淡, 7 号氧化味重。在口感方面, 3 号样品咸淡适中, 评分最高, 其他样品均偏咸, 得分较低, 且差别不大。另外, 3 号样品组织状态、咀嚼度两项指标对应的评分也较高。因此, 选择 3 号样品即青岛产咸干鲛鱼作为后续研究的实验对象。

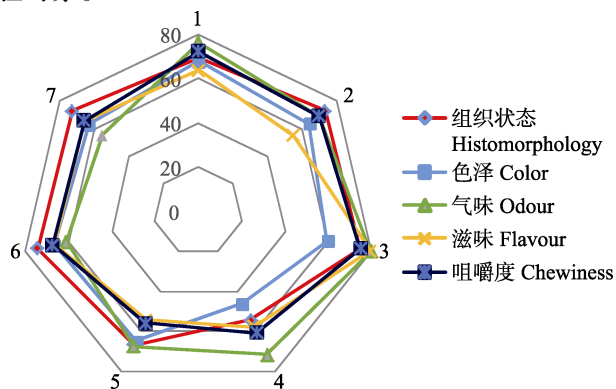


图 1 不同产地咸干鲛鱼感官评价结果

Fig.1 Sensory scores of seven dried salted *S. niphonius*

注: 1~7 号样品分别为产自烟台、威海、青岛、日照、连云港、温州、大连 7 个地区的咸干鲛鱼

Note: Sample 1~7 represents dried salted spanish mackerel products collected from Yantai, Weihai, Qingdao, Rizhao, Lianyungang, Wenzhou, and Dalian

2.2 咸干鲛鱼理化指标检测结果

青岛一卤鲜咸干鲛鱼理化指标的测定结果如表 2 所示。样品水分含量为 54.4%, 属于半干水产品。GB/T 30894-2014《咸鱼》(2014)中规定 NaCl 含量应在 3%~11% 的范围内, 检测样品的 NaCl 含量为 3.10%, 属于低盐咸鱼。NaNO₂ 含量为 5.07 mg/kg, 大幅低于 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(2014)中所规定的腌腊肉制品中 NaNO₂ (以 NaNO₂ 或 KNO₂ 计) ≤ 30 mg/kg 的限量要求, 因此传统咸干鲛鱼 NaNO₂ 超标的风险相对较小。TVB-N 是指动物性食品由于酶和微生物的作用使蛋白质分解而产生的氨以及胺类等碱性含氮物质, 常用来表征样品的新鲜度。样品中 TVB-N 含量高达 40.12 mg/100 g, 而 GB 2733-2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性

水产品》(2015)中规定鲜、冻海水鱼中的 TVB-N 含量不应超过 30 mg/100 g, 这说明咸干鲛鱼产品相较于鲜、冻鲛鱼原料蛋白质降解程度较大, 而这可能与发酵过程有关。脂肪氧化酸败是冻藏过程中水产品发生品质劣变的主要原因之一, 利用硫代巴比妥酸与丙二醛反应生成粉红色物质测定 TBARS 值, 可以准确反映脂质氧化程度(曹荣等, 2016)。Ersoy 等(2008)认为鲜、冻水产品的 TBARS 值 ≤ 8.0 mg/kg 时适宜人类食用, 咸干鲛鱼的 TBARS 值为 10.0 mg/kg, 略高于 8.0 mg/kg 的推荐标准, 这与样品水分含量低有关, 且尚未对产品的感官品质造成明显影响。

表 2 咸干鲛鱼的基本理化指标

Tab. 2 The basic physicochemical properties of dried salted *S. niphonius*

指标 Index	含量 Content
水分 Moisture (%)	54.40
NaCl (%)	3.10
NaNO ₂ (mg/kg)	5.07
TVB-N (mg/100 g)	40.12
TBARS (mg/kg)	10.00

2.3 咸干鲛鱼菌落计数结果

由各计数平板得知咸干鱼样品中菌落总数为 1.68×10^5 CFU/g, 乳酸菌菌落数为 1.06×10^5 CFU/g, 霉菌及酵母菌落数为 4.7×10^4 CFU/g。腌干鱼样品中的微生物以细菌菌相为主, 霉菌及酵母菌相对较少。咸干鲛鱼的腌渍和干燥工艺使得产品渗透压升高而水分活度降低, 从而抑制了部分微生物的生长。另外, 咸干鲛鱼产品多采用低温保藏, 微生物生长也受到了一定的影响。

2.4 典型菌株的生理生化特性

咸干鲛鱼的品质形成过程主要是微生物发酵的结果。从计数平板上筛选到 10 株典型菌落, 分别编号为 X1~X10, 其生理生化特征如表 3 所示。1955 年芬兰科学家 Niinivaara 提出理想的发酵菌株应具有革兰氏阳性、过氧化氢酶试验阳性、快速产酸、不产气、耐盐性、不产生物胺以及能抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等生理特征(Ijong *et al*, 1996; 刘成江等, 2009; 李凤彩等, 2002)。在所筛选到的 10 株菌中, X2、X4、X5、X9 为革兰氏阴性菌, 其余 6 株为革兰氏阳性菌, 该 6 株细菌均具有抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的活性(表 4), 其中仅 X1 符合上述发酵微生物的标准。因此, 综合判断菌株 X1 可能是咸干鲛鱼发酵过程中的主导菌株。

表3 典型菌株的生理生化特征
Tab.3 The physiological and biochemical properties of dominant bacteria strains

项目 Items	菌株 Strain									
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
菌落颜色 Colony colour	乳白色	淡黄色	淡黄色	淡黄色	半透明	灰白色	淡黄色	灰白色	红色	灰白色
菌体形态 Morphology	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	球形	杆状	杆状	短杆状	球形
革兰氏染色 Gram staining	G+	G-	G+	G-	G-	G+	G+	G+	G-	G+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
葡萄糖产酸 Acid production of glucose	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气 Gas production of glucose	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
5% NaCl 生长 Growth at 5% NaCl	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
产组胺 Production of histamine	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应

“+” represented positive reaction;“-” represented negative reaction

表4 典型革兰氏阳性菌菌株的抑菌活性
Tab.4 The antibacterial activities of typical Gram-positive bacteria strains

菌株 Strain	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
X1	++	+++
X3	++	+
X6	++	++
X7	+++	++
X8	+++	+++
X10	+	+

注：“+”越多表示抑菌活性越强

Note: The more “+” represents stronger inhibition activity

2.5 优势菌株的种类鉴定结果

菌株 X1、X2、X3、X4 分别占菌落总数的 21%、14%、11%、10%，在数量上占有优势。将菌株 X1~X4 的 16S rDNA 序列分别与 GenBank 中的已知序列进行比对，并利用 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建，结果见图 2。

根据同源性分析，菌株 X1 与 *Lactobacillus sakei* strain YY1(KM267631.1) 的遗传距离最近，二者的同源性为 100%，因此可以确定 X1 为乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 的清酒乳杆菌；菌株 X2 与 X4 为同一类群，属于肠杆菌属 (*Enterobacter*) 中的两个种，X2 和 X4 分别与产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、香坊肠杆菌 (*Enterobacter xiangfangensis*) 的亲缘关系最为密切；菌株 X3 属于短小芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*)

并与长赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus macrolides*) 的亲缘关系最近。

由此，咸干鲛鱼中的优势菌株主要集中在乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 以及芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*)。Huss 等 (1990) 提出当水分活度为 0.98~0.93、盐度为 3.5~10 时，食品及其原料中的优势微生物为乳酸杆菌科、肠杆菌科、芽孢杆菌科、小球菌科 (*Micrococcaceae*) 以及霉菌。而近年来国内外学者先后对鱼鲞、腊鱼等鱼制品进行菌相分析，结果均表明乳酸菌、微球菌、葡萄球菌为发酵优势菌群，影响着鱼制品的风味，并将筛选菌种成功应用于鱼制品，缩短生产周期 (杨锡洪等, 2009; Anihouvi *et al*, 2007)。曾令彬等 (2007) 的研究表明，腊鱼制品腌制过程中微生物菌群与风味物质的形成密切相关，腌腊鱼制品的优势菌为乳酸菌。Paludan-Müller 等 (2002) 也提出乳酸菌是肉制品发酵过程中的优势微生物，并能促进发酵鱼肉类制品的风味形成。Rantsiou 等 (2005) 从自然发酵香肠中分离到 358 株乳酸菌，其中以弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和清酒乳杆菌为主。Bonomo 等 (2008) 从意大利南部的传统发酵香肠中分离乳酸菌，其中清酒乳杆菌是优势菌 (67%)，其次是戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) (16%)。本研究结果与上述研究结论基本一致。

3 结论

咸干鲛鱼属于半干低盐咸干鱼制品，NaNO₂ 含量

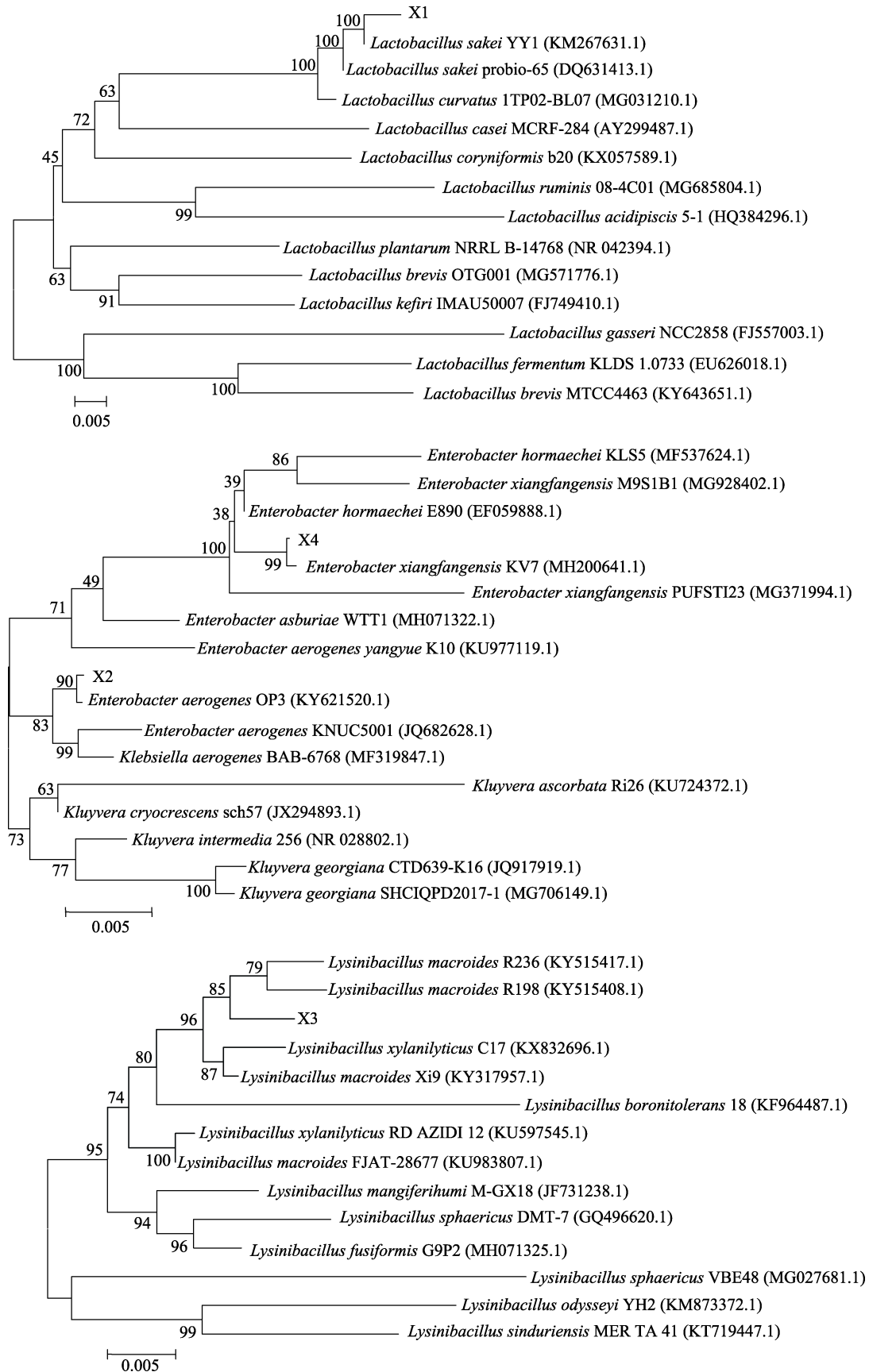


图 2 基于 16S rDNA 的优势菌株 X1~X4 基因序列的系统发育树
 Fig.2 Phylogenetic tree of strain X1~X4 on the basis of 16S rDNA sequence

在食品安全标准规定的范围内,样品的 TVB-N 含量偏高,这可能与原料新鲜度以及发酵过程中蛋白质降解有关, TBARS 值为 10.00 mg/kg, 脂质氧化程度在感官可接受的范围内。咸干鱼样品中的微生物以细菌为主,清酒乳杆菌、产气肠杆菌、长赖氨酸芽孢杆菌和香坊肠杆菌比例相对较高。结合生理生化特征,清酒乳杆菌可能是传统咸干鲑鱼发酵过程中的优势菌株。

参 考 文 献

- Anihouvi VB, Sakyi-Dawson E, Ayernor GS, *et al.* Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for *lanhouin* production. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(2): 287–291
- Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, *et al.* Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 2008, 80(4): 1238–1248
- Cao R, Wang FY, Zhao L, *et al.* Qualitative changes of squid (*Loligo japonica*) under different frozen storage temperatures. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 97–103 [曹荣, 王凤玉, 赵玲, 等. 日本枪乌贼(*Loligo japonica*)不同温度冻藏过程中的品质变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 97–103]
- Dong XZ, Cai MY. *Manual for systematic identification of common bacteria*. Beijing: Science Press, 2001, 370–398 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 370–398]
- Ersoy B, Aksan E, Özeren A. The effect of thawing methods on the quality of eels (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*, 2008, 111(2): 377–380
- He LJ. Study on fermentation processing of Chinese herring and the analysis of flavor. Master's Thesis of Ningbo University, 2013 [贺林娟. 发酵鳊鱼的制作工艺及挥发性风味成分的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Huss HH, Valdimarsson G. Microbiology of salted fish. *Fish Technology News*, 1990, 10(1): 3–5
- Ijong FG, Ohta Y. Physicochemical and microbiological changes associated with Bakasang processing—A traditional Indonesian fermented fish sause. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 71(1): 69–74
- Ling DW, Dong XZ. *Classification, identification and experimental methods of lactic acid bacteria*. Beijing: China Light Industry Press, 1999, 51–199 [凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 51–119]
- Li FC, Cheng WX, Xie H, *et al.* Discussion on screening criteria of sausage fermented strains. *Science and Technology of Food Industry*, 2002, 23(6): 78–79 [李凤彩, 程文新, 谢华, 等. 发酵香肠菌种筛选标准探讨. *食品工业科技*, 2002, 23(6): 78–79]
- Liu CH. Study on drying-reping process of perch's lipolysis and lipid oxidation and flavor character during processing. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2012 [刘昌华. 鲈鱼风干成熟工艺及其脂质分解氧化和风味品质特性研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Liu CJ, Li KX, Wu H, *et al.* Optimization of bacteria using in fermented meat. *Meat Industry*, 2009(8): 38–41 [刘成江, 李开雄, 吴宏, 等. 用于发酵肉中菌种的优选. *肉类工业*, 2009(8): 38–41]
- Lu XL. Isolation, screening and application of lactic acid bacteria from fermented fish products. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 [卢晓莉. 鱼酥制品中乳酸菌的分离、筛选及应用. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Paludan-Müller C, Madsen M, Sophanodora P, *et al.* Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 73(1): 61–70
- Rantsiou K, Drosinos EH, Gialitaki M, *et al.* Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, 2005, 22(1): 19–28
- Wu HY, Yang L, Li SD, *et al.* The application of biocatalysis-flavor-technology in aquatic processing. *Guangdong Chemical Industry*, 2010, 37(7): 66–67 [吴海燕, 杨磊, 李思东, 等. 生物催化风味在水产品加工中的应用. *广东化工*, 2010, 37(7): 66–67]
- Yang XH, Wu HY, Xie WC, *et al.* Isolation and identification of *Lactobacillus* spp. and *Staphylococcus* spp. from flavor cured fish. *Food Science*, 2009, 30(21): 192–194 [杨锡洪, 吴海燕, 解万翠, 等. 风味咸鱼中乳酸菌和葡萄球菌的分离与鉴定. *食品科学*, 2009, 30(21): 192–194]
- Yao XL, Xu XL, Li HM, *et al.* Biological characteristics of pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from *Aequidens rivulatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 106–112 [姚学良, 徐晓丽, 李贺密, 等. 红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)病原无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 106–112]
- Zeng LB, Tan RC, Xiong SB, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria in cured fish. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(1): 115–116, 119 [曾令彬, 谭汝成, 熊善柏, 等. 腌腊鱼加工中优势乳酸菌的分离与鉴定. *食品工业科技*, 2007, 28(1): 115–116, 119]
- Zhu WJ. Research on microbial population structure analysis and fermentation strains screening of fermented Meixiang fish. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2015 [朱雯娟. 发酵梅香鱼微生物种群结构分析及发酵菌株筛选研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]

Analysis of Quality Characteristics and Dominant Strains of Bacteria in Dried Salted Spanish Mackerel

WANG Ruidi, LIU Shengnan, WANG Yu, ZHAO Yanning, XUE Yong^①

(Laboratory of Food Science and Human Health, Food Science and Engineering College,
Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract To better understand the quality characteristics of traditional dried salted Spanish mackerel, the dried salted Spanish mackerel product with the best organoleptic qualities among seven commercial products was chosen, and then its basic physical and chemical characteristics were analyzed, including its salt content, nitrite content, total volatile basic nitrogen (T-VBN) content, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value, and so on. Furthermore, the dominant strains of bacteria, which have important impacts on the fermentation process and flavor formation, were isolated, purified, and identified from the dried salted Spanish mackerel product. The physiological and biochemical characteristics of these dominant bacterial strains were also studied in detail. The results showed that the water content of the traditional dried salted Spanish mackerel was 54.40%, and the salt content was 3.1%, which means that the analyzed product can be classified as a semi-dry and low-salt product. The nitrite content was 5.07 mg/kg, so the sample met relevant food safety standards. The TVB-N content of the dried salted fish product was 40.12 mg/100 g, which exceeds the TVB-N content limit of common fresh and frozen marine fish (30.00 mg/100 g), so these results indicated that the degree of protein degradation during fermentation was significant. The TBARS value was 10.00 mg/kg, which is slightly higher than the recommended standard (8.00 mg/kg); however, the degree of lipid oxidation in the sample was within the range of sensory acceptability because of its low moisture content. In addition, according to the results of plate counts of bacterial colonies, bacteria were inferred to be the dominant microorganisms in the traditional dried salted Spanish mackerel rather than yeasts or molds. On the basis of analyses of 16S rDNA sequences, the dominant strains of bacteria in the product were identified as *Lactobacillus sakei*, *Enterobacter aerogenes*, *Lysinibacillus macroides*, and *Enterobacter xiangfangensis*. Among these, *Lactobacillus sakei* was further identified as possessing the typical characteristics of a fermentative species, and thus probably plays a major role in the fermentation of dried salted Spanish mackerel.

Key words Dried salted fish; Sensory evaluation; Quality characteristics; Bacterial species identification

^① Corresponding author: XUE Yong, E-mail: xueyong@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180309001

http://www.yykxjz.cn/

朱琳, 付晓丹, 李丽, 韩振莲, 牟海津. 利用虾壳清洁化生产不同脱乙酰度壳寡糖及其抗 TMV 效果研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 148–154

Zhu L, Fu XD, Li L, Han ZL, Mou HJ. Cleaner production of chitooligosaccharides with different degrees of deacetylation from shrimp shells and their effects on TMV resistance. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 148–154

利用虾壳清洁化生产不同脱乙酰度壳寡糖 及其抗 TMV 效果研究*



朱 琳 付晓丹 李 丽 韩振莲 牟海津^①

(中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

摘要 壳寡糖的传统生产工艺是采用 HCl 和 NaOH 处理甲壳类制备壳聚糖, 再酶解获得壳寡糖, 生产过程中含高浓度 Cl⁻和 Na⁺的废水对环境造成严重污染。本研究采用 H₃PO₄ 和 KOH 为反应溶液建立壳聚糖的绿色生产工艺, 并制得不同脱乙酰度的壳寡糖, 探究了不同脱乙酰度壳寡糖抗烟草花叶病毒(TMV)的效果。结果显示, 通过该生产工艺制得壳寡糖的脱乙酰度分别为 63.79%、72.12%、79.34%和 88.15%, 分子量均为 1500 Da 左右。脱乙酰度为 79.34%和 88.15%的壳寡糖诱导植株对 TMV 产生抗病性, 表现出对 TMV 进行体外钝化、抑制 TMV 在寄主内的复制和提高植物体内过氧化氢酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的活性。

关键词 清洁化生产; 壳寡糖; 脱乙酰度; 烟草花叶病毒

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0148-07

虾壳是凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)加工过程中的副产物, 大部分虾壳被填埋处理, 造成了资源的浪费。凡纳滨对虾虾壳可作为生产壳聚糖的原料(Al Sagheer *et al*, 2009)。目前, 工业中以虾壳为原料采用 HCl 和 NaOH 制备壳聚糖, 生产过程产生的废水中含有高浓度的 Cl⁻和 Na⁺, 回收价值低, 造成资源浪费和环境污染。随着科学技术的发展和生态文明建设的要求, 人们对减少环境污染的需求越来越高, 因此, 壳聚糖的清洁化生产及虾壳的高值化利用成为亟待解决的问题。

壳寡糖(Chitooligosaccharides)是壳聚糖降解后的产物, 具有促进种子萌发、幼苗生长和提高植物抗病性等功能(袁建平等, 2011; 张洪艳等, 2011)。壳寡糖的生物活性与脱乙酰度和分子量密切相关(Das *et al*,

2015)。目前, 关于壳寡糖分子量对生物活性的影响已经进行了大量的研究(扈学文等, 2007), 然而, 壳寡糖脱乙酰度与其生物活性之间的关系却鲜有报道。

本文以凡纳滨对虾虾壳为原料, 研究了不同脱乙酰度壳寡糖的绿色生产工艺, 并探究了壳寡糖脱乙酰度对烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的影响, 期望为实现凡纳滨对虾虾壳资源的高值化绿色应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验原料: 凡纳滨对虾虾壳。供试植物: 烤烟 MSK326 品种, 由国家农作物种质资源平台烟草种质资

* 山东省自主创新及成果转化专项计划(2015ZDZX05003)资助 [This work was supported by Shandong Science and Technology Key Project (2015ZDZX05003)]. 朱 琳, E-mail: zhulin5566@126.com

^① 通讯作者: 牟海津, 教授, E-mail: mousun@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-03-09, 收修改稿日期: 2018-03-29

源子平台(National Infrastructure for Crop Germplasm Resources (Tobacco, Qingdao))提供, 其保存单位为中国海洋大学食品科学与工程学院。供试毒源: 烟草花叶病毒(TMV), 由中国农业科学院烟草研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 甲壳素的制备

预处理: 将凡纳滨对虾虾壳洗净、烘干和粉碎后, 过 100 目网筛。

脱盐: 称取一定量虾壳, 按物料比 1:6, 加入 3% H_3PO_4 , 室温搅拌 30 min, 沉淀用水洗至中性, 烘干, 测定样品中灰分含量, 计算脱盐率。

脱蛋白: 脱盐后的产物按物料比 1:6, 加入 3% KOH, 70℃搅拌 30 min, 沉淀用水洗至中性, 烘干, 测定上清液中蛋白质含量, 计算脱蛋白率。

1.2.2 不同脱乙酰度壳聚糖和壳寡糖的制备

不同脱乙酰度壳聚糖的制备: 称取一定质量的甲壳素, 置于聚四氟乙烯坩埚中, 按物料比 1:15, 加入 45% KOH 溶液, 微波功率为 600 W, 分别反应 6、7、8 和 8.5 min, 反应结束后, 沉淀水洗至中性, 溶于 2% HAC, 4800 r/min 离心 15 min, 将上清液 pH 调至中性, 析出的沉淀即为壳聚糖。烘干后, 采用双突跃电位法测定壳聚糖脱乙酰度(贾之慎等, 2001)。

壳寡糖的制备: 壳聚糖浓度 2%, 加入 1% H_2O_2 , 170 r/min 水浴摇床中 50℃反应 6 h, 反应结束后, 用 1 mol/L KOH 调节反应液 pH 至中性, 于 4800 r/min 离心 15 min, 上清液旋蒸浓缩、冻干。采用高效液相色谱法测定壳寡糖分子量, 色谱柱: TSK-Gel G4000 PWXL, 柱温为 25℃, 流速为 0.4 ml/min; 流动相: 0.1 mol/L $NaNO_3$ +0.01 mol/L NaH_2PO_4 缓冲溶液 (pH=7.0); 进样体积为 20 μ l。

1.2.3 脱盐率和脱蛋白率的计算

脱盐率计算公式如下:

$$\text{脱盐率}(\%) = \frac{(A_o \times O) - (A_p \times P)}{A_o \times O} \times 100$$

式中, A_o 为原始样品中的灰分含量(g/g), A_p 为脱盐处理后样品中的灰分含量(g/g), O 和 P 分别为原始样品和磷酸处理后样品的干重(g)。

脱蛋白率计算公式如下:

$$\text{脱蛋白率}(\%) = \frac{P_s}{P_R} \times 100$$

式中, P_R 为原始样品中的蛋白质含量(g), P_s 为脱蛋白处理后上清液中的蛋白质含量(g)。

1.2.4 不同脱乙酰度壳寡糖抗 TMV 效果分析

1.2.4.1 壳寡糖对 TMV 体外钝化的作用

将带有 TMV 的烟草叶片中按 1:40 加入磷酸盐缓冲溶液

(pH=7.2)进行研磨, 10000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液与浓度为 100 μ g/ml 不同脱乙酰度壳寡糖溶液(COS1、COS2、COS3 和 COS4)按 1:1 进行混合, 置于 25℃水浴中反应 30 min, 接种于 MSK326 烟草叶片上, 每株接种 3 片, 重复 3 次, 待植株呈病症后, 取病叶进行 Evans blue 染色(刘楠等, 2011; Singh *et al.*, 2014), 观察病斑情况。

1.2.4.2 壳寡糖对病毒复制作用的影响

选用长势均一、3~4 片真叶期的普通烟苗供试。采用叶圆片法测定壳寡糖对病毒在寄主内复制作用的影响(申莉莉等, 2007), 将 TMV 接种于健康烟草 MSK326 上 6 h 后, 取直径为 12 mm 的圆片叶, 分别在蒸馏水和浓度为 50 μ g/ml 不同脱乙酰度壳寡糖溶液(COS1、COS2、COS3 和 COS4)中进行漂浮处理 48 h, 再将圆片洗净、研磨, 10000 r/min 离心 5 min, 然后接种于 MSK326 烟草叶片上, 每株接种 3 片, 重复 3 次, 待植株呈病症后, 取病叶进行 Evans blue 染色, 观察病斑情况。

1.2.4.3 壳寡糖对烟草防御酶的影响

选用 3~4 片真叶期、长势均一的普通健康烟苗, 用 50 μ g/ml 不同脱乙酰度壳寡糖溶液(COS1、COS2、COS3 和 COS4)和蒸馏水(CT)叶面喷雾诱导供试烟苗的下部第 2 片真叶, 每组重复 3 次, 壳寡糖诱导 24 h 后, 采收处理叶的上位叶, 装入自封袋中, -80℃冰箱中保存。参照文献中的方法测定过氧化氢酶(CAT)(张志良, 2003)、过氧化物酶(POD)(高俊凤, 2000)、多酚氧化酶(PPO)(谭兴杰等, 1984)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)(薛应龙, 1985)的活性。在处理叶的上位叶片, 采用常规汁液摩擦接种法接种 TMV, 观察烟草植株的病症表现。

1.3 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 软件进行数据统计与分析, 组间差异的判定选用 *t*-检验方法, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 不同脱乙酰壳寡糖的制备

以凡纳滨对虾虾壳为原料, 采用 H_3PO_4 和 KOH 制备甲壳素, 测得其脱盐率和脱蛋白率分别为 $(94.04 \pm 0.52)\%$ 和 $(85.65 \pm 1.06)\%$, 达到工业级甲壳素的标准。甲壳素与 45% KOH 混合后, 于微波功率 600 W 条件下, 反应 6、7、8 和 8.5 min 后, 制得脱乙酰度分别为 63.79%、72.12%、79.34% 和 88.15% 的壳聚糖, 对其氧化降解后, 通过高效液相色谱法测得壳寡糖分子量

分别为1502、1515、1523和1509 Da。因此，COS1、COS2、COS3和COS4分别为脱乙酰度63.79%、72.12%、79.34%和88.15%，分子量为1500 Da左右的壳寡糖。

2.2 普通烟草抗病性表现

用不同脱乙酰度的壳寡糖喷施烟草叶片后接种TMV，观察普通烟的症状。结果显示，空白组(蒸馏水诱导)植株在接种5 d时出现轻花叶，接种9 d后出现重花叶，并且植株矮小，叶片狭窄，生长缓慢。不同脱乙酰度壳寡糖诱导后的植株病症表现不同，COS1诱导后病症出现时间和程度与空白组没有明显区别；COS2、COS3和COS4诱导后植株在接种7 d时出现轻花叶，接种13 d后出现重花叶，其中，COS3和COS4诱导后的植株患病程度最轻，说明这2种脱乙酰度的壳寡糖诱导烟草产生抗病性的效果最好。

2.3 不同脱乙酰度壳寡糖对TMV体外钝化的作用

不同脱乙酰度的壳寡糖对TMV进行体外处理接种MSK326烟草后Evans blue染色结果如图1所示，TMV经壳寡糖处理后病叶中蓝色染色区域较空白处

理组小，随着壳寡糖脱乙酰度的升高，病叶中蓝色染色区域随之减少，说明经壳寡糖处理能减轻烟草感染TMV的程度，并且不同脱乙酰度的壳寡糖对TMV的体外钝化程度不同，COS4对TMV的体外钝化作用最好。

2.4 不同脱乙酰度壳寡糖对TMV复制作用的影响

不同脱乙酰度壳寡糖对TMV复制的作用结果如图2所示，COS1和COS2处理后的烟草叶与空白组病叶中蓝色染色区域没有显著差异，说明COS1和COS2对TMV在寄主内的复制没有影响；而当COS3和COS4处理后病叶中蓝色染色区域较空白组小，说明COS3和COS4能抑制TMV在寄主内的复制作用。

2.5 不同脱乙酰度壳寡糖对烟草防御酶的影响

不同脱乙酰度壳寡糖对烟草诱导24 h后烟草叶片中过氧化氢酶活性结果如图3所示。COS1诱导烟草后，烟草叶片中过氧化氢酶活性低于空白对照组(蒸馏水处理)；COS2诱导后，叶片中过氧化氢酶活性略高于空白对照组，但二者之间没有显著性差异。当壳寡糖脱乙酰度大于72.12%时，诱导烟草后过氧

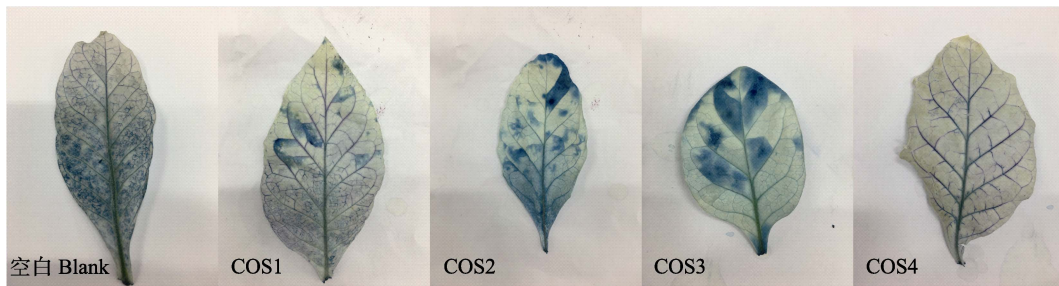


图1 不同脱乙酰度壳寡糖对TMV体外钝化的作用

Fig.1 The effects on inactivating TMV *in vitro* by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

空白为蒸馏水处理后的叶片
The blank refers to the leaf treated with distilled water

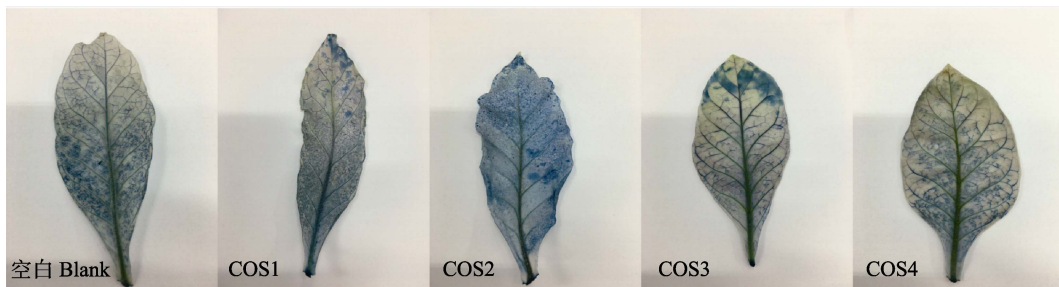


图2 不同脱乙酰度壳寡糖对TMV复制作用的影响

Fig.2 The effects on multiplication of TMV by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

空白为蒸馏水处理后的叶片
The blank refers to the leaf treated with distilled water

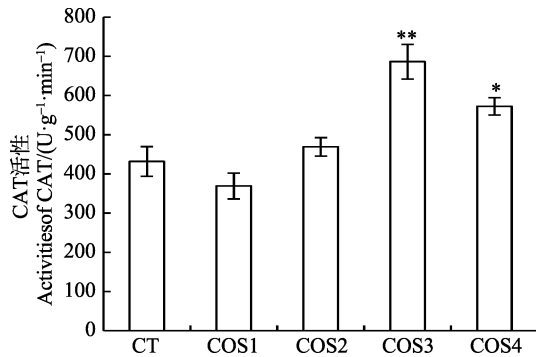


图 3 不同脱乙酰度壳寡糖诱导对烟草叶片中过氧化氢酶活性的影响

Fig.3 The effects on activity of CAT in tobacco leaves by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

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

化氢酶活性均高于空白对照组, 并且 COS3 诱导烟草后过氧化氢酶活性最高。以上结果表明, COS3 和 COS4 诱导烟草后能提高过氧化氢酶活性, 而 COS3 诱导后过氧化氢酶活性最高($P<0.01$)。

由图 4 可以看出, COS3 和 COS4 诱导烟草后, 烟草叶片中过氧化物酶活性均高于其他处理组, COS4 处理烟草后过氧化物酶活性最高。COS1 诱导烟草后, 过氧化物酶活性低于空白处理组, 而 COS2 处理组的过氧化物酶活性与空白处理组没有显著性差异。以上结果表明, COS3 和 COS4 诱导烟草能显著提高叶片中过氧化物酶的活性($P<0.05$)。

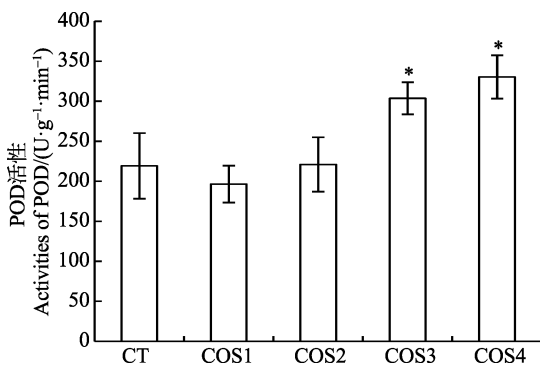


图 4 不同脱乙酰度壳寡糖诱导对烟草叶片中过氧化物酶活性的影响

Fig.4 The effects on activity of POD in tobacco leaves by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

由图 5 可知, COS1 和 COS2 处理组中多酚氧化酶的活性均低于空白对照组, 而 COS3 和 COS4 处理组的多酚氧化酶活性均高于空白对照组, 并且 COS4 诱导烟草后叶片中的多酚氧化酶活性显著高于空白

对照组。以上结果表明, COS4 诱导烟草能显著提高叶片中多酚氧化酶的活性($P<0.01$)。

从图 6 可以看出, 不同脱乙酰度壳寡糖诱导烟草后, COS1 和 COS2 处理组中苯丙氨酸解氨酶活性虽略高于空白对照组, 但与空白对照组之间没有显著性差异。而 COS3 和 COS4 处理组中苯丙氨酸解氨酶的活性均低于空白对照组, 这说明壳寡糖脱乙酰度与苯丙氨酸解氨酶活性可能不存在相关性。

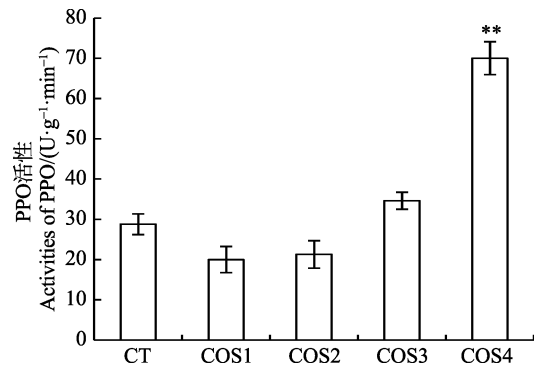


图 5 不同脱乙酰度壳寡糖诱导对烟草叶片中多酚氧化酶活性的影响

Fig.5 The effects on activity of PPO in tobacco leaves by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

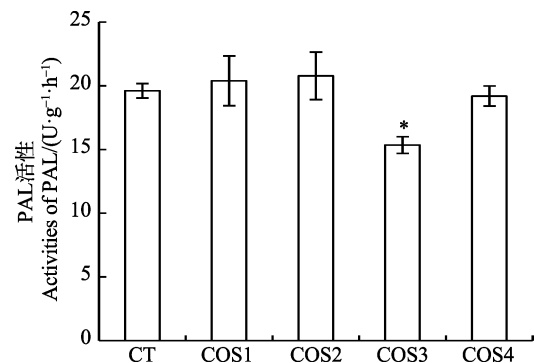


图 6 不同脱乙酰度壳寡糖诱导对烟草叶片中苯丙氨酸解氨酶活性的影响

Fig.6 The effects on activity of PAL in tobacco leaves by induction of chitooligosaccharides with different DDAs

3 讨论与结论

3.1 壳寡糖的清洁化生产

凡纳滨对虾是目前世界养殖产量最高的三大虾种之一(李晓丽等, 2017)。虾壳中的甲壳素与蛋白质交错形成网状结构, 在交错的网络中还含有以钙盐为主的矿物盐沉淀(Saito *et al*, 2000)。蛋白质和钙盐的存在会降低甲壳素的生物活性, 需要通过脱盐和脱蛋白途径制得纯度较高的甲壳素。已有研究表明, 采用

0.5~1.5 mol/L HCl 和 1~5 mol/L NaOH 处理虾壳, 脱盐率达到 90%以上(Younes *et al*, 2015), 而脱蛋白率可达到 80%以上(Hdde *et al*, 2006)。目前, 工业制备壳聚糖主要为传统加热法, 将甲壳素与 45%~60% NaOH 混合后, 于 105~130℃下加热反应 60~180 min (Viarsagh *et al*, 2010; Yen *et al*, 2009)。以上生产过程虽然能制得达到工业级标准的壳聚糖, 但 HCl 和 NaOH 的添加使生产废水中含有大量的氯元素和钠元素, 易导致土壤钠质化(李小刚等, 2004), 影响作物生长。本研究选用 H₃PO₄ 和 KOH 分别对虾壳进行脱盐、脱蛋白和脱乙酰处理, 其脱盐和脱蛋白效果与传统化学法效果一致。而且与传统化学方法相比, 采用 H₃PO₄ 和 KOH 处理虾壳, 生产过程中产生的废水含有植物生长需要的 N、P 和 K 元素, 该废水可回收后作为肥料应用于农业生产中, 减少生产过程中产生的环境污染。此外, 采用 H₂O₂ 氧化降解壳聚糖, 降解产物为壳寡糖、氧气和水, 对环境无污染。可见, 本研究不同脱乙酰度壳寡糖制备方法实现了壳聚糖的清洁化生产和凡纳滨对虾虾壳的高值化利用。

3.2 不同脱乙酰度壳寡糖对烟草抗 TMV 的影响

壳寡糖作为自然界唯一的阳离子寡糖, 可作为饲料添加剂和植物诱抗剂应用于动植物生长过程中(蔡胜昌等, 2015; 张洪艳等, 2011)。脱乙酰度是影响壳寡糖生物活性的因素之一, 目前, 已有研究报道, 壳寡糖的脱乙酰度改变对种子萌发(Lan *et al*, 2016)和植物生长(刘启顺等, 2012)等生理过程有一定的影响。研究表明, 不同脱乙酰度的壳寡糖对烟草抗 TMV 的影响有所不同, 脱乙酰度为 63.79%的壳寡糖诱导植株患病程度与空白组没有明显区别, 而脱乙酰度为 79.34%和 88.15%的壳寡糖诱导后的植株具有较好的抗病性, 植株患病程度最轻。

3.3 不同脱乙酰度壳寡糖对 TMV 体外钝化和复制的作用

壳寡糖对真菌类病菌具有广谱的抑制作用(Alejandrob *et al*, 2008), 并且对植物病原真菌、细菌和病毒有体外抑制作用(赵小明等, 2006)。当病毒在植物体外受到寡糖抑制时, 一定程度上会阻碍病毒侵入植株内, 从而减轻植物患病程度。研究表明, 不同脱乙酰度的壳寡糖对 TMV 进行体外处理, 接种烟草叶片后植株的患病程度不同, 脱乙酰度为 88.15%的壳寡糖对 TMV 的体外钝化作用最好, 说明高脱乙酰度的壳寡糖可以通过对 TMV 的体外钝化阻碍病毒对寄主的侵染, 从而减轻植株的患病程度。TMV 在

侵入植物进行复制后, 将病毒运输到植物各个部位引起系统性侵染(张微, 2010)。研究表明, 脱乙酰度为 79.34%和 88.15%的壳寡糖能抑制 TMV 在寄主内的复制作用, 这可能是由于以上 2 种脱乙酰度的壳寡糖抑制了病毒的复制, 使病毒被限制在最初的侵染点, 从而避免植物遭受系统性侵染。

3.4 不同脱乙酰度壳寡糖对烟草防御酶的影响

植物体内防御酶活性的变化与其抗病性相关, 如过氧化氢酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶。过氧化氢酶与植物体内活性氧清除有关, 通过影响活性氧的积累而改变植物的抗病性(宋瑞芳等, 2007); 过氧化物酶能有效清除植物内源性活性氧, 还能促进多酚的氧化(Kushalappa *et al*, 2016); 多酚氧化酶与植物次生代谢产物的生成有密切关系(郭红莲等, 2003); 苯丙氨酸解氨酶是苯丙烷类次生代谢途径中的关键酶和限速酶, 与木质素的生成和沉积有关, 能有效阻止病原的扩散(马俊彦等, 2007)。研究表明, 脱乙酰度为 79.34%和 88.15%的壳寡糖诱导烟草后能提高过氧化氢酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性。因此, 脱乙酰度为 79.34%和 88.15%的壳寡糖诱导植株产生抗病性, 可能是通过对病毒的体外钝化作用、抑制病毒在寄主内的复制和提高植物体内过氧化氢酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性而实现的。植物抗病性的产生是一个复杂的生理过程, 体外钝化、病毒复制和植物防御酶系活性的变化并不能具体说明壳寡糖脱乙酰度与烟草抗病机理的关系, 所以, 还需要从基因调控方面对植物抗病机理进行深入研究。

参 考 文 献

- Alejandrob F, Juancarlos C, Daimy C, *et al*. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica* nicotianae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(1): 103-112
- Al Sagheer FA, Alsughayer MA, Muslim S, *et al*. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(2): 410-419
- Cai SC, Zhang LM, Zhang DR, *et al*. Effects of chitosan oligosaccharides and xylo-oligosaccharides on the growth, body composition and blood biochemical indexes of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 29-36 [蔡胜昌, 张利民, 张德瑞, 等. 壳寡糖与低聚木糖对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 29-36]

- Das SN, Madhuprakash J, Sarma PV, *et al.* Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(1): 29–43
- Guo HL, Cheng GW, Chen J, *et al.* Study on the metabolism of phenolic substances in the resistance response of corn gray spot disease. *Journal of Plant Pathology*, 2003, 33(4): 342–346 [郭红莲, 程根武, 陈捷, 等. 玉米灰斑病抗性反应中酚类物质代谢作用的研究. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 342–346]
- Gao JF. *Experimental techniques of plant physiology*. Xian: World Book Inc, 2000 [高俊凤. *植物生理学实验技术*. 西安: 世界图书出版公司, 2000]
- Hdde H, Netto FM. Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 2006, 71(5): 298–303
- Hu XW, Xu QJ, Jin XC, *et al.* The effect of different molecular weight chitooligosaccharides on seed germination and seedling resistance enzyme activity of ryegrass. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(2): 221–225 [扈学文, 许秋瑾, 金相灿, 等. 不同分子量壳寡糖对黑麦草种子萌发和幼苗抗病酶活性影响的研究. *中国农学通报*, 2007, 23(2): 221–225]
- Jia ZS, Li QB. Determination of deacetylation degree of chitosan by double sudden jump potential titration. *Chemical World*, 2001, 42(5): 240–241 [贾之慎, 李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度. *化学世界*, 2001, 42(5): 240–241]
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S. Plant innate immune response: Qualitative and quantitative resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2016, 35(1): 38–55
- Lan W, Wang W, Yu Z, *et al.* Enhanced germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) using chitooligosaccharide as an elicitor in seed priming to improve malt quality. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(11): 1–6
- Li XG, Cao J, Li FM. Effects of salinization and natriuretic on the physical properties of soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(1): 64–72 [李小刚, 曹靖, 李凤民. 盐化及钠质化对土壤物理性质的影响. *土壤通报*, 2004, 35(1): 64–72]
- Liu N, Lin ZF. Cell activity staining in whole plant leaves with Evans blue. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 47(6): 570–574 [刘楠, 林植芳. 用伊文思蓝染色法检测植物整体叶片的细胞活性. *植物生理学报*, 2011, 47(6): 570–574]
- Li XL, Wang L, Song K, *et al.* Effects of low molecular hydrolysable fish protein added to low fish meal on non specific immunity and antioxidant capacity of *Penaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 85–91 [李晓丽, 王玲, 宋凯, 等. 低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 85–91]
- Liu QS, Yin H, Li SG, *et al.* Application of chitosan oligosaccharides and their derivatives in plant preservation and fruit preservation: CN, CN 102771477 A. 2012 [刘启顺, 尹恒, 李曙光, 等. 壳寡糖及其衍生物在植物保花保果中的应用: CN, CN 102771477 A. 2012]
- Ma JY, Yang RD, Ao LG. *Advances in biological studies of phenylalanine ammonia lyase*. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(7): 71–74 [马俊彦, 杨汝德, 敖利刚. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展. *现代食品科技*, 2007, 23(7): 71–74]
- Saito Y, Okano T, Gaill F, *et al.* Structural data on the intra-crystalline swelling of beta-chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000, 28(1): 81–88
- Shen LL, Wang FL, Qian YM, *et al.* Inhibitory effect of antagonistic bacteria on tobacco mosaic virus (TMV). *Tobacco Science in China*, 2007, 28(5): 9–11 [申莉莉, 王凤龙, 钱玉梅, 等. 拮抗细菌对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用研究. *中国烟草科学*, 2007, 28(5): 9–11]
- Singh VK, Upadhyay RS. Fusaric acid induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Solanum lycopersicum* L. *Botanical Studies*, 2014, 55(1): 1–11
- Song RF, Ding YL, Gong CY, *et al.* Research progress on the relationship between tobacco resistance and defense enzyme activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(5): 309–314 [宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 309–314]
- Tan XJ, Li YB. Partial purification and properties of polyphenol oxidase from pericarp of *Litchi chinensis*. *Journal of Plant Physiology*, 1984(4): 47–54 [谭兴杰, 李月标. 荔枝(*Litchi chinensis*)果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质. *植物生理学报*, 1984(4): 47–54]
- Viarsagh MS, Janmaleki M, Falahatpisheh HR, *et al.* Chitosan preparation from Persian Gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation. *Journal of Paramedical Sciences*, 2010(2): 2–6
- Xue YL. *Experimental manual of plant physiology*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985, 191–192 [薛应龙. *植物生理学实验手册*. 上海: 上海科技出版社, 1985, 191–192]
- Yen MT, Yang JH, Mau JL. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75(1): 15–21
- Younes I, Hajji S, Rinaudo M, *et al.* Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 84: 246–253
- Yuan JP, Guo JA, Wang SF. Effects of chitosan oligosaccharides on seed germination and seedling growth of wheat. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(2): 709–710 [袁建平, 郭军艾, 王少飞. 壳寡糖对小麦种子萌发及幼苗生长的影响. *安徽农业科学*, 2011, 39(2): 709–710]
- Zhang HY, Wang WX, Yin H, *et al.* Study on nitric oxide signal induced by chitosan oligosaccharides in plant defense response. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2011, 31(2): 18–22 [张洪艳, 王文霞, 尹恒, 等. 壳寡糖诱导植物防御反应中一氧化氮信号的研究. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(2): 18–22]
- Zhang W. Study on the resistance and mechanism of PeaT1 induced tobacco system. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 [张微. PeaT1 诱导烟草系统获得抗病性及其作用机理的研究. *中国农业科*

学院硕士研究生学位论文, 2010]

Zhang ZL. Experimental guidance of plant physiology. Beijing: Higher Education Press, 2003 [张志良. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2003]

Zhao XM, Du YG. Progress of oligosaccharide elicitors and

mechanism of plant induced resistance research. Review of China Agricultural Science and Technology, 2006, 8(6): 26–32 [赵小明, 杜昱光. 寡糖激发子及其诱导植物抗病性机理研究进展. 中国农业科技导报, 2006, 8(6): 26–32]

(编辑 冯小花)

Cleaner Production of Chitooligosaccharides with Different Degrees of Deacetylation from Shrimp Shells and Their Effects on TMV Resistance

ZHU Lin, FU Xiaodan, LI Li, HAN Zhenlian, MOU Haijin^①

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract Shrimp shells contain a number of components, including chitin, proteins, and minerals. Chitooligosaccharides, derivatives of chitin, are homo- or hetero-oligomers of *N*-acetyl-glucosamine and D-glucosamine that are linked by β -1,4-glycosidic bonds. The production of chitooligosaccharides from shrimp shells involves demineralization, deproteinization, deacetylation, and depolymerization. The traditional chemical processes involved in the extraction of chitosan from shrimp shells mostly use HCl for the demineralization and NaOH for the deproteinization and deacetylation processes; the chitosan is then oxidatively degraded to chitooligosaccharide. Although these methods are highly economic and effective, they present several disadvantages, such as energy wastage, long processing times, and environmental pollution. Chitooligosaccharides have been widely used in agriculture and it has been proven that their degree of deacetylation (DDA) affects the physiology of the plants. However, limited attention has been paid to understanding the relationship between the DDA of a chitooligosaccharide and its effects on plant resistance to tobacco mosaic virus (TMV). In the present study, an eco-friendly method was established for the production of chitooligosaccharides by using H_3PO_4 for the demineralization and KOH for the deproteinization and deacetylation processes. Additionally, we studied the effects of chitooligosaccharides with different DDAs on the resistance to TMV. The effects of chitooligosaccharides with different DDAs on inactivating TMV *in vitro* and inhibiting its multiplication were detected by the Evans blue method. Changes in the activities of defensive enzymes induced by chitooligosaccharides with different DDAs were tested with tobacco leaves. The degrees of demineralization and deproteinization were $94.04\% \pm 0.52\%$ and $85.65\% \pm 1.06\%$, respectively. Chitosans and chitooligosaccharides with different DDAs were obtained by microwave-assisted KOH metathesis and oxidative degradation. The DDAs of the obtained chitooligosaccharides were 63.79%, 72.12%, 79.34%, and 88.15%, and their molecular weights were approximately 1500 Da. The chitooligosaccharides with 79.34% and 88.15% DDAs improved leaf resistance to TMV by inactivating the virus *in vitro*, inhibiting its multiplication, and increasing the activities of the CAT, POD, and PPO enzymes. The liquid waste generated during the demineralization, deproteinization, and deacetylation processes was found to be rich in phosphorus, potassium, and nitrogen, the main constituents of fertilizers. The chitooligosaccharides with 79.34% and 88.15% DDAs could thus be applied as resistance inducers. Therefore, the liquid waste and the chitooligosaccharides generated could be recovered and used in fertilizers, which would significantly decrease environmental pollution and improve the economic value of shrimp shells.

Key words Cleaner production; Chitooligosaccharide; Deacetylation degree; Tobacco mosaic virus

^① Corresponding author: MOU Haijin, E-mail: mousun@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180810005

http://www.yykxjz.cn/

潘晓炀, 杨林莘, 王晓燕, 金银哲, 程裕东. 冻融循环对南极磷虾肉糜滋味成分的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 155-160

Pan XY, Yang LX, Wang XY, Jin YZ, Cheng YD. Effects of freezing and thawing cycles on taste components of minced Antarctic krill. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 155-160

冻融循环对南极磷虾肉糜滋味成分的影响*

潘晓炀^{1,2,3} 杨林莘^{1,2,3} 王晓燕^{1,2,3} 金银哲^{1,2,3①} 程裕东^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 食品热加工工程中心 上海 201306;
3. 国家级食品科学与工程实验教学示范中心 上海 201306)



摘要 以南极磷虾(*Euphausia superba*)肉糜为原料,通过测定南极磷虾肉糜在反复冷冻和解冻过程中 ATP 及其关联产物、游离氨基酸等的变化,分析冻融循环对虾肉糜滋味成分的影响。结果显示,随着冻融循环次数的增加,南极磷虾肉糜的 ATP 及其关联产物降解加剧,呈鲜味的核苷酸含量逐渐减少,呈苦味的核苷酸含量逐渐增加。1 次冻融对应的鲜味苦味比为 3.32; 2 次及以上的冻融循环会造成鲜苦比的显著降低($P<0.05$),同时 K 值迅速增大,表明鲜度发生大幅下降; 3 次冻融循环后, K 值显著增大($P<0.05$); 4 次冻融对应的 K 值为(86.88±3.58)%, 南极磷虾肉糜已不新鲜。冻融循环次数的增加导致游离氨基酸总含量增加, 鲜味氨基酸和甜味氨基酸比例逐渐减小, 苦味氨基酸的比例逐渐增大, 导致虾肉糜的滋味进一步劣化。研究表明, 冻融循环次数控制在 2 次以内, 可较好地保持南极磷虾肉糜的滋味。

关键词 南极磷虾; 冻融循环; 滋味成分; ATP 及其关联产物; 游离氨基酸

中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0155-06

南极磷虾(*Euphausia superba*)被认为是一种丰富的蛋白质来源,总生物量估计为 3.79 亿 t,其可利用生物量与人类目前捕获的其他水生生物的总生物量相当(Atkinson *et al*, 2009; 聂玉晨等, 2016)。南极磷虾作为食品进行开发利用面临一些问题,如外骨骼中高含量的氟化物对人体健康有潜在危害;另外,磷虾体内高活性的内源酶会引起死后的快速自溶,从而导致腐败(Anheller *et al*, 1989)。Boonsumrej 等(2007)提出捕获后的磷虾应立即进行冷冻处理,以获得更好的品质。冷冻可以有效延缓磷虾的自溶,同时抑制微生物作用,在磷虾加工中得到了广泛的应用。

食品及其原料的冻融循环通常发生在零售场所、餐馆和家庭日常消费过程中(Ali *et al*, 2015)。在虾和

其他水产品的冷冻贮藏过程中,脂质氧化、蛋白变性、冰晶的升华和重结晶,是引起品质变化的主要原因(Londahl, 1997; 曹荣等, 2016)。在解冻过程中,水产品原料的品质会进一步劣化,这主要取决于解冻方式、解冻速率和冻融次数(Srinivasan *et al*, 1998)。微波解冻比传统解冻更快速、更均匀,对组织的破坏更小,汁液损失更低,同时可以控制微生物的生长繁殖(郭洁玉, 2015),因而在食品工业和家庭消费中的应用越来越普遍。

反复冷冻和解冻会加速食品原料的品质劣化(Ali *et al*, 2015; 戚军, 2009)。如 Sriket 等(2007)发现冻融循环会加剧斑节对虾(*Penaeus monodon*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)蛋白质变性和肌纤维

* 上海高校知识服务平台(ZF1206)资助 [This work was supported by Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206)]. 潘晓炀, E-mail: 245217816@qq.com

① 通讯作者: 金银哲, 副教授, E-mail: yzjin@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-08-10, 收修改稿日期: 2018-08-21

损伤。此外,冻融循环还会加剧对虾的脂质氧化和质构劣化(Boonsumrej *et al*, 2007)。目前,关于冷冻和微波解冻循环对南极磷虾风味影响的报道还很少。本研究通过分析南极磷虾虾肉糜在反复冷冻和解冻过程中 ATP 及其关联产物、游离氨基酸的变化,探究冻融循环对南极磷虾虾肉糜滋味成分的影响,为南极磷虾的高效加工利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

冷冻的南极磷虾虾砖(250 g/块)购于山东青岛大康尚品商贸有限公司;三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP)、腺苷酸(Adenosine monophosphate, AMP)、肌苷酸(Inosine monophosphate, IMP)、次黄嘌呤核苷(Hypoxanthine riboside, HxR)和次黄嘌呤(Hypoxanthine, Hx)标准品以及氨基酸标准品购于美国 Sigma 公司;甲醇、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 KH_2PO_4 、NaOH、NaCl 为色谱纯,其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

E2695 高效液相色谱仪 美国沃特世股份有限公司;L-8800 氨基酸全自动分析仪日立(中国)有限公司;OSR-8 微波工作站 松下电器集团有限公司;Avanti J-26S 高效离心机 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;FSH-2 可调高速匀浆机 常州国华电器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 南极磷虾虾肉糜的制备 南极磷虾虾砖常温条件下流水解冻 30 min,去除表面多余的水分。取适量的南极磷虾放入研磨机中进行斩拌,每隔 1 min 斩拌 1 次,转速为 10000 r/min,共斩拌 3 min。将斩拌后的虾肉糜填入外径 22 mm、内径 20 mm、高 15 mm 的模具中,用封口膜密封。

1.3.2 冷冻和微波解冻处理 将样品放于 $-20^{\circ}C$ 冰箱中冻藏 7 d 后取出解冻,再放入冰箱冻藏,重复 5 次,实验周期共 35 d。样品从冰箱取出后,均在微波工作站中解冻。微波功率设置为 150 W,解冻时通过光纤传感器来监测样品中心温度,样品中心温度达到 $(4 \pm 0.5)^{\circ}C$ 作为解冻终点。

1.3.3 ATP 及其关联产物的分析 参考负三月等(2017)的方法并略作修改。准确称量 5.0 g 冻融循环后的虾肉糜样品,加入 10% $HClO_4$ 20 ml,均质后在

$4^{\circ}C$ 条件下 10000 r/min 离心 10 min,取上清液。在沉淀中继续加入 5% $HClO_4$ 10 ml,重复上述操作。离心后将 2 次上清液合并,用 KOH 溶液调 pH 至 5.8,定容到 50 ml,用 0.22 μm 水相滤膜过滤后采用高效液相色谱仪进行分析。

高效液相色谱法的测试条件为:岛津 ODS-3 C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);柱温为 $30^{\circ}C$;流动相溶液 A 为 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 混合液,溶液 B 为甲醇;采用等梯度洗脱,流速为 1.0 ml/min;进样量为 10 μl ;检测波长为 254 nm。

1.3.4 鲜苦比的计算 参考 Zhang 等(2018)的方法,计算公式如下:

$$\text{鲜苦比}(\text{鲜味核苷酸和苦味核苷酸含量之比}) = \frac{\text{IMP}}{\text{HxR} + \text{Hx}}$$

式中,IMP、HxR 和 Hx 为各呈味核苷酸含量($\mu\text{mol/g}$)。

1.3.5 K 值的计算 参考 Saito 等(1959)的方法,计算公式如下:

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

式中,ATP、ADP、AMP、IMP、HxR 和 Hx 为各核苷酸含量($\mu\text{mol/g}$)。

1.3.6 游离氨基酸的测定 参考王曜等(2014)的方法并略作修改。准确称量 2.0 g 冻融循环后的虾肉糜样品,加入 0.02 mol/L 的稀盐酸 20 ml,均质 5 min 后,在 $4^{\circ}C$ 条件下 5000 r/min 离心 10 min,取上清液定容至 50 ml。取 2 ml 上述溶液加入 50 ml 离心管中,同时加入 5% 的磺基水杨酸 2 ml,在 $4^{\circ}C$ 条件下 10000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 水相滤膜过滤后,进氨基酸全自动分析仪进行测定。

1.3.7 滋味活性值(TAV)的计算 参考乔方等(2013)的方法,计算公式如下:

$$\text{TAV} = \frac{\text{滋味活性物质的浓度值}}{\text{该物质的味道阈值}}$$

1.4 数据处理

采用 Origin 8.3 绘制图表,显著性分析采用 SPSS 21.0,结果采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 南极磷虾虾肉糜在冻融过程中 ATP 及其关联产物变化

图 1 是冻融循环对南极磷虾虾肉糜 ATP 及其关联产物的影响。ATP 的主要功能是为细胞提供能量

(刘旭等, 2008; 汤水粉等, 2014)。水产动物死前挣扎程度、死后贮藏温度和条件等都会影响 ATP 的降解速度(Özogul *et al.*, 2010)。ADP、AMP、IMP、HxR、Hx 等都是 ATP 分解后的关联化合物。IMP 是呈鲜味的核苷酸(Xi *et al.*, 2016)。HxR 和 Hx 可以产生苦味。1 次冻融对应的 AMP 和 IMP 的含量相对较高, 分别是 2.79 $\mu\text{mol/g}$ 和 2.92 $\mu\text{mol/g}$ 。在第 2 次冻融循环后, IMP 含量显著下降($P<0.05$), 从 2.92 $\mu\text{mol/g}$ 下降至 0.39 $\mu\text{mol/g}$, 而 AMP 含量则增加至 3.83 $\mu\text{mol/g}$ 。冻融循环 3 次后, IMP 的含量无明显变化, AMP 的含量则显著降低($P<0.05$)。HxR 的含量随冻融次数呈现逐渐增加的趋势, 在冻融循环 4 次后达到最大值 5.53 $\mu\text{mol/g}$ 。冻融 2 次对应的 Hx 含量有明显增加, 之后随冻融次数的增加变化不大。HxR 和 Hx 的积累是自溶与微生物作用的结果(Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008)。

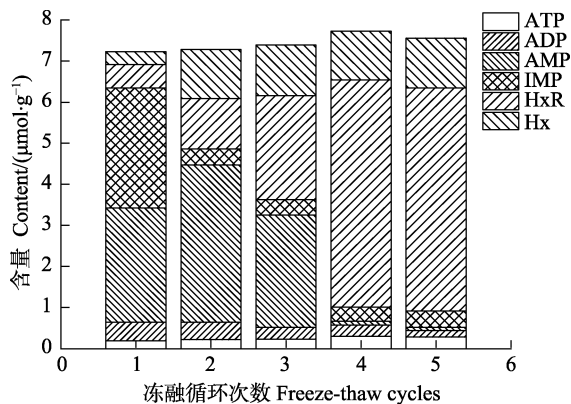


图 1 冻融循环对南极磷虾虾肉糜 ATP 及其关联产物的影响

Fig.1 Effects of freezing and thawing cycles on nucleotide related compounds of minced Antarctic krill

鲜苦比可表征冻融循环对南极磷虾虾肉糜滋味的影响。由图 2 可以看出, 随着冻融次数的增加, 呈苦味的核苷酸比例增大, 1 次冻融对应的鲜苦比为 3.32, 2 次冻融对应的鲜苦比仅为 0.16, 差异极为显著($P<0.01$)。

K 值是评价水产品新鲜度的常用指标。一般而言, K 值越小表明水产品越新鲜(方艺达等, 2017)。刚捕获的水产品 K 值一般不超过 10%, 贮藏前期 K 值的增加主要是酶作用下 ATP 发生降解, 随后 K 值的迅速增加则主要是微生物作用的结果(Morzell *et al.*, 2003)。Saito 等(1959)认为水产品 K 值 $<20\%$ 表明非常新鲜, K 值 $<50\%$ 时可以接受, K 值 $>70\%$ 时表明已失去商品价值。图 2 是冻融循环期间南极磷虾虾肉糜鲜苦比和 K 值的变化情况。随着冻融循环次数的增加,

K 值从 12%增加到 88%, 4 次冻融循环后南极磷虾已不新鲜, 这主要是 HxR 含量增加的结果。Lee 等(2016)发现冻融循环次数的增加, 加速了氧化三甲胺脱甲基酶的释放和积累, 加速了蛋白质的变性和聚集, 由此导致鱼类肌肉的品质进一步劣化。

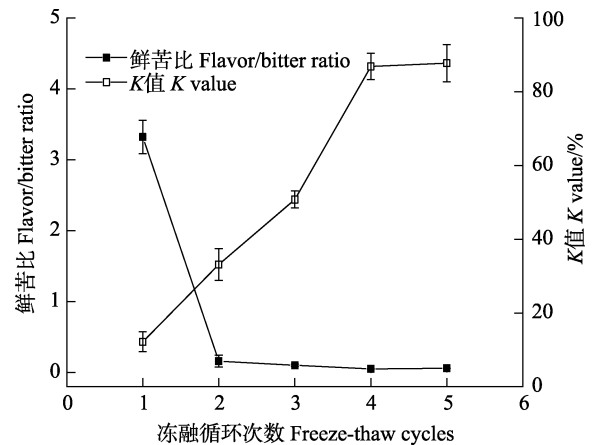


图 2 冻融循环期间南极磷虾虾肉糜鲜苦比和 K 值的变化
Fig.2 Changes in flavor/bitter ratio and K value of minced Antarctic krill during freezing and thawing cycles

2.2 南极磷虾虾肉糜在冻融过程中游离氨基酸含量变化

由表 1 可知, 南极磷虾虾肉糜中共检测到 16 种游离氨基酸, 甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、精氨酸和脯氨酸含量相对较高。随着冻融次数的增加, 虾肉糜中游离氨基酸的总含量逐渐增加, 这与 Zhou 等(2011)的研究结果基本一致, 这可能与冻融循环期间蛋白质持续发生降解有关(Mesias *et al.*, 2016)。陈茜茜等(2014)发现冻融循环次数的增加促进了牛肉蛋白质的氧化与降解, 降低了牛肉的嫩度和保水性。此外, 冻融循环期间虾肉糜中游离氨基酸主要是甜味氨基酸和苦味氨基酸, 鲜味氨基酸比例较低。随着冻融次数的增加, 甜味氨基酸比例逐渐减小, 而苦味氨基酸的比例有所增大。

TAV 是单一的滋味活性物质的浓度与其阈值的比值, $TAV>1$ 时, 数值越大, 对滋味的贡献越大(乔方等, 2013)。由表 2 可知, 冻融循环期间 16 种游离氨基酸中 TAV 值 >1 的氨基酸有 6 种, 分别为甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸和脯氨酸。甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸是呈甜味的氨基酸, 赖氨酸、组氨酸和精氨酸是呈苦味的氨基酸(曹荣等, 2018)。在冻融循环期间, 南极磷虾虾肉糜中 3 类呈味氨基酸的总 TAV 值大小顺序为: 苦味 $>$ 甜味 $>$ 鲜味, 说明虾肉糜中苦味氨基酸对滋味的贡献较大。

表1 冻融循环期间南极磷虾肉糜中游离氨基酸的含量
Tab.1 Free amino acids contents of minced Antarctic krill during freezing and thawing cycles (mg/g)

氨基酸 Amino acids	冻融循环次数 Freeze-thaw cycles				
	1	2	3	4	5
天冬氨酸 Asp [▽]	0.16±0.01	0.16±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01
苏氨酸 Thr ^{※/○}	0.25±0.01	0.26±0.01	0.32±0.01	0.32±0.01	0.32±0.01
丝氨酸 Ser [○]	0.25±0.01	0.26±0.01	0.32±0.01	0.31±0.01	0.32±0.01
谷氨酸 Glu [▽]	0.15±0.01	0.17±0.01	0.22±0.01	0.23±0.01	0.25±0.01
甘氨酸 Gly [○]	1.61±0.09	1.70±0.08	2.17±0.02	2.12±0.07	2.18±0.04
丙氨酸 Ala [○]	0.74±0.04	0.80±0.01	1.03±0.03	1.00±0.03	1.02±0.03
缬氨酸 Val ^{※/▲}	0.25±0.01	0.27±0.01	0.32±0.01	0.33±0.01	0.34±0.01
甲硫氨酸 Met ^{※/▲}	0.19±0.01	0.20±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01	0.26±0.01
异亮氨酸 Ile ^{※/▲}	0.17±0.01	0.19±0.01	0.22±0.01	0.25±0.01	0.25±0.01
亮氨酸 Leu ^{※/▲}	0.26±0.01	0.29±0.01	0.36±0.01	0.38±0.01	0.39±0.01
酪氨酸 Tyr [▲]	0.21±0.01	0.23±0.01	0.26±0.01	0.31±0.01	0.31±0.01
苯丙氨酸 Phe ^{※/▲}	0.15±0.01	0.15±0.01	0.19±0.01	0.23±0.01	0.22±0.01
赖氨酸 Lys ^{※/▲}	0.41±0.07	0.43±0.06	0.55±0.07	0.59±0.02	0.61±0.02
组氨酸 His [▲]	0.09±0.01	0.11±0.01	0.13±0.01	0.34±0.01	0.35±0.03
精氨酸 Arg [▲]	3.16±0.06	3.54±0.10	4.58±0.09	4.95±0.12	5.30±0.08
脯氨酸 Pro [○]	3.74±0.14	4.06±0.14	4.52±0.10	4.66±0.16	4.83±0.24
游离氨基酸总量 Total free amino acids	11.79±0.47	12.81±0.42	15.60±0.35	16.44±0.42	17.12±0.24
必需氨基酸总量 Total essential amino acids	1.67±0.11	1.80±0.11	2.19±0.13	2.33±0.08	2.38±0.05
必需氨基酸比例 Percentage of essential amino acids(%)	14.14	14.07	14.04	14.19	13.90
鲜味氨基酸比例 Percentage of umami amino acids(%)	2.65	2.56	2.46	2.49	2.50
苦味氨基酸比例 Percentage of bitter amino acids(%)	41.46	42.24	42.36	46.31	46.83
甜味氨基酸比例 Percentage of sweet amino acids(%)	55.89	55.20	52.56	51.20	50.66

※为必需氨基酸；▽为呈鲜味氨基酸；▲为呈苦味氨基酸；○为呈甜味氨基酸，下同

※ represents essential amino acids, ▽ represents umami amino acids, ▲ represents bitter amino acids, ○ represents sweet amino acids, the same as below

表2 冻融循环期间南极磷虾肉糜中游离氨基酸的TAV值
Tab.2 Taste activity values of free amino acids in minced Antarctic krill during freezing and thawing cycles

氨基酸 Amino acids	味道阈值 Taste threshold (mg/100 ml)	冻融循环次数 Freeze-thaw cycles				
		1	2	3	4	5
天冬氨酸 Asp [▽]	100	0.16	0.16	0.18	0.17	0.18
苏氨酸 Thr [○]	260	0.10	0.10	0.12	0.12	0.12
丝氨酸 Ser [○]	150	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21
谷氨酸 Glu [▽]	30	0.50	0.57	0.73	0.77	0.83
甘氨酸 Gly [○]	130	1.24	1.31	1.67	1.63	1.68
丙氨酸 Ala [○]	60	1.23	1.33	1.72	1.67	1.70
缬氨酸 Val [▲]	40	0.63	0.68	0.80	0.83	0.85
甲硫氨酸 Met [▲]	30	0.63	0.67	0.77	0.80	0.87
异亮氨酸 Ile [▲]	90	0.19	0.21	0.24	0.28	0.28
亮氨酸 Leu [▲]	190	0.14	0.15	0.19	0.20	0.21
苯丙氨酸 Phe [▲]	90	0.17	0.17	0.21	0.26	0.24
赖氨酸 Lys [▲]	50	0.82	0.86	1.10	1.18	1.22
组氨酸 His [▲]	20	0.45	0.55	0.65	1.70	1.75
精氨酸 Arg [▲]	50	6.32	7.08	9.16	9.90	10.60
脯氨酸 Pro [○]	300	1.25	1.35	1.51	1.55	1.61
总鲜味氨基酸 Total umami amino acids		0.66	0.73	0.91	0.94	1.01
总苦味氨基酸 Total bitter amino acids		9.34	10.36	13.12	15.14	16.01
总甜味氨基酸 Total sweet amino acids		3.98	4.27	5.23	5.18	5.32

3 结论

冻融循环对南极磷虾虾肉糜的滋味成分有显著的影响。随冻融循环次数的增加, ATP及其关联产物降解加剧, 呈鲜味的核苷酸含量逐渐减少, 呈苦味的核苷酸含量逐渐增加; 甜味氨基酸比例逐渐减小, 而苦味氨基酸的比例逐渐增大。因此, 在工业化生产和家庭日常消费时, 为了使南极磷虾虾肉糜保持较好的品质, 应尽可能减少冻融循环次数, 一般应控制在2次以内。

参 考 文 献

- Atkinson A, Siegel V, Pakhomov EA, *et al.* A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2009, 56(5): 727–740
- Anheller JE, Hellgren L, Karlstam B, *et al.* Biochemical and biological profile of a new enzyme preparation from Antarctic krill (*E. superba*) suitable for debridement of ulcerative lesions. *Archives of Dermatological Research*, 1989, 281(2): 105–110
- Ali S, Zhang WG, Rajput N, *et al.* Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of chicken breast meat. *Food Chemistry*, 2015, 173(8): 808–814
- Boonsumrej S, Chaiwanichsiri S, Tantratian S, *et al.* Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *Journal of Food Engineering*, 2007, 80(1): 292–299
- Chen QQ, Huang M, Zou YF, *et al.* Influence of irradiation and freeze-thawing cycles on myofibrillar protein oxidation and eating quality of beef. *Food Science*, 2014, 35(19): 1–5 [陈茜茜, 黄明, 邹玉峰, 等. 辐照和反复冻融对牛肉蛋白质氧化及食用品质的影响. *食品科学*, 2014, 35(19): 1–5]
- Cao R, Wang FY, Zhao L, *et al.* Qualitative changes of squid (*Loligo japonica*) under different frozen storage temperatures. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 97–103 [曹荣, 王凤玉, 赵玲, 等. 日本枪乌贼(*Loligo japonica*)不同温度冻藏过程中的品质变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 97–103]
- 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]
- Fang YD, Qiu XX, Chang SA, *et al.* Quality changes of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during chilled and ice storage. *Meat Research*, 2017, 31(7): 22–28 [方艺达, 裴肖霞, 常思盎, 等. 冷藏及冰藏条件下南美白对虾品质变化规律. *肉类研究*, 2017, 31(7): 22–28]
- Guo JY. Radio frequency thawing process of frozen pork. Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 [郭洁玉. 冻猪肉的射频解冻工艺. 江南大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Londahl G. Technological aspects of freezing and glazing shrimp. *INFOFISH International*, 1997, 3: 49–56
- Lee J, Fong Q, Park JW. Effect of pre-freezing treatments on the quality of Alaska pollock fillets subjected to freezing/thawing. *Food Bioscience*, 2016, 16: 50–55
- Liu X, Wang J, Zhang W, *et al.* Analysis of inosine monophosphate in six fish musculatures. *Marine Sciences*, 2008, 32(2): 22–24 [刘旭, 王军, 张纹, 等. 6种鱼类肌肉组织肌苷酸的检测分析. *海洋科学*, 2008, 32(2): 22–24]
- Morzell M, van de Vis H. Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture Research*, 2003, 34(1): 1–11
- Mesias M, Wagner M, George S, *et al.* Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2016, 34: 24–28
- 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. 南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 1–8]
- Özogul F, Özden Ö, Özoğul Y, *et al.* The effects of gamma-irradiation on the nucleotide degradation compounds in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Chemistry*, 2010, 122(3): 789–794
- Pacheco-Aguilar R, Marquez-Ríos E, Lugo-Sánchez ME, *et al.* Postmortem changes in the adductor muscle of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) during ice storage. *Food Chemistry*, 2008, 106(1): 253–259
- Qiao F, Huang LL, Fang CF, *et al.* Analysis of taste-related compounds and electronic tongue of nuomici lychee fruits from different planting area. *Food Research and Development*, 2013, 34(16): 62–66 [乔方, 黄略略, 方长发, 等. 不同产区糯米糍荔枝的滋味物质及电子舌分析. *食品研究与开发*, 2013, 34(16): 62–66]
- Qi J. Effects of repeated freeze-thaw cycles on goat quality. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 [戚军. 反复冻融对羊肉品质的影响研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Sriket P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Comparative studies on the effect of the freeze-thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle. *Food Chemistry*, 2007, 104(1): 113–121
- Srinivasan S, Xiong YL, Blanchard SP, *et al.* Effects of freezing and thawing methods and storage time on physicochemical properties of freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1998, 7(2): 47–68
- 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
- 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]
- Wang Y, Chen SS. Comparative composition of free amino acids in wild and cultured *Procambarus clarkii*. *Food Science*, 2014, 35(11): 269–273 [王曜, 陈舜胜. 野生与养殖克氏原螯虾游离氨基酸的组成及比较研究. *食品科学*, 2014, 35(11): 269–273]
- Xi F, Sun HM, Lee HY, *et al.* Effect of irradiation on the degradation of nucleotides in turkey meat. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 73: 88–94
- Yun SY, Qiu WQ, Jiang CY, *et al.* Comparison of flavor compounds in meat and head of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 907–918 [贡三月, 邱伟强, 蒋晨毓, 等. 凡纳滨对虾虾肉和虾头中风味物质的比较. *水产学报*, 2017, 41(6): 907–918]
- Zhou M, Wang AL, Xian JA. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Effects of continuous cold stress. *Aquaculture*, 2011, 317(1): 182–186
- Zhang RJ, Qiu WQ, Zhang MS, *et al.* Effects of different heating methods on the contents of nucleotides and related compounds in minced Pacific white shrimp and Antarctic krill. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 87: 142–150

(编辑 陈辉)

Effects of Freezing and Thawing Cycles on Taste Components of Minced Antarctic Krill

PAN Xiaoyang^{1,2,3}, YANG Linxin^{1,2,3}, WANG Xiaoyan^{1,2,3}, JIN Yinzhe^{1,2,3①}, CHENG Yudong^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai 201306; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering, Shanghai 201306)

Abstract Antarctic krill (*Euphausia superba*) stocks produce large biomasses and contain useful, high-quality proteins. Krill protein has been suggested to be a good source of protein for humans, due to its well-balanced amino acid composition and high biological value. In this study, minced Antarctic krill was studied. The effects of freezing and thawing cycles on changes in the content of adenosine triphosphate (ATP) and related compounds and free amino acids in minced Antarctic krill were investigated. Changes in taste components during freezing and thawing cycles were also analyzed. Results showed that with increasing freezing and thawing cycle times, the degradation of ATP and related compounds increased rapidly, the content of umami nucleotides gradually decreased, and the content of bitter nucleotides gradually increased. The flavor/bitter ratio was 3.32 at the first freeze-thaw cycle, and then after two freeze-thaw cycles the flavor/bitter ratio decreased significantly ($P < 0.05$). At the same time, the K value increased rapidly, which indicated that the freshness had dropped sharply. After a third freeze-thaw cycle, the K value increased significantly ($P < 0.05$). The K value was $(86.88 \pm 3.58)\%$ at the fourth freeze-thaw cycle, meaning that the minced Antarctic krill was no longer fresh. After the fourth freeze-thaw cycle, the K value did not significantly change. The total content of free amino acids increased as the number of freeze-thaw cycles increased. However, the proportional content of umami amino acids and sweet amino acids decreased, while that of bitter amino acids gradually increased. The total taste activity value of bitter amino acids was the highest during the freeze-thaw cycles, which indicated that bitter amino acids made the greatest contribution to the resultant taste. This led to the further deterioration of the taste components of minced Antarctic krill. Therefore, it was concluded that the number of freeze-thaw cycles should be controlled to be within two to better preserve the flavor of minced Antarctic krill.

Key words Antarctic krill; Freezing and thawing cycles; Taste components; Adenosine triphosphate (ATP) and related compounds; Free amino acids

① Corresponding author: JIN Yinzhe, E-mail: yzjin@shou.edu.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李健 LI Jian	李军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美国)CHEN Yong
林洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐跑 XU Pao
徐皓 XU Hao	黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 李健 LI Jian 孔杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第40卷 第2期 2019年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.40 No.2 Apr. 2019

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会
出版单位 **科学出版社**
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717
编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>
E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主编 金显仕
印刷 青岛国彩印刷有限公司
国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司
订购 全国各地邮政局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 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.yykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@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 986194