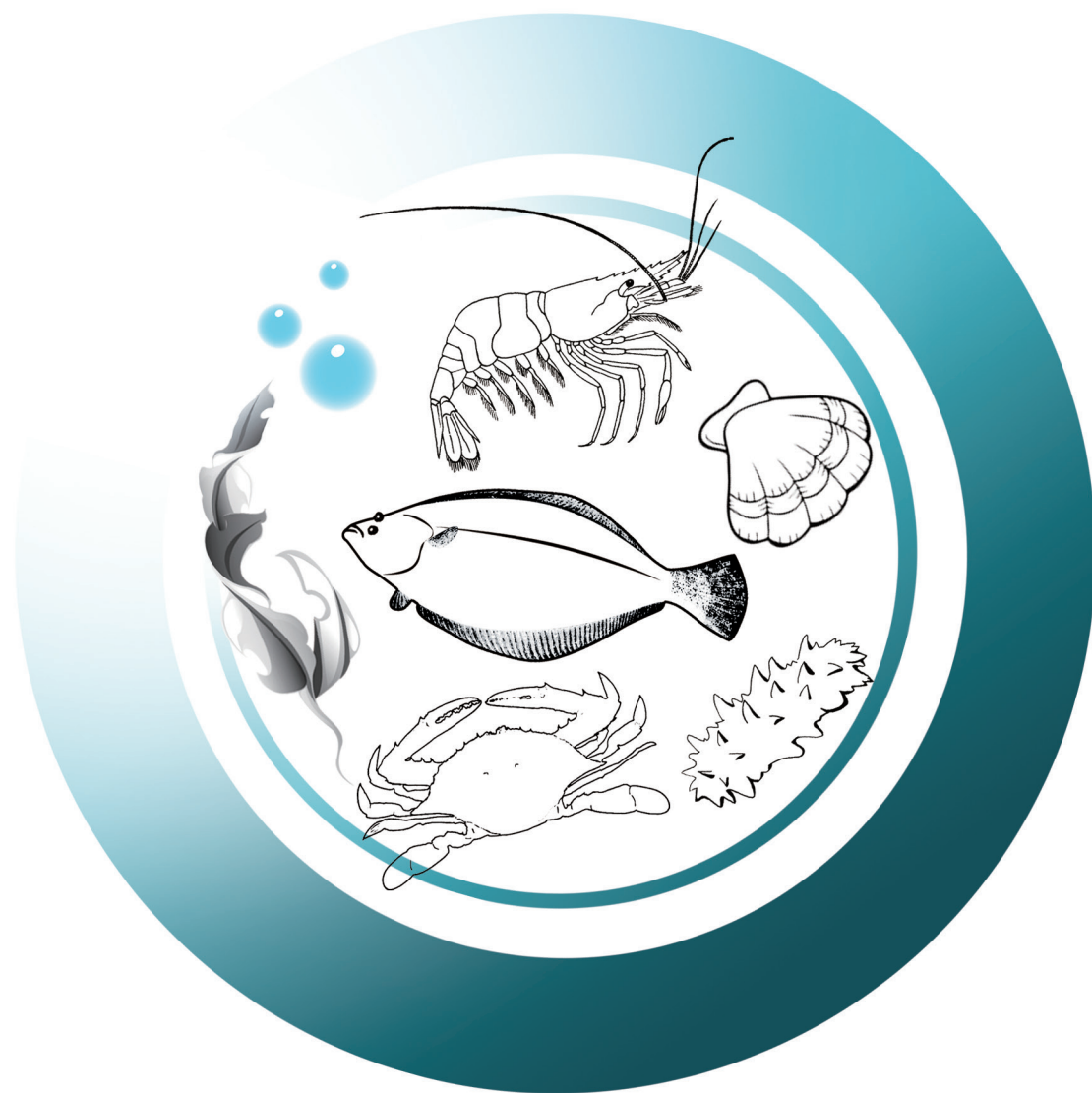


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第40卷 VOL.40 第6期 NO.6



中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

主办



科学出版社
Science Press

出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 40 卷 第 6 期

2019 年 12 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊

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

目 次

研究论文

- 海湾扇贝骨料不同替代率对人工鱼礁物理性能影响及碳汇作用分析.....史佰佰 公丕海 关长涛 赵荣荣 李 娇 (1)
- 长岛挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价.....赵荣荣 公丕海 张 艳 袁 伟 关长涛 史佰佰 谢振辉 李 娇 (9)
- 波浪作用下双层网底鲢鳙网箱水动力特性的数值模拟.....崔 勇 关长涛 黄 滨 李 娇 公丕海 (18)
- 基于稳定同位素技术的天津大神堂海域人工鱼礁区食物网结构研究.....张博伦 郭 彪 于 莹 徐晓甫 王 硕 (25)
- 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析.....田永胜 唐 江 马文辉 成美玲 李振通 吴玉萍 张晶晶 王林娜 庞尊方 王晓梅 翟介明 (36)
- 牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析.....王桂兴 张晓彦 孙朝徽 赵雅贤 都 威 侯吉伦 王玉芬 (48)
- 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响.....胡鹏莉 吴 瑞 鲁康乐 王 玲 宋 凯 张春晓 (56)
- 大菱鲆幼鱼对饲料中泛酸最适需求量的研究.....王雅平 李宝山 王际英 王成强 王晓艳 王丽丽 王世信 孙永智 郝甜甜 (66)
- 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼消化道组织结构和营养物质消化吸收的影响.....王 坛 赵金鑫 刘东来 孔 纯 华雪铭 吴 钊 王 刚 冯 悦 杨景丰 刘 韬 (76)
- BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲆的急性毒性效应.....迟 潇 夏 斌 朱 琳 陈碧鹃 孙雪梅 赵信国 唐学玺 曲克明 (88)
- 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析.....李炎璐 陈 超 陈建国 翟介明 (98)
- 中华绒螯蟹野生群体和不同水系人工选育群体的遗传多样性分析.....李晶晶 陈丽梅 耿绪云 董学旺 孙金生 (105)
- 池养中华绒螯蟹不同性别形态及质量差异分析.....唐永成 彭 姣 赵运林 徐正刚 丁 一 吴 良 (114)
- 魁蚶 Ets 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析.....魏智薪 辛鲁生 白昌明 李亚楠 张淑敏 李成华 王崇明 (121)
- 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆及其参与调控程序性细胞死亡研究.....张恒宇 柳逸群 葛 源 (131)
- 温度对浒苔生长及不同氮源吸收特性的影响.....葛红星 陈 钊 李 健 常志强 赵法箴 (138)
- 二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和油脂积累的影响.....岳陈陈 余旭亚 赵永腾 王惠萍 (145)
- 刺参养殖池塘中一株植物乳杆菌的分离及其生物学特性.....张永刚 李 彬 王印庚 王金燕 廖梅杰 张 正 宁鲁光 范瑞用 (154)
- 杂色角孔海胆形态学观察、亲缘关系及性腺营养成分分析.....赵文飞 李 喆 黄小芳 张 杨 丁 君 常亚青 (163)
- 中华鳖 GHITM cDNA 基因克隆及表达分析.....熊 钢 周先文 马 晓 曾 丹 陈贞年 康 骊 王晓清 (173)
- 装甲 RNA 在牡蛎中诺如病毒 4 种 RNA 提取方法比较研究中的应用.....曲 梦 江艳华 李风铃 姚 琳 逢凤娇 王联珠 翟毓秀 (180)
- 大菱鲆不同部位营养与质构品质分析评价.....邹朝阳 赵 峰 王 志 欧 帅 王 轰 李国栋 周德庆 (186)
- 低温冷藏对带鱼肌肉蛋白的影响.....沈 妮 吴甜甜 李 苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹 (196)
- 壳聚糖-柑橘精油微胶囊制备工艺优化及其在凡纳滨对虾保鲜中的应用.....姚洁玉 李 苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹 (203)
- 《渔业科学进展》2019 年第 40 卷总目录..... (210)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.40 No.6 December 2019

Influence of Different Replacement Rates of <i>Argopecten irradians</i> Aggregate on Physical Properties of Artificial Reefs and Carbon Sequestration	SHI Baibai, GONG Pihai, GUAN Changtao, ZHAO Rongrong, LI Jiao	(1)
Ecosystem Health Assessment of Artificial Reef Area in Long Island	ZHAO Rongrong, GONG Pihai, ZHANG Yan, YUAN Wei, GUAN Changtao, SHI Baibai, XIE Zhenhui, LI Jiao	(9)
Numerical Simulation of the Hydrodynamic Characteristics of Double-Bottom Cage for Flounder Fish Under Waves	CUI Yong, GUAN Changtao, HUANG Bin, LI Jiao, GONG Pihai	(18)
Study of the Food-Web Structure in the Dashentang Artificial Reef Area in Tianjin Using a Stable Isotope Technique	ZHANG Bolun, GUO Biao, YU Ying, XU Xiaofu, WANG Shuo	(25)
Development and Growth of Hybrid Offspring of Brown Grouper <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (♀) × Blue Speckled Grouper <i>Epinephelus tulcula</i> (♂) Using Cryopreserved Sperm	TIAN Yongsheng, TANG Jiang, MA Wenhui, CHENG Meiling, LI Zhentong, WU Yuping, ZHANG Jingjing, WANG Linna, PANG Zunfang, WANG Xiaomei, ZHAI Jieming	(36)
Genetic Analysis of Four Generations of a Successive Meiogynogenetic Population in the Japanese Flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SUN Zhaohui, ZHAO Yaxian, DU Wei, HOU Jilun, WANG Yufen	(48)
Effects of Replacing Fish Meal with Composite Protein on Growth, Diet Digestibility, and Gut Health in Japanese Seabass (<i>Lateolabrax maculatus</i>)	HU Pengli, WU Rui, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao	(56)
Study on the Optimum Dietary Pantothenic Requirement of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	WANG Yaping, LI Baoshan, WANG Jiyong, WANG Chengqiang, WANG Xiaoyan, WANG Lili, WANG Shixin, SUN Yongzhi, HAO Tiantian	(66)
Effects of Dietary Lysozyme on the Digestive Tract Structure and Nutrient Digestibility of GIFT Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	WANG Tan, ZHAO Jinxin, LIU Donglai, KONG Chun, HUA Xueming, WU Zhao, WANG Gang, FENG Yue, YANG Jingfeng, LIU Tao	(76)
Acute Toxicity of Four Polybrominated Diphenyl Ether Congeners to Marine Organisms: <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Daphnia magna</i> , and <i>Scophthalmus maximus</i>	CHI Xiao, XIA Bin, ZHU Lin, CHEN Bijuan, SUN Xuemei, ZHAO Xinguo, TANG Xuexi, QU Keming	(88)
DNA Methylation Analysis of <i>Epinephelus moara</i> , <i>Epinephelus lanceolatus</i> and Their F ₁ Hybrid	LI Yanlu, CHEN Chao, CHEN Jianguo, ZHAI Jieming	(98)
Genetic Diversity Analysis of Wild and Cultured Population of <i>Eriocheir sinensis</i> from Different Water Systems	LI Jingjing, CHEN Limei, GENG Xuyun, DONG Xuewang, SUN Jinsheng	(105)
Morphological Attributes and Quality Parameters of Different Sexes of <i>Eriocheir sinensis</i> Cultured in a Pond	TANG Yongcheng, PENG Jiao, ZHAO Yunlin, XU Zhenggang, DING Yi, WU Liang	(114)
Cloning of Nine Genes in the Ets Family of Ark Clam (<i>Scapharca broughtonii</i>) and Their Expression in Response to Oyster Herpes Virus (OsHV-1) Infection	WEI Zhixin, XIN Lusheng, BAI Changming, LI Yanan, ZHANG Shumin, LI Chenghua, WANG Chongming	(121)
Cloning of the Metacase Type I Gene of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> and Its Involvement in the Regulation of Programmed Cell Death	ZHANG Hengyu, LIU Yiqun, GE Yuan	(131)
Effects of Temperature on the Growth Rate and Nitrogen Uptake of <i>Ulva prolifera</i>	GE Hongxing, CHEN Zhao, LI Jian, CHANG Zhiqiang, ZHAO Fazhen	(138)
Effects of Butylated Hydroxytoluene on Accumulation of Astaxanthin and Lipids in <i>Haematococcus pluvialis</i> LUGU	YUE Chenchen, YU Xuya, ZHAO Yongteng, WANG Huiping	(145)
Screening and Characteristic Analysis of <i>Lactobacillus plantarum</i> from Ponds for Sea Cucumber Farming	ZHANG Yonggang, LI Bin, WANG Yingeng, WANG Jinyan, LIAO Meijie, ZHANG Zheng, NING Luguang, FAN Ruiyong	(154)
Morphological Observation, Relationship and Nutritional Composition Analysis of Gonadal of <i>Salmacis sphaeroides variegata</i>	ZHAO Wenfei, LI Zhe, HUANG Xiaofang, ZHANG Yang, DING Jun, CHANG Yaqing	(163)
Molecular Cloning and Expression Analysis of <i>HG1TM</i> cDNA in <i>Trionyx sinensis</i>	XIONG Gang, ZHOU Xianwen, MA Xiao, ZENG Dan, CHEN Zhennian, KANG Li, WANG Xiaoqing	(173)
Application of Armored RNA to Compare Four Norovirus RNA Extraction Methods in Oysters	QU Meng, JIANG Yanhua, LI Fengling, YAO Lin, PANG Fengjiao, WANG Lianzhu, ZHAI Yuxiu	(180)
Analysis and Evaluation of Nutrition and Texture Quality in Different Parts of Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	ZOU Zhaoyang, ZHAO Feng, WANG Zhi, OU Shuai, WANG Hong, LI Guodong, ZHOU Deqing	(186)
Effect of Chilling Storage on the Muscle Protein of Hairtail	SHEN Ni, WU Tiantian, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin	(196)
Optimization of Chitosan-Citrus Essential Oil Microcapsules for Application in the Preservation of <i>Litopenaeus vannamei</i>	YAO Jieyu, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin	(203)
Total Contents of <i>PROGRESS IN FISHERY SCIENCES</i> , Vol. 40, 2019		(210)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181222002

http://www.yykxjz.cn/

史佰佰, 公丕海, 关长涛, 赵荣荣, 李娇. 海湾扇贝骨料不同替代率对人工鱼礁物理性能影响及碳汇作用分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 01-08

Shi BB, Gong PH, Guan CT, Zhao RR, Li J. Influence of different replacement rates of *Argopecten irradians* aggregate on physical properties of artificial reefs and carbon sequestration. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 01-08

海湾扇贝骨料不同替代率对人工鱼礁 物理性能影响及碳汇作用分析*



史佰佰^{1,3} 公丕海^{2,3} 关长涛^{2,3} 赵荣荣^{3,4} 李 娇^{2,3①}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
青岛 266071; 4. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316000)

摘要 本研究在抗压强度为 C25 的普通混凝土配合比的基础上, 采用粗、细扇贝壳对混凝土中的天然骨料部分替代, 并对扇贝壳混凝土配合比进行了研究, 比较了粗、细扇贝壳替代天然骨料混凝土的工作性能和基本力学性能, 并根据山东省 2016~2020 年的投礁计划, 对利用扇贝壳替换人工鱼礁混凝土中天然骨料的固碳潜能及可清理的废弃扇贝壳堆积面积进行估算。结果显示, 随着扇贝壳替换天然骨料比例的增加, 混凝土的塌落度呈降低趋势。粗扇贝壳替换天然粗骨料混凝土较细扇贝壳替换天然细骨料混凝土的塌落度降幅大; 粗扇贝壳替代混凝土中的天然石时, 扇贝壳混凝土的抗压性能与基准混凝土基本接近, 粗扇贝壳的最佳替代率为 40%, 28 d 抗压强度较基准混凝土提高了 7.3%。用细扇贝壳替代混凝土中的天然砂时, 可使混凝土的抗压性能较基准混凝土提高幅度较大, 最佳替代率为 60%, 28 d 抗压强度较基准混凝土提高了 33.5%; 以细扇贝壳替换混凝土天然细骨料替换率为 50%~70%估算, 山东省 2016~2020 年计划新建的 2043 万空方人工鱼礁均用此种混凝土制作, 可实现礁体固碳量 27.54~38.56 万 t, 可减少废弃贝壳陆地堆积面积 5.89~8.24 km², 具有很高的生态潜能。

关键词 人工鱼礁; 海湾扇贝壳; 抗压强度; 塌落度; 固碳潜能

中图分类号 X835 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0001-08

人工鱼礁投放是海洋牧场建设的一项基础工程, 具有海洋生态调控、海洋生境修复和增殖渔业资源等功能。自 20 世纪 50 年代以来, 全球沿海国家陆续将人工鱼礁作为渔业资源养护的重要措施, 开始人工鱼礁的建设, 并在人工鱼礁材料、结构、布局等方

面开展了一系列研究(朱燮昌等, 1987; 郑延璇, 2014; 周艳波等, 2012)。相关研究和应用实践表明, 不同材料人工鱼礁所产生的生态效益和经济效益具有明显差异。据不完全统计, 已经用于建造人工鱼礁的材料超过 249 种(Baine *et al*, 2001), 主要有天然材料、废

* 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0501)资助 [This work was supported by the Marine Science and Technology Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0501)]. 史佰佰, E-mail:853767306@qq.com

① 通讯作者: 李 娇, 高级工程师, E-mail:lijiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-12-22, 收修改稿日期: 2019-03-05

废弃物材料、建筑材料、综合材料等几大类。混凝土作为人工鱼礁的基础材料,具有耐久性、可塑性、无毒性等优点而被广泛应用。通过利用废弃材料,如建筑垃圾(Behera *et al*, 2014)、钢铁废料(Shi *et al*, 2008)、农业废料(Prusty *et al*, 2015)对混凝土中的传统材料进行替换,可实现废物利用并节约自然资源的目的。近年来,国内学者对人工鱼礁的研究从礁型优化设计和人工鱼礁的环境功能向礁体混凝土材料添加物方向延伸。李琳琳等(2012)以钢尾渣为主要原料开发出了C50以上的较高强度的混凝土,用以制备大体积、大孔洞率和形状复杂的人工鱼礁。于森等(2012)以石英岩型齐大山铁尾矿为主要原料,进行了鱼礁混凝土制备的研究,通过强度测试和强度效应机理分析,评估了齐大山铁尾矿制作人工鱼礁材料的可行性。除能实现废物利用,礁体材料还能实现碳封存。李娇等(2016)通过利用在混凝土礁体材料中添加农渔生产中废弃物秸秆和贝壳,探讨增加礁体自身碳封存作用的可行性和潜能。中国是贝类养殖大国,2017年贝类产量高达1528.09万t(农业农村部渔业局,2018),但对于贝类利用多局限于可食用部分,而对壳体部分利用的比较少。贝类壳体的形成是钙化作用的结果,贝类通过钙化作用可以将海水中的碳酸氢根转换成碳酸钙贝壳,从而能固定大量的C。沈新强等(2011)研究表明,长江口人工牡蛎礁通过牡蛎(*Ostrea gigas*)的钙化过程,单位面积年固碳量为2.70 kg/m²,年平均固碳量达3.33 × 10⁴ t。公丕海等(2014)研究表明,2009~2013年山东莱州金城湾海域64.25 hm²海洋牧场圆管形礁体上附着的牡蛎总固碳量约为297.5 t,将贝壳作为人工鱼礁混凝土的原料,来实现礁体材料的碳汇功能对废弃物资源利用具有重要生态意义。本研究以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)壳体为骨料,进行了制备鱼礁混凝土的研究,通过抗压强度测试和抗压强度效应机理分析,评估了扇贝壳作为人工鱼礁混凝土材料的可行性,对比了扇贝壳分别替换混凝土天然粗、细骨料的工作性能和抗压性能,并利用2016~2020年山东省计划投礁量对扇贝壳作为混凝土骨料的人工鱼礁固碳潜能进行了估算。

1 材料与方法

1.1 原材料

水泥:青岛山水创新水泥有限公司生产P·O 42.5级水泥;细骨料:青岛市胶南产的中砂,细度模数为2.7,含泥量为2.9%;粗骨料:青岛兴华建筑集团有限公司石场,5~20 mm连续级配碎石;扇贝壳:2018年山东莱州湾新产扇贝经去壳深加工所得的扇贝壳。扇

贝壳经破碎后由振动分筛机筛选出不同的粒径组。替换天然细骨料的扇贝壳粒径为1~5 mm连续级配(图1),替换天然粗骨料的扇贝壳粒径为5~20 mm连续级配(图2);水:青岛市黄岛区自来水。



图1 扇贝壳细骨料

Fig.1 Fine aggregate of scallop shell



图2 扇贝壳粗骨料

Fig.2 Coarse aggregate of scallop shell

1.2 实验内容与方法

1.2.1 配合比 人工鱼礁混凝土的强度不应低于C20。本研究基准混凝土强度设计为C25,在不添加任何活性掺合料的前提下,使用粗、细扇贝壳分别替代天然粗、细骨料。粗扇贝壳替代天然粗骨料的替代率分别为20%、40%、60%,细扇贝壳替代天然细骨料的替代率分别为20%、40%、60%、80%、100%。具体配合比见表1。其中,P为基准混凝土,C为扇贝壳粗骨料混凝土,X为扇贝壳细骨料混凝土,下同。

1.2.2 混凝土塌落度测量、试块的制备与抗压性能测试 混凝土试块的制作应符合相关标准(中华人民共和国建设部等,2010),按照表1的配合比采用强制式搅拌机搅拌物料,搅拌充分后,用混凝土塌落度仪测出塌落度,之后入模成型,模具尺寸为100 mm×100 mm×100 mm,然后放置于振实台振实,每个配合比制作

表 1 混凝土配合比
Tab.1 Mix proportions of concrete

编号 Number	水灰比 Water cement ratio	细骨料替代率 Fine aggregate substitution rate (%)	粗骨料替代率 Coarse aggregate substitution rate (%)	每立方米扇贝壳混凝土材料用量 Amount of concrete per cubic meter of scallop shell (kg)					
				水泥 Cement	水 Water	砂 Sand	石 Stone	细扇贝壳 Fine scallop shell	粗扇贝壳 Coarse scallop shell
P	0.54	0	0	371	200	697.0	887.0	0	0
C-1	0.54	0	20	371	200	697.0	709.6	0	177.4
C-2	0.54	0	40	371	200	697.0	532.2	0	354.8
C-3	0.54	0	60	371	200	697.0	354.8	0	532.2
X-1	0.54	20	0	371	200	557.6	887.0	139.4	0
X-2	0.54	40	0	371	200	418.2	887.0	278.8	0
X-3	0.54	60	0	371	200	278.8	887.0	418.2	0
X-4	0.54	80	0	371	200	139.4	887.0	557.6	0
X-5	0.54	100	0	371	200	0	887.0	697.0	0

3 组试块, 分别用于 3、7、28 d 抗压强度检测。振实后放入温度为(20±1)℃、相对湿度不低于 90% 的标准养护条件下进行养护, 成型 24 h 后拆模, 继续在标准养护条件下进行养护至一定龄期。采用 WES-1000B 万能材料试验机对各龄期试块进行抗压强度测试。根据上述标准, 当采用非标准尺寸试件时, 应将其抗压强度乘以尺寸换算系数, 折算成边长为 150 mm 的标准尺寸试件抗压强度, 当试件边长为 100 mm 时, 折算系数为 0.95。本研究试件边长为 100 mm, 需将抗压强度结果乘以 95% 算成标准尺寸试件抗压强度。

1.2.3 扇贝壳礁体材料固碳潜能估算 贝类外壳的形成是钙化作用的结果。贝类通过钙化作用可以将海水中的碳酸氢根转换成碳酸钙, 从而能固定大量的 C。利用扇贝壳对礁体材料中天然的粗、细骨料进行替换, 可以增强人工鱼礁的固碳潜能。参考李娇等(2016)对人工鱼礁材料添加物固碳量的计算公式, 可以对利用扇贝壳替换天然骨料的人工鱼礁固碳量进行估算, 计算公式如下:

$$C_T = M \times C_R$$

将扇贝壳用于人工鱼礁材料, 可有效提高废弃贝壳的利用率, 减少了由贝壳大量堆积和老化分解所产生的环境问题。参考王莲莲等(2015)对贝壳礁生态效应的估算方法, 对利用扇贝壳替换人工鱼礁天然骨料可清理的废弃贝壳堆积填埋面积进行估算, 计算公式如下:

$$S = M / (\rho \times h)$$

式中, C_T 为礁体总固碳量, C_R 为礁体添加物碳含量, S 为可清理的贝壳陆地堆积面积, M 为扇贝壳骨料重量, ρ 为扇贝壳的堆积密度, 取 404.4 kg/m³ (王洪瑞等, 2006), h 为扇贝壳的堆积高度, 取 $h = 1$ m

(王莲莲等, 2015)。

1.2.4 数据处理与分析 采用 SPSS 22.0 软件的单因素方差(One-way ANOVA)对海湾扇贝壳混凝土各个养护龄期的抗压强度进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 工作性能

塌落度常用来判定新拌混凝土的和易性, 又称工作性能。不同掺量扇贝壳对混凝土塌落度的影响见表 2。从表 2 可以看出, 在拌合用水量相同的前提下, 随着扇贝壳的掺量增加, 混凝土的塌落度呈降低的趋势。当粗骨料替代率分别为 20%、40%、60% 时, 塌落度较基准混凝土分别降低了 43.3%、50.7%、82.1%, 混凝土塌落度迅速下降; 当细骨料替代率为 20%、40%、60%、80%、100% 时, 塌落度较基准混凝土分别降低了 16.4%、23.1%、33.6%、67.1%、87.3%。当细扇贝壳替代率 < 60% 时, 混凝土的塌落度降幅较小, 当替代率 > 60% 时, 混凝土的塌落度降幅较大。

2.2 扇贝壳的掺量对混凝土抗压性能的影响

从图 3、图 4 可以看出, 粗、细扇贝壳对基准混凝土粗、细骨料替代后, 随着对天然骨料替代率的增加, 其各龄期抗压强度均呈先增大后减小趋势。使用粗扇贝壳替代基准混凝土中的粗骨料, 当替代率分别为 20%、40% 时, 其 3、7、28 d 抗压强度与基准混凝土接近, 呈略微上升趋势。当替代率为 40% 时, 扇贝壳混凝土各龄期抗压强度达到最大值, 28 d 抗压强度较基准混凝土提高 7.3%。当替代率为 60% 时, 扇贝

表2 塌落度值
Tab.2 Slump value

项目 Items	编号 Number								
	P	C-1	C-2	C-3	X-1	X-2	X-3	X-4	X-5
塌落度 Slump (mm)	134	76	66	24	112	103	89	43	17
塌落度降幅 Decrease ratio of slump (%)	—	43.3	50.7	82.1	16.4	23.1	33.6	67.1	87.3

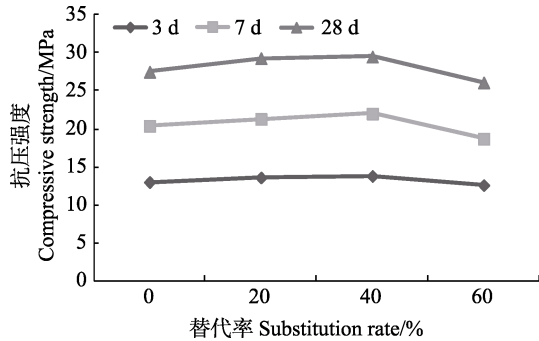


图3 粗扇贝壳不同替代率对抗压强度的影响

Fig.3 Effect of different replacement rates of coarse scallop shells on compressive strength

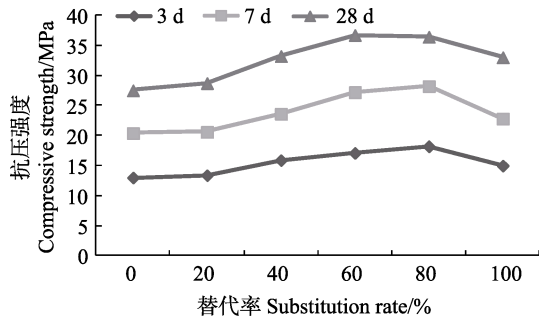


图4 细扇贝壳不同替代率对抗压强度的影响

Fig.4 Effect of different substitution rates of fine-shell on compressive strength

壳混凝土各龄期抗压强度均低于基准混凝土。总体来说,当用扇贝壳替代粗骨料替代率 $< 60\%$,对混凝土抗压性能影响不明显,但当替代率 $> 40\%$ 时,混凝土的抗压性能呈下降趋势;用细扇贝壳替代基准混凝土中的细骨料,当替代率为 20% 时,其 3 、 7 d抗压强度与基准混凝土接近, 28 d抗压强度大于基准混凝土。当替代率分别为 40% 、 60% 时,其各龄期抗压强度较基准混凝土提高很多,且增速较快。当替代率为 60% 时, 28 d抗压强度达到最大值,较基准混凝土提高 33.5% 。当替代率为 80% 时, 3 、 7 d抗压强度达到最大值,但 28 d抗压强度较替代率为 60% 时有所下降。当替代率为 100% 时,各龄期抗压强度下降迅速,其 3 、 7 d抗压强度与基准混凝土接近, 28 d抗压强度仍略高于基准混凝土。

2.3 扇贝壳骨料人工鱼礁固碳能力估算

通过对比扇贝壳替代天然骨料混凝土的工作性

能和抗压性能,扇贝壳替代细骨料混凝土的效果明显,均优于扇贝壳替代粗骨料的混凝土,当细骨料替代率为 60% 时,混凝土 28 d抗压性能最优,且工作性能良好。在保证较强抗压性能和较优工作性能的前提下,选取扇贝壳对细骨料的替代率为 50% ~ 70% 时,对人工鱼礁的固碳潜能进行估算。

2014年山东省海洋与渔业厅发布的《山东省人工鱼礁建设规划》计划在2016~2020年间新建礁群31个,新建人工鱼礁2043万空方,其中,以混凝土构件礁为主。郑延璇等(2014)对山东省常用的4种混凝土构件礁的流体效应和物理稳定性进行了研究,结果显示,其物理稳定性良好,适宜推广应用。通过计算可知,建造礁型为这4种的人工鱼礁每空方所利用混凝土体积的平均值为 0.334 m^3 (表3)(以 10 m 水深投放为例),那么建造2043万空方的人工鱼礁大概需要混凝土 683 万 m^3 。

如果2016~2020年计划投放2043万空方的人工鱼礁均采用扇贝壳部分替换细骨料的混凝土,可对人工鱼礁的总固碳量和可清理的陆地贝壳总堆积面积进行估算(表4)。李娇等(2016)利用元素分析仪测得海湾扇贝壳体C含量平均值为 11.57% 。当细扇贝壳的细骨料替代率为 50% 时,单位体积(m^3)混凝土所利用扇贝壳的重量为 0.349 t ,总利用重量为 238.37 万 t ,单位体积(m^3)礁体混凝土的平均固碳量为 $4.03 \times 10^{-2} \text{ t}$,总固碳量为 27.54 万 t ,可清理的废弃贝壳落地堆积面积为 5.89 km^2 。当细扇贝壳的细骨料替代率为 70% 时,每立方米混凝土所利用扇贝壳的重量为 0.488 t ,总利用重量为 333.30 万 t ,单位体积(m^3)的礁体混凝土的平均固碳量为 $5.65 \times 10^{-2} \text{ t}$,总固碳量为 33.56 万 t ,可清理的废弃贝壳落地堆积面积为 8.24 km^2 。

3 讨论与分析

本研究中,塌落度是评价新拌扇贝壳混凝土工作性能的主要指标。本研究结果表明,新拌扇贝壳混凝土的工作性能随替代率的增加而降低。Bentz等(1999)研究表明,贝壳砂的吸水率大约是天然砂的 3.2 倍,是由贝壳表面的不规则性和其表面存在大量的气孔造成的,在制备混凝土的过程中,这些内部气孔吸收了水分,降低了混凝土的流动性,流动时的内应力

表 3 山东省常用礁型参数
Tab.3 Reef type parameters commonly used in Shandong Province

礁型 Reef type	空方体积 Empty the volume (m ³ ·空)	混凝土体积 Volume of concrete (m ³)	每空方混凝土体积 Volume of concrete per empty square meter (m ³)	每空方混凝土体积平均值 Average volume of concrete used per cubic meter (m ³)
圆管型 Circular tube type	0.196	0.070	0.357	
等边三角形型 Equilateral triangle type	5.716	2.781	0.487	0.334
镂空方型 Hollow square type	0.256	0.069	0.270	
中空立方体型 Hollow cube type	3.375	0.692	0.205	

表 4 利用 2016~2020 年山东省计划投礁量对扇贝壳作为骨料的人工鱼礁的效益预测
Tab.4 The evaluation ecological effects of scallop shells as aggregates on artificial reefs by using
the planned amount of reefs in Shandong Province from 2016 to 2020

替换率 Substitution rate (%)	每立方米混凝土 扇贝壳质量 Concrete scallop shell mass per cubic meter (t)	扇贝壳总利用质量 Total utilization mass of scallop shell (× 10 ⁴ t)	每立方米混凝土固碳量 Carbon sequestration per cubic meter of concrete (t)	总固碳量 Total amount of carbon sequestration (× 10 ⁴ t)	陆地堆积面积 Land accumulation area (km ²)
50	0.349	238.37	4.03×10 ⁻²	27.54	5.89
70	0.488	333.30	5.65×10 ⁻²	38.56	8.24

增加,从而影响了混凝土的和易性。扇贝壳作为骨料替代天然骨料后,使得粗、细骨料的总表面积增大,在水泥浆用量一定的情况下,骨料表面包裹的浆量减薄,润滑作用下降,使混凝土流动性降低(Adewuyi *et al.*, 2008)。新拌扇贝壳混凝土的工作性能还受扇贝壳粒径大小的影响(Uchechi *et al.*, 2018)。通过对比可知,使用细扇贝壳替代的混凝土工作性能优于粗扇贝壳替代的混凝土,因为粗扇贝壳为粒径较大、形状不规则、程度高的薄片状,且表面粗糙的纹理比较多,增大了骨料之间的摩擦力,从而不利于混凝土的流动,而细扇贝壳粒径较小,且形状规则,与河砂能形成良好的级配,对混凝土的流动性影响小于粗骨料扇贝壳替代天然骨料。

混凝土的抗压强度影响因素有很多,诸如水胶比、水泥的强度、集料的优劣等(刘艳辉等, 2015)。用扇贝壳替代混凝土中的天然骨料,混凝土的抗压性能有所增加,说明扇贝壳具有一定的硬度,能够作为骨料起到支撑作用。用扇贝壳替代基准混凝土中的粗骨料时,由于粗扇贝壳呈粒径较大的片状且密度小于天然石,使得粗骨料的比表面积增大,需要更多的水泥来包裹粗骨料,否则就会离析,Nguyen 等(2013)研究表明,在实际生产中可适当提高水泥的使用量,来提高贝壳混凝土的抗压性能。当替代率 < 40%时,混凝土的各龄期抗压强度有所提高但差异不显著

($P>0.05$) (图 5), 当替代率 > 40%时, 混凝土 7、28 d 抗压强度显著下降($P<0.05$), 因此, 建议扇贝壳作为粗骨料时替代率不应超过 40%; 用细扇贝替代混凝土中的天然细骨料, 当替代率为 40%~60%时, 混凝土各龄期抗压强度较基准混凝土均有提高, 差异显著($P<0.05$) (图 6), 这是因为细扇贝壳形状规则且与天然砂形成良好的级配, 能更好地填充粗骨料之间的孔隙, 这与 Wang 等(2013)的研究结果相似。同时, 在制备细扇贝壳骨料时, 有大量的扇贝粉被保留了下来, 可以作为胶凝材料的一部分, 在用水量不变的前提下, 水胶比变小, 也使得混凝土的抗压强度增加。但当替代率 > 60%时, 由于细骨料的比表面积进一步增大, 没有足够水泥对其包裹, 所以, 抗压强度呈下降趋势。当替代率分别为 80%、100%时, 虽抗压强度较基准混凝土仍有一定的提高, 但差异不显著($P>0.05$)且工作性能非常差, 所以, 扇贝壳作为细骨料时的最佳替代率为 60%。

本研究以山东省为例, 对利用扇贝壳作替代部分天然骨料建造人工鱼礁的固碳潜能以及可清理的废弃贝壳堆积面积进行了估算, 估算出可实现礁体固碳量 27.54~38.56 万 t, 可减少废弃贝壳陆地堆积面积 5.89~8.24 km²。可见, 利用废弃贝壳作为骨料建造人工鱼礁, 无论是在解决废弃贝壳老化、分解污染环境 and 堆积占地等方面, 还是在提高人工鱼礁礁体

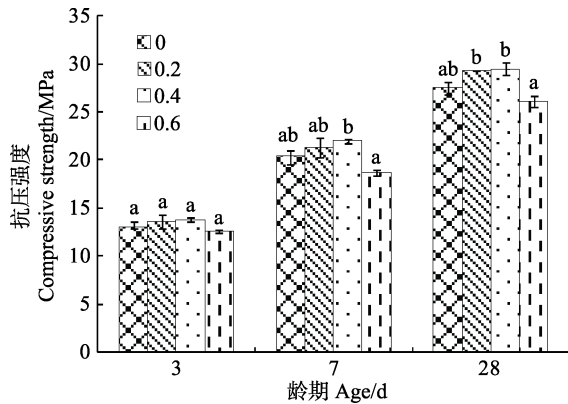


图5 各龄期粗扇贝壳不同替代率对抗压强度的影响

Fig.5 Effect of different replacement rates of coarse scallop on the compressive strength at different ages

图柱不同字母表示各龄期内差异显著, 下同
Significant difference at different ages are indicated by different letters above bars, the same as below

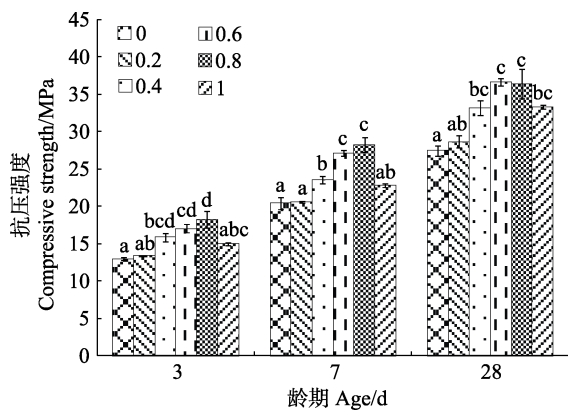


图6 各龄期细扇贝壳不同替代率对抗压强度的影响

Fig.6 Effect of different replacement rates of fine-shell on the compressive strength at different ages

固碳潜能方面作用都是巨大的。王莲莲等(2015)估算出利用 2012 年我国所产生的废弃贝壳可建造单体贝壳礁 338.9 万个, 可实现平均生态系统服务价值达 1653 万元/(km²·a), 可清理陆地废弃贝壳堆积面积 803.1 km²。李娇等(2016)通过将废弃扇贝以扇贝粉的形式添加到圆管型礁中, 估算出单位实验礁可实现最大固碳量为 260.33 kg。与以上 2 个研究不同的是本研究将扇贝壳以骨料的形式添加到人工鱼礁中, 满足了不同构型礁体的建设要求, 也丰富了建造人工鱼礁利用废弃贝壳的方式。

4 小结

本研究结果显示, 用海湾扇贝壳替换部分骨料的混凝土的抗压强度能够达到人工鱼礁建设标准(山东省质量技术监督局, 2014), 可用于人工鱼礁建设。随

着扇贝壳替换天然骨料的比例增加, 混凝土的拌合性降低, 但用细扇贝壳替代混凝土的塌落度下降速度低于粗扇贝壳替代, 工作性能相对于粗扇贝壳较好; 用粗扇贝壳替代混凝土中的天然石时, 扇贝壳混凝土的抗压性能与基准混凝土基本接近, 扇贝壳作为粗骨料的最佳替代率为 40%, 28 d 抗压强度较基准混凝土提高 7.3%。而用细扇贝壳替代天然砂时, 可使混凝土的抗压性能较基准混凝土提高很多, 最佳替代率为 60%, 28 d 抗压强度较基准混凝土提高 33.5%。由实验结果可以看出, 扇贝壳作为细骨料替代对混凝土强度的影响大于扇贝壳作为粗骨料替代。

山东省 2016~2020 年计划新建礁群 31 个, 新建人工鱼礁 2043 万空方。如果这些礁体均采用扇贝壳替代部分天然骨料的混凝土, 可实现礁体材料固碳量 27.54~38.56 万 t, 可减少废弃贝壳陆地堆积面积 5.89~8.24 km²。本研究验证了扇贝壳替代混凝土骨料的可行性, 为生态型人工鱼礁材料的开发提供了依据, 为通过将废弃扇贝壳添加到人工鱼礁中来实现对废弃物资源中 C 的封存提供了有效的方法。同时, 将扇贝壳以骨料的形式添加到人工鱼礁中实现了废物再利用, 降低了制礁成本, 减少了因开采天然骨料对环境造成的破坏, 既具有生态价值也有经济价值。

参 考 文 献

- Adewuyi AP, Adegoke T. Exploratory study of periwinkle shells as coarse aggregates in concrete works. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2008, 3(6): 1-5
- Baine M. Artificial reefs: A review of their design, application, management and performance. *Ocean and Coastal Management*, 2001, 44(3): 241-259
- Behera M, Bhattacharyya SK, Minocha AK, *et al.* Recycled aggregate from C and D waste and its use in concrete—a breakthrough towards sustainability in construction sector: A review. *Construction and Building Materials*, 2014, 68: 501-516
- Bentz D, Psuyder KA. Protected paste volume in concrete extension to internal curing using saturated lightweight fine aggregate. *Cement and Concrete Research*, 1999, 2(11): 1863-1867
- Department of Oceanography and Fisheries of Shandong Province. Construction planning of artificial reef in Shandong Province. (2016-2020). *Shandong Fisheries*, 2014, 34(10): 1-7 [山东省海洋与渔业厅. 山东省海洋牧场建设规划(2016-2020). *齐鲁渔业*, 2014, 34(10): 1-7]
- Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture. Chinese fishery yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2018 [农业农村部渔业局. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- Gong PH, Li J, Guan CT, *et al.* Estimation and experiment of carbon sequestration by oysters attached to the enhancement

- artificial reefs in Laizhou Bay. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(10): 3032–3038 [公丕海, 李娇, 关长涛, 等. 莱州湾增殖礁附着牡蛎的固碳量试验与估算. *应用生态学报*, 2014, 25(10): 3032–3038]
- Li J, Gong PH, Guan CT, *et al.* Carbon sequestration of additives of artificial reefs and its effect on carbon fixation of *Ostrea plicatula* gmelin. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 100–104 [李娇, 公丕海, 关长涛, 等. 人工鱼礁材料添加物碳封存能力及其对褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)固碳量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 100–104]
- Li LL, Li XY, Su XW, *et al.* High strength artificial reef concrete with steel slag. *Metal Mine*, 2012, 41(3): 158–162 [李琳琳, 李晓阳, 苏兴文, 等. 钢渣制备高强度人工鱼礁混凝土. *金属矿山*, 2012, 41(3): 158–162]
- Liu YH. Factors analysis of concrete compressive strength. *Journal of Hunan City University(Natural Science)*, 2015, 24(3): 39–40 [刘艳辉. 混凝土抗压强度的影响因素研究. *湖南城市学院学报(自然科学版)*, 2015, 24(3): 39–40]
- Ministry of Construction of the People's Republic of China, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. *Standards for Testing and Assessing Concrete Strength (GB50107-2010)*. Beijing: China Construction Industry Press, 2010 [中华人民共和国建设部, 国家质量监督检验检疫总局. *混凝土强度检验评定标准(GB50107-2010)*. 北京: 中国建筑工业出版社, 2010]
- Nguyen DH, Sebaibi N, Boutouil M, *et al.* The use of seashell by-products in pervious concrete pavers. *Engineering and Technology International Journal of Civil*, 2013, 7(11): 850–857
- Prusty JK, Patro SK. Properties of fresh and hardened concrete using agrowaste as partial replacement of coarse aggregate—a review. *Construction and Building Materials*, 2015, 82(6): 101–113
- Shandong Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. *Artificial reef construction technical specifications*, 2014 [山东省质量技术监督局. *人工鱼礁家设计书规范*, 2014]
- Shen XQ, Quan WM, Yuan Q. Restoration and assessment of carbon sink potential for aintertidal oyster reef in the Yangtze River estuary, China. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(10): 2119–2123 [沈新强, 全为民, 袁琪. 长江口牡蛎礁恢复及碳汇潜力评估. *农业环境科学学报*, 2011, 30(10): 2119–2123]
- Shi CJ, Meyer C, Behnood A. Utilization of copper slag in cement and concrete. *Resources, Conservation and Recycling*, 2008, 52(10): 1115–1120
- Uchechi G, Eziefula, John C, *et al.* Properties of seashell aggregate concrete: A review. *Construction and Building Materials*, 2018, 192(3): 287–300
- Wang HR, Wu MY, Ma KW, *et al.* Technology of culturing sea cucumber with scallop shell bagged reef. *Shandong Fisheries*, 2006, 23(12): 26 [王洪瑞, 吴明月, 马克武, 等. 扇贝壳装袋筑礁养殖刺参技术. *齐鲁渔业*, 2006, 23(12): 26]
- Wang HY, Kuo WT, Lin C, *et al.* Study of the material properties of fly ash added to oyster cement mortar. *Construction and Building Materials*, 2013, 41(1): 532–537
- Wang LL, Chen PM, Chen Y, *et al.* A review: Research progress of construction and ecological effects of artificial shell reef. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2015, 30(4): 449–454 [王莲莲, 陈丕茂, 陈勇, 等. 贝壳礁构建和生态效应研究进展. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(4): 449–454]
- Yu M, Ni W, Chen Y, *et al.* Study on making artificial reef material from Qidashan iron tailings. *Metal Mine*, 2012, 41(11): 163–166 [于淼, 倪文, 陈勇, 等. 齐大山铁尾矿制作人工鱼礁材料的研究. *金属矿山*, 2012, 41(11): 163–166]
- Zheng YX. Flow field effect and physical stability of artificial reefs. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [郑延璇. *人工鱼礁流场效应与物理稳定性研究*. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Zheng YX, Liang ZL, Guan CT, *et al.* Structure design and stability of the equilateral triangle artificial reef. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 117–125 [郑延璇, 梁振林, 关长涛, 等. 等边三角型人工鱼礁礁体结构设计及其稳定性. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 117–125]
- Zhou YB, Cai WG, Chen HG, *et al.* Attractive effect of combination of artificial reef models on young *Lutjanus argentimaculatus* in experimental tank. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2012, 31(2): 231–237 [周艳波, 蔡文贵, 陈海刚, 等. 试验水槽中多种人工鱼礁模型组合对紫红笛鲷幼鱼的诱集效果. *台湾海峡*, 2012, 31(2): 231–237]
- Zhu XC, Cui SQ, Dai HL, *et al.* Research on the coal-waste artificial fishing reef I: Formation, technology and leaching test in seawater. *Marine Science Bulletin*, 1987, 6(4): 58–65 [朱燮昌, 崔淑琴, 戴洪亮, 等. 用粉煤灰制作人工鱼礁的研究 I: 粉煤灰人工鱼礁礁块的配比、工艺及海水浸泡溶出试验. *海洋通报*, 1987, 6(4): 58–65]

Influence of Different Replacement Rates of *Argopecten irradians* Aggregate on Physical Properties of Artificial Reefs and Carbon Sequestration

SHI Baibai^{1,3}, GONG Pihai^{2,3}, GUAN Changtao^{2,3}, ZHAO Rongrong^{3,4}, LI Jiao^{2,3①}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 4. College of National Marine Facilities Culture Engineering Technology Research Center, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000)

Abstract This research was conducted based on the mix ratio of ordinary concrete with compressive strength of C25, with the aim to use scallop shells to partly replace coarse and fine aggregates in concrete. Experiments were conducted on the mix ratio of scallop shell concrete, and the working performance and basic mechanical properties of coarse and fine scallop shells instead of natural aggregate concrete was compared. According to the reef plan of Shandong Province from 2016 to 2020, the carbon sequestration potential of the natural aggregate in the artificial reef concrete replaced by the scallop shells and the accumulation area of the cleanable waste scallop shells could be estimated. The results showed that as the proportion of scallop shells replacing natural aggregate increases, the collapse of concrete tends to decrease, and the slump of natural coarse aggregate concrete replaced by coarse scallop shells is larger than that of natural fine aggregate concrete replaced by fine scallop shells. When scallop shells replaced natural stone in concrete, the compressive performance of scallop shell concrete was similar to that of the base concrete. The optimum replacement rate of scallop shells as coarse aggregate was 40%, and the 28-day compressive strength of scallop shell concrete was 7.3% higher than that of the reference concrete. When the natural fine aggregate in concrete was replaced by scallop shells, the compressive performance of concrete was greatly improved relative to that of the reference concrete. The best replacement rate was 60%, and the 28-day compressive strength of scallop shell concrete was 33.5% higher than that of the reference concrete. Estimation replacement rate of fine aggregate with scallop shells for concrete was 50%~70%. For example, 20.43 million empty artificial reefs planned for 2016~2020 in Shandong Province are all made of this kind of concrete, reef materials can achieve carbon sequestration of 275.4~385.6 thousand tons and reduce the land accumulation area of abandoned shells by 5.89~8.24 square kilometers, which has high ecological value.

Key words Artificial reef; Bay scallop shell; Compressive strength; Slump; Carbon sequestration potential

① Corresponding author: LI Jiao, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20181221001

http://www.yykxjz.cn/

赵荣荣, 公丕海, 张艳, 袁伟, 关长涛, 史佰佰, 谢振辉, 李娇. 长岛挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 09-17

Zhao RR, Gong PH, Zhang Y, Yuan W, Guan CT, Shi BB, Xie ZH, Li J. Ecosystem health assessment of artificial reef area in Long Island. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 09-17

长岛挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价*

赵荣荣^{1,2} 公丕海² 张艳² 袁伟²
关长涛² 史佰佰³ 谢振辉⁴ 李娇^{2①}



- (1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316000; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 4. 西南大学动物科技学院 西南大学渔业资源环境研究中心 重庆 400716)

摘要 本研究从理化环境、生物群落结构和生态系统功能3个层面,运用模糊综合评价法构建了人工鱼礁区生态系统健康评价模型。基于2013~2015年山东长岛挡浪岛人工鱼礁区5个航次调查结果,对挡浪岛人工鱼礁区、辐射区和对照区的生态系统开展健康评价。结果显示,人工鱼礁区及辐射区的生态系统为健康状态,对照区为亚健康状态。三者的生态健康指数为鱼礁区(0.783)>辐射区(0.646)>对照区(0.594)。与未投礁时相比,鱼礁区和辐射区的生态系统均脱离了亚健康状态且逐步提升,但对照区仍处于亚健康状态且发展不稳定。健康评价研究表明,挡浪岛人工鱼礁区生态系统比对照区更稳定,并带动辐射区提高了系统健康水平,表明挡浪岛人工鱼礁建设在生态环境修复和海洋渔业资源养护方面已取得一定效果。

关键词 人工鱼礁; 生态系统健康; 模糊综合评价法; 层次分析法

中图分类号 S953.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0009-09

生态系统健康的概念由 Rappor(1989)首次提出,其基本内涵是生态系统本身具有自我维持与更新的能力。此概念提出后,迅速得到国内外重视。目前,生态系统健康评价在森林、海草场、河流、城市等不同领域已被广泛应用(Evans, 1993; Malley *et al*, 1992; Munawar *et al*, 1993; Rosenberg *et al*, 1994; Sonstegard *et al*, 1984; Xu, 1996),但对于海洋牧场的生态健康评价仍处于初步探索阶段(唐伟尧等, 2018)。

人工鱼礁作为保护、增殖海洋渔业资源、发展海洋经济的重要手段,在海洋渔业发展中的作用不断凸

显。其作为一种人为的外来投放物,投放到海域后,会通过一系列的理化过程影响海洋的生物和非生物环境(Willia, 2009),对海洋生态系统的影响状况需进行长期调查、监测并作出系统的科学评价。

目前,关于人工鱼礁生态系统健康评价的研究已有报道。陈应华(2009)对大亚湾大辣甲南人工鱼礁生态系统健康进行了评价;杨进(2011)也对大亚湾区域生态系统健康进行了研究;尹增强等(2012)对东海区资源保护型人工鱼礁生态效果评价体系进行了研究;佟飞等(2014)对荣成俚岛人工鱼礁区生态系统健康进

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费(2016HY-ZD0103)和蓬莱溢油生物资源养护与渔业生态修复项目共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0103), and Bioresources Conservation and Fishery Eco-Restoration for the Penglai Oil Spill]. 赵荣荣, E-mail: 15853287200@163.com

① 通讯作者: 李 娇, 高级工程师, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-12-21, 收修改稿日期: 2019-02-25

行了评价。但以上研究对人工鱼礁生态系统健康评价均集中在单个或少量因子(张艳等, 2013)。

本研究基于 2013~2015 年山东挡浪岛鱼礁区、辐射区和对照区海域的生态环境监测数据, 选取 25 个评价指标, 采用模糊综合评价法和层次分析法, 尝试建立人工鱼礁区生态系统健康评价模型, 并对该海域的生态系统健康进行综合评价。本研究有利于对人工鱼礁的生态系统健康做出更加完善的评价。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本研究示范区位于山东烟台市长岛县西北侧海域(120°38'47"~120°39'21"E, 37°59'17"~37°59'56"N), 距蓬莱渔港北偏西方向约 20 km, 距长岛县渔港西北方向 10 km。研究示范区总面积约为 100 hm², 包括核心建礁区和辐射区。鱼礁区水深为 15~20 m, 水温范围为 3.3℃~27.5℃, 平均水温为 15.4℃。

礁区建设在核心区海域内(约 52 hm²), 建设单位鱼礁群 9 座, 投放 HTSK-CN-3 型大型组合式鱼礁 88 个、HTR-25Si 型金字塔鱼礁 9 个、ZFT-2.0JG 加高型正方体鱼礁 180 个, 石块礁 10400 m³, 共计 21400 空 m³。

1.2 数据来源与预处理

本研究的数据类型主要包括水质、沉积物、渔业生物(地笼和刺网)、底栖生物(抓斗式采泥器)、浮游生物(大型浮游生物网)、浮游植物(小型浮游生物网)。实验设计点位为鱼礁区、辐射区和对照区各设 3 处(图 1), 但由于辐射区(S3)和对照区(C3)在多次调查航次中出现网具丢失现象, 所以对丢失站位未进行数据分析。

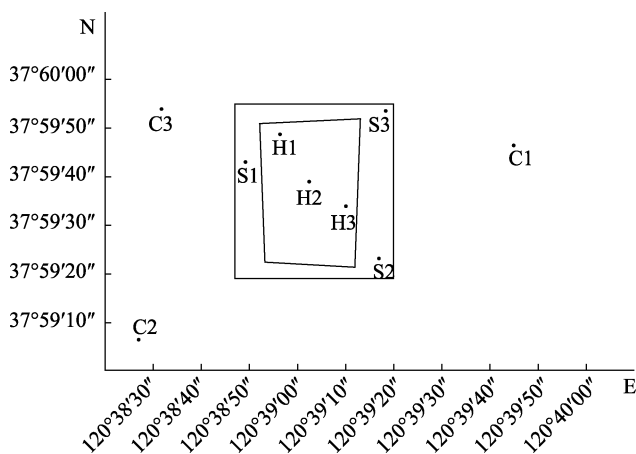


图 1 挡浪岛人工鱼礁区调查站位示意
Fig.1 Schematic diagram of the survey sites of the artificial reef area of Danglang Island

本研究的站点空间布设(图 2)分别为鱼礁区 3 个(H1、H2、H3); 辐射区 2 个(S1、S2); 对照区 2 个(C1、C2)。采样时间为 2013 年 7 月、2014 年 8~11 月、2015 年 4、7 月。实验样品在野外采集后直接现场固定保存, 带回实验室进行定性定量分析。经研究分析, 所有数据均达到本研究质量要求。

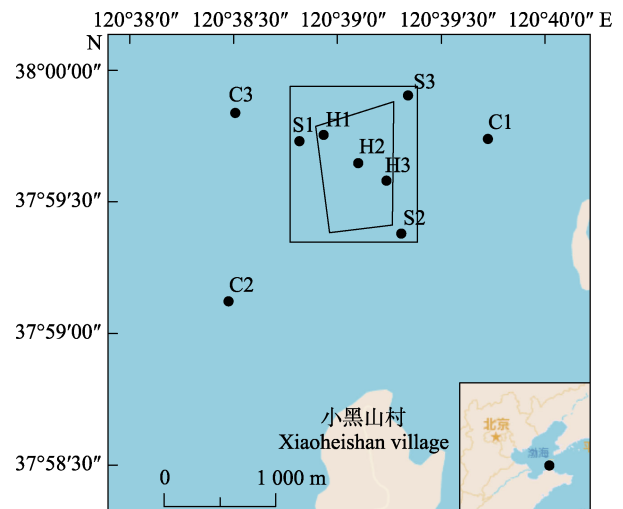


图 2 挡浪岛人工鱼礁区调查站位
Fig.2 The survey sites of artificial reef area in Danglang Island

2 人工鱼礁区生态系统健康综合评价指标体系

2.1 评价指标的选择

将人工鱼礁区的生态系统健康作为本研究核心, 其指标评价框架包括目标层、准则层和指标层(表 1)。将人工鱼礁区的生态系统健康作为目标层; 区域的评价因子作为准则层, 包括理化环境、生物群落结构和生态系统功能; 区域的评价指标作为指标层, 包括水质和沉积物共计 25 项指标。

2.2 权重的确定

本研究对各项评价因子进行权重分析, 通过计算和转化, 使各评价因子之间具有可比较性和可加性。采用层次分析法(AHP)来估算权重, 具体如下: (1)构建层次结构模型。根据本研究建立的指标评价框架由上到下依次建立层次模型; (2)判断矩阵和层次单排序的计算。将构建出的矩阵由相关专家和有实践经验的技术人员根据各指标相对于上层的相对重要性做出判断和检验; (3)层次总排序的计算。计算矩阵中指标的准则层和指标层相对于目标层的相对重要性排序

表 1 挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价指标及对应权重
 Tab.1 Ecosystem health assessment indicators and corresponding weights of artificial reef area in Danglang Island

目标层 Target layer A	准则层 Criterion layer B	指标层 Index layer C	权重 Weight
生态系统健康 Ecosystem health	理化环境 Physical and chemical environment	pH(水质)	0.030
		溶解氧 DO(水质)	0.024
		化学需氧量 COD(水质)	0.019
		水质石油类(水质)	0.019
		无机氮 IN(水质)	0.019
		活性磷酸盐 IP(水质)	0.030
		氮磷比 N:P(水质)	0.040
		悬浮物 SS(水质)	0.019
		硫化物 Sulfide(沉积物)	0.025
		沉积物石油类(沉积物)	0.025
		铜 Cu(沉积物)	0.025
		汞 Hg(沉积物)	0.025
		锌 Zn(沉积物)	0.025
		镉 Cd(沉积物)	0.025
		铅 Pb(沉积物)	0.025
	砷 As(沉积物)	0.025	
	生物群落结构 Biologic community structure	浮游植物密度 Phytoplankton density	0.040
		浮游植物多样性阈值 Phytoplankton diversity threshold	0.060
		浮游动物密度 Zooplankton density	0.040
		浮游动物多样性阈值 Zooplankton diversity threshold	0.060
		底栖动物生物量 Benthic biomass	0.040
		底栖动物多样性阈值 Benthic diversity threshold	0.060
		渔业资源生物量 Fishery resource biomass	0.040
		渔业资源多样性阈值 Fishery resource diversity threshold	0.060
	生态系统功能 Ecosystem function	初级生产力 Primary productivity	0.200

权重, 实际上是层次单排序的加权组合(郭金玉等, 2008; 杨进等, 2011)。由层次分析法计算得出的 25 项指标权重见表 1。

2.3 数据归一化处理

2.3.1 评价标准和依据 本研究对理化环境指标和生物生态指标的评价标准的选择遵循优先考虑国家标准; 无国家标准时, 则参考行业标准或相关研究成果(李利, 2011)。按照上述原则, 在评估理化环境因子时, 主要参考《海水水质标准》(GB3097-1997)和《海洋沉积物质量》(GB18668-2002); 生物群落结构因子主要按照《近岸海洋生态健康评价指南》(HY/T087-2005)、陈清潮等(1994)提出的生物多样性阈值分级标准和李纯厚等(2013)研究的海湾生态系统生物评价为参考标准; 生态系统功能因子采用贾晓平等(2003)提出的初级生产力水平分级标准。具体相关指标及标准见表 2~表 6。

2.3.2 指标标准化 本研究在参考国内外相关资料的基础上, 主要参照尹增强等(2012)提出的将鱼礁生态效果划分为优、良、合格、较差和很差 5 种类型, 并分别赋值为 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 的计算方法; 借鉴李娇等(2018)提出的将评价指标划分为正向、逆向和适度指标 3 类的阈值法。挡浪岛人工鱼礁的生态健康体系中, 各生态指标运用以下 3 个类型中的相应隶属函数进行标准化计算。计算公式如下:

(1) 正向指标 即评价指标的数值越高, 对海洋生态系统健康越有利。本研究选取溶解氧(DO)、浮游植物多样性阈值、浮游动物多样性阈值、底栖动物多样性阈值、渔业资源多样性阈值和初级生产力, 这些指标的标准值按公式(1)计算:

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

(2) 逆向指标 即评价指标的数值越低, 对海洋生态系统健康越有利。本研究选取化学需氧量(COD)、无机氮(IN)、油类、活性磷酸盐(IP)、悬浮物(SS)、硫化物、水质及沉积物中石油类、Cu、Hg、Zn、Cd、Pb、As, 这些指标的标准值按公式(2)计算:

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

(3) 适度指标 即评价因子的数值过高或过低都不利于海洋生态系统健康。本研究选取 pH、氮磷比(N:P)、浮游植物密度、浮游动物密度、底栖生物生物量和渔业资源生物量, 这些指标的标准值按公式(3)计算:

表2 挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价标准
Tab.2 Standards for health assessment of artificial reef ecosystem in Danglang Island

指标类别 Indicator category	指标 Indicator	评价标准 Assessment standard
海洋环境因子 Marine environment indicator	海水水质单项指标质量氮磷比	海水水质标准(GB3097-1997)潜在性富营养化分级标准
	海洋沉积物单项指标质量	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	浮游植物密度	近岸海洋生态健康评价指南(HY/T087-2005)
	浮游植物多样性阈值	生物多样性阈值分级标准
	浮游动物密度	近岸海洋生态健康评价指南(HY/T087-2005)
生物群落结构因子 Biology community indicator	浮游动物多样性阈值	生物多样性阈值分级标准
	底栖生物生物量	近岸海洋生态健康评价指南(HY/T087-2005)
	底栖生物多样性阈值	生物多样性阈值分级标准
	渔业资源生物量	近岸海洋生态健康评价指南(HY/T087-2005)
生态系统功能因子 Ecosystem function indicator	渔业资源多样性阈值	生物多样性阈值分级标准
	初级生产力	初级生产力水平分级

表3 海湾生态系统生物评价指标
Tab.3 Evaluation indicator for bay ecosystem organisms

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

表4 潜在性富营养化级数分类
Tab.4 Grade classification of potential eutrophication

级别 Level	营养级 Trophic level	无机氮 IN (mg/L)	活性磷酸盐 IP (mg/L)	氮磷比 N:P
I	贫营养 Poor nutrition	<0.2	<0.03	8~30
II	中度营养 Moderate nutrition	0.2~0.3	0.03~0.04	8~30
III	富营养 Eutrophic	>0.3	0.03~0.04	8~30
IV P	磷限制中度营养 Medium nutrient with phosphorous limiting	0.2~0.3	—	>30
V P	磷中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium phosphorous limiting	>0.3	—	30~60
VI P	磷限制潜在性富营养 Potential eutrophication with phosphorous limiting	>0.3	—	>60
IV N	氮限制中度营养 Medium nutrient with nitrogenous limiting	—	0.03~0.04	<8
V N	氮中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium nitrogenous limiting	—	>0.045	4~8
VI N	氮限制潜在性富营养 Potential eutrophication with nitrogenous limiting	—	>0.045	<4

表5 生物多样性阈值分级评价标准
Tab.5 Evaluation standards for the threshold of biodiversity

评价项目 Evaluation items	等级标准 Evaluation grade				
	1	2	3	4	5
多样性阈值 Threshold of biodiversity	<0.6	0.6~1.5	1.6~2.5	2.6~3.5	>3.5
等级 Grade	差 Poor	一般 Middle	较好 Preferable	丰富 Plentiful	非常丰富 High

表 6 初级生产力水平分级评价标准
Tab.6 The evolution standards for the lever of primary productivity

项目 Items	评价等级 Assessment grade					
	1	2	3	4	5	6
初级生产力 Primary productivity (mgC/mg·d)	<200	200~300	300~400	400~500	500~600	>600
分级描述 Classification describe	低水平 Low	中低水平 Low-Middle	中等水平 Middle	中高水平 Middle-High	高水平 High	超高水平 Superhigh

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

式中, x 为各指标标准值; x_i 为单项指标的实测值; x_{\max} 为单项指标的最大值; x_{\min} 为单项指标的最小值; a 、 b 为指标最佳范围阈值; k 为指数。

本研究中的指标评价采用阈值抛物线型标准化处理方法建立模糊隶属函数求得, 其中, 阈值范围主要参照各自指标的生态健康评价标准, 指数的确定除去 pH、IN 和 IP 的 k 值为 1, 其他指标的 k 值均由其对应的评价值 ≥ 0.6 计算得出(杨进, 2011; 尹增强等, 2012)。

2.4 生态系统健康综合评价模型

根据计算的各项指标的标准化值和权重值, 利用模糊综合评价法(Xu *et al.*, 2004)构建一个评价模型, 对人工鱼礁区、辐射区和对照区的生态系统健康指数(Ecosystem health index, EHI)进行综合评价。

$$EHI = \sum W_i \times H_i \quad (4)$$

式中, EHI 为生态系统综合健康指数; W_i 为第 i 个指标的权重, H_i 为对应第 i 个指标的标准化值。

通过上述方法计算得到的 EHI 分布范围在 0~1 之间, 共 6 个等级(表 7)。

表 7 人工鱼礁生态系统健康水平分级
Tab.7 Grade for health level of artificial reef ecosystem

指数范围 Index range	生态系统健康水平分级 Ecosystem health level
[0~0.2)	病态 Sick
[0.2~0.4)	一般病 Sore
[0.4~0.6)	亚健康 Sub-healthy
[0.6~0.8)	健康 Healthy
[0.8~1.0)	很健康 Healthier
1.0	最健康 Healthiest

3 评价结果

基于 2013~2015 年挡浪岛人工鱼礁区、辐射区和对照区 5 个航次调查数据, 将各指标进行归一化处理, 其中, 2014、2015 年的数据处理结果均取年平均值。计算得到挡浪岛人工鱼礁区的 25 个分健康指标(表 8)。通过构建的生态系统健康评价模型, 计算得到生态系统健康综合指数(图 3)。

3.1 指标层分健康指标

2013~2015 年挡浪岛人工鱼礁区生态系统的分健康指标见表 8。从表 8 可以看出, 人工鱼礁区、辐射区和对照区的理化环境准则层中, 除 SS、N:P 的分健康指标较低外, 其他均达到较高的水平, 且 3 个区之间的差异性较小, 整体上呈现了较为健康的海洋理化环境。

生物群落结构准则层的分健康指标结果显示, 3 年来, 3 个区域的浮游植物密度一直保持在高水平; 浮游植物、浮游动物、底栖动物的多样性阈值基本维持中等状态且逐年增长; 鱼礁区和辐射区的渔业资源生物量和生物多样性阈值均呈增长趋势, 其增长幅度鱼礁区明显大于辐射区, 相反对照区则出现轻微的下降趋势。

生态系统功能准则层中初级生产力的分健康指标结果显示, 2013~2015 年 3 个区域均有所增长, 但总体上处于中等偏下的水平。2013 年辐射区和对照区的健康指数略高于鱼礁区, 到 2015 年鱼礁区则明显超过其他 2 个区。

3.2 生态系统健康综合指数

挡浪岛 2013~2015 年的生态系统健康综合指数见图 3。从图 3 可以看出, 鱼礁区、辐射区的 EHI 随着投礁时间的增长而逐渐增大, 且鱼礁区的增长幅度明显大于辐射区, 对照区则呈先减小后增大的趋势。在 2013 年本底调查时, 3 个区域的 EHI 差别不大, 且对照区高于鱼礁区和辐射区, 到 2014、2015 年, 即投礁后 1~2 年, 健康指数则均呈鱼礁区 > 辐射区 > 对照区。

表8 生态系统健康指标分布
Tab.8 Distribution of ecosystem health index

指标 Index	归一化值 (人工鱼礁区) Normalization value (Artificial reef area)			归一化值 (辐射区) Normalization value (Radiation area)			归一化值 (对照区) Normalization value (Control area)		
	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015
	pH	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
溶解氧 DO	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
化学需氧量 COD	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.158	1.000
水质石油类 Water quality TPHs	0.997	0.999	0.999	0.998	0.997	0.999	0.986	0.989	0.895
无机氮 DIN	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
活性磷酸盐 IP	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000
氮磷比 N:P	0.875	0.000	0.907	0.000	0.925	0.000	0.950	0.925	0.000
悬浮物 SS	0.000	0.947	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
硫化物 Sulfide	0.998	0.994	0.992	0.988	0.996	0.990	0.996	0.995	0.960
沉积物石油类 Sediment TPHs	0.970	0.997	0.999	0.980	0.986	1.000	0.960	0.988	0.960
铜 Cu	0.990	0.964	0.974	0.991	0.960	0.880	0.992	0.960	0.920
汞 Hg	0.988	0.980	0.995	0.976	0.980	0.995	0.990	0.961	0.960
锌 Zn	0.976	0.983	0.991	0.960	0.987	0.992	0.991	0.960	0.960
镉 Cd	0.997	0.984	0.960	0.986	0.960	0.984	0.996	0.996	0.881
铅 Pb	0.996	0.982	0.982	0.995	0.983	0.992	0.997	0.988	0.960
砷 As	0.895	0.967	0.989	0.883	0.960	0.881	0.921	0.960	0.960
浮游植物密度 Phytoplankton density	0.976	0.979	0.989	0.976	0.974	0.750	0.992	0.989	0.986
浮游植物多样性阈值 Phytoplankton diversity threshold	0.333	0.466	0.552	0.334	0.411	0.413	0.350	0.351	0.383
浮游动物密度 Zooplankton density	0.000	0.025	0.993	0.000	0.250	0.998	0.000	0.250	0.988
浮游动物多样性阈值 Zooplankton diversity threshold	0.000	0.184	0.333	0.000	0.000	0.406	0.000	0.167	0.333
底栖动物生物量 Benthic biomass	0.000	0.896	0.968	0.000	0.250	0.512	0.000	0.254	0.899
底栖动物多样性阈值 Benthic diversity threshold	0.300	0.467	0.467	0.516	0.333	0.483	0.533	0.267	0.266
渔业资源生物量 Fishery resource biomass	0.675	0.725	0.825	0.675	0.523	0.552	0.775	0.751	0.652
渔业资源多样性阈值 Fishery resource diversity threshold	0.483	0.666	0.833	0.467	0.552	0.667	0.521	0.450	0.353
初级生产力 Primary productivity	0.200	0.412	0.635	0.205	0.332	0.442	0.205	0.275	0.223

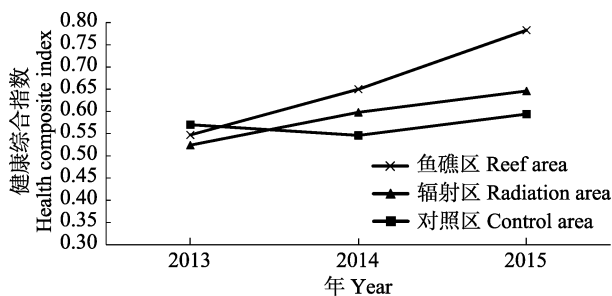


图3 挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康综合指数

Fig.3 Ecosystem health composite index of artificial reef ecosystem in Danglang Island

4 讨论

4.1 生态系统健康综合评价指标的优化

本研究建立的挡浪岛人工鱼礁区健康评价指标体系，建立了3个准则层和25项评价指标，以使构建的评价系统更加全面，对人工鱼礁在资源环境修复和生态健康方面进行科学的分析与评价。

与尹增强等(2012)建立的指标体系相比增加了海洋沉积物指标。由于“蓬莱19-3油田溢油污染”对山

东长岛在内的大部分渤海海域的生态环境造成了一定影响(郭楠等, 2015; 胡建平, 2016), 长岛海域的 SS 增多、N:P 水平波动较大, 因此, 把水质和沉积物中的石油类含量及其他沉积物指标作为一项评价标准是十分必要的。本海域调查结果显示, 沉积物的重金属指标监测中并无超标现象, 水质和沉积物中的石油类和硫化物均符合国家标准, 这也为整个生态环境提供了一定的恢复条件。

与李娇等(2018)建立的指标体系相比增加了初级生产力指标。海洋初级生产力是海洋生物生产的基础, 支撑着海洋生态系统的物质循环和能量流动, 决定着海洋渔业资源的生物容量, 即渔业资源量(虞聪达等, 2009)。鱼礁区海域的叶绿素和脱镁叶绿素在 2013~2015 年夏季呈逐年递增的变化趋势, 可见人工鱼礁的建设对海域初级生产力具有一定的促进作用, 这也将为海区的渔业资源增长做准备。

与佟飞等(2014)建立的指标体系相比, 增加了地笼和刺网的渔业资源指标。根据地笼和刺网的渔业资源调查结果发现, 在指标体系中建立了渔业资源的生物量和多样性阈值这 2 项指标, 对研究本海域的资源变化和评价鱼礁区的增养殖效果具有重要意义。通过 1 次本底调查和 4 次跟踪调查发现, 投礁后挡浪岛人工鱼礁区和邻近海域游泳生物、底栖动物、浮游生物的种类数量有了一定的增加, 如鱼类由 2013 年的 6 种增加到 2014 年的 11 种和 2015 年的 15 种, 属于过路性鱼类和恋礁性鱼类, 特别是恋礁性鱼类大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)和许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)。调查还发现, 浮游生物和底栖生物的丰度和生物量也有明显的增加, 常见种增多, 稀有种也有出现, 在一定程度上说明浮游动物群落和底栖动物群落趋于稳定。张虎等(2005)对海州湾人工鱼礁养护效果研究表明, 人工鱼礁对渔业资源增长具有积极意义, 这与本研究结果一致。

4.2 人工鱼礁区的生态系统健康效果

根据挡浪岛建礁后的 EHI 显示, 2014 年鱼礁区(0.650)>对照区(0.598)、2015 年鱼礁区(0.783)>对照区(0.594)。与其他学者的相关研究结果比较, 佟飞等(2014)研究表明, 荣成俚岛建礁后 EHI 为鱼礁区(0.647)>对照区(0.641); 李娇等(2018)研究表明, 北戴河建礁后的 EHI 2014 年为鱼礁区(0.787)>对照区(0.807)、2015 年为鱼礁区(0.838)>对照区(0.671), 其研究结果相一致, 即建礁后的 EHI 鱼礁区>对照区, 且鱼礁区的 EHI 逐年上升。由于生态系统本身具有复杂性及各指标之间的权重赋值差异会引起一定的综

合评价差异, 但变化趋势基本一致, 均为鱼礁区的健康指数状况变好。表明鱼礁建设对于生态系统健康具有一定的积极作用。

本研究中除设置鱼礁区和对照区外, 还增设了辐射区, 辐射区设于鱼礁区外围 800 m 范围内(杨齐等, 2005), 可以对人工鱼礁生态效应进行更客观、更全面的评价。根据调查结果显示, 建礁后辐射区效果逐渐好于对照区, 并在 2015 年摆脱亚健康状态达到了健康状态。说明鱼礁区的建设的确对外围海域具有辐射性, 且在一定程度上带动了生态环境的改善和渔业资源的丰富, 使其生态系统更加健康。

5 结论

本研究综合考虑挡浪岛人工鱼礁区的生态状况, 选择理化环境、生物群落与生态系统结构中的 25 个指标, 构建了生态系统健康评价模型, 对人工鱼礁区及周围海域生态系统健康状况进行对比分析。结果显示, 建礁前, 人工鱼礁区、辐射区和对照区都属于亚健康状态, EHI 为对照区>鱼礁区>辐射区。但建礁完成 2 年后, 鱼礁区带动辐射区由亚健康状态转变为健康状态, EHI 均呈现逐年上升趋势且增幅较大。而对照区 3 年一直未摆脱亚健康状态, 虽 2015 年的 EHI 明显高于前 2 年, 但总体状态并不稳定, 2014 年呈现负增长, 险些成为病态环境。对照区的 EHI 明显低于鱼礁区和辐射区, 说明人工鱼礁的建设正在逐步发挥作用, 人工鱼礁的建设利于溢油污染海域生态逐步恢复。为促进人工礁区生态系统健康稳定发展, 应开展增殖放流和移(种)植大型藻类等措施, 促进海洋生物增殖, 即可较快实现保护和修复区域性海洋生态环境的目的, 营造出“海底森林”的效果, 扩增海洋碳汇功能, 将产生良好的海洋生态效益。人工鱼礁区作为动态发展的生态系统, 环境、生物变化受到周围大尺度环境和人为调控的影响, 因此, 对人工鱼礁的综合调查和评价应是一个长期的过程, 应持续调查监测和进一步完善优化评价体系, 从而得到更加科学和综合的海洋牧场评价。

参 考 文 献

- Chen QC, Huang LM, Yin JQ. Research on marine biodiversity of Nansha Islands and its adjacent sea areas I. Beijing: Ocean Press, 1994, 42-50 [陈清潮, 黄良民, 尹建强. 南沙群岛及其邻近海区海洋生物多样性研究 I. 北京: 海洋出版社, 1994, 42-50]
- Chen YH. Analysis of ecological effects of southern Dalajia

- Island artificial reef area in Daya Bay. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2009 [陈应华. 大亚湾大辣甲南人工鱼礁区的生态效应分析. 暨南大学博士研究生学位论文, 2009]
- Evans MS. Toxic contaminants and Great Lakes ecosystem health: Current understandings and strategies for improved assessments. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1993, 2(2): 87–93
- Guo JY, Zhang ZB, Sun QY. Study and applications of analytic hierarchy process. *China Safety Science Journal*, 2008, 18(5): 148–153 [郭金玉, 张忠彬, 孙庆云. 层次分析法的研究与应用. *中国安全科学学报*, 2008, 18(5): 148–153]
- Guo N, Luo J, Bo RL. Bioaccumulation and analysis of petroleum hydrocarbons in aquatic products of Liaoning Province. *Hebei Fishery*, 2015(5): 13–25 [郭楠, 罗靳, 薄尔琳. 石油烃在辽宁省水产品中的生物富集与分析. *河北渔业*, 2015(5): 13–25]
- Hu JP, Zhang HP, Tian Y. Technical report on construction of Penglai oil compensation ecological restoration marine pasture project in Hebei Province. *Hebei Fishery*, 2016(4): 26–27 [胡建平, 张海鹏, 田洋. 河北省蓬莱溢油补偿生态修复海洋牧场项目建设技术报告. *河北渔业*, 2016(4): 26–27]
- Jia XP, Du FY, Lin Q, *et al.* Discussion on comprehensive evaluation method of ecological environment quality status of marine fisheries. *Journal of Fishery Science of China*, 2003, 10(2): 160–164 [贾晓平, 杜飞雁, 林钦, 等. 海洋渔场生态环境质量状况综合评价方法探讨. *中国水产科学*, 2003, 10(2): 160–164]
- Li CH, Lin L, Xu SN, *et al.* Establishment of integrated methodology for bay ecosystem health assessment and its application in Daya Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(6): 1798–1810 [李纯厚, 林琳, 徐姗姗, 等. 海湾生态系统健康评价方法构建及在大亚湾的应用. *生态学报*, 2013, 33(6): 1798–1810]
- Li J, Zhang Y, Yuan W, *et al.* Research on artificial reef ecosystem health based on fuzzy comprehensive evaluation method. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 10–19 [李娇, 张艳, 袁伟, 等. 基于模糊综合评价法的人工鱼礁生态系统健康研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 10–19]
- Li L. Health assessment of the ecosystem of Lianzhou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [李利. 廉州湾海域生态系统健康评价. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2011]
- Liu SX, Sun QB, Chen XM, *et al.* Seasonal distribution characteristics of chlorophyll-*a* concentration in the coastal waters of the North Yellow Sea. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(4): 528–532 [刘述锡, 孙钦帮, 陈素梅, 等. 北黄海近岸海域叶绿素 *a* 浓度季节分布特征. *海洋环境科学*, 2011, 30(4): 528–532]
- Malley DF, Mills KH. Whole-lake experimentation as a tool to assess ecosystem health, response to stress and recovery: The experimental lakes area experience. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1992, 1(3): 159–174
- Munawar M, Munawar IF, McCarthy L, *et al.* Assessing the impact of sewage effluent on the ecosystem health of the Toronto Waterfront (Ashbridges Bay), Lake Ontario. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1993, 2(4): 287–315
- Rapport DJ. What constitutes ecosystem health? Perspectives in Biology and Medicine, 1989, 33(1): 120–132
- Rosenberg DM, Resh VH. Fresh water biomonitoring and benthic macroinvertebrates. *Quarterly Review of Biology*, 1994, 69(2): 286–287
- Sonstegard RA, Leatherland JF. Great lakes coho salmon as an indicator organism for ecosystem health. *Marine Environmental Research*, 1984, 14(1–4): 480
- Tang WY, Tang YL, Sheng HX, *et al.* Ecosystem health assessment of Weihai Xigang artificial reef area. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(3): 55–64 [唐伟尧, 唐衍力, 盛化香, 等. 威海西港人工鱼礁区生态系统健康评价. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(3): 55–64]
- Tong F, Zhang XM, Wu ZX, *et al.* The ecosystem health assessment of artificial reef areas in Lidao Island, Rongcheng. *Periodical of Ocean University of China(Natural Science)*, 2014, 44(4): 29–36 [佟飞, 张秀梅, 吴忠鑫, 等. 荣成俚岛人工鱼礁区生态系统健康的评价. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(4): 29–36]
- Willia SJ. Artificial reef evaluation with application to natural marine habitats. New York: CRC Press, 2009
- Xu FL. Ecosystem health assessment of Lake Chao, a shallow eutrophic Chinese lake. *Lakes and Reservoirs Research and Management*, 1996, 2(1–2): 101–109
- Xu FL, Lam KC, Zhao ZY, *et al.* Marine coastal ecosystem health assessment: A case study of the Tolo Harbour, HongKong, China. *Ecological Modelling*, 2004, 173(4): 355–370
- Yang J, Li CH, Jia XP, *et al.* Ecosystem health assessment of artificial reef area in Yangmeikeng, Daya Bay. *Ecological Science*, 2011, 30(4): 399–405 [杨进, 李纯厚, 贾晓平, 等. 大亚湾杨梅坑人工鱼礁区生态系统健康评价. *生态科学*, 2011, 30(4): 399–405]
- Yang J. Research on regional ecosystem health assessment in Daya Bay. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [杨进. 大亚湾区域生态系统健康评价研究. *上海海洋大学硕士研究生学位论文*, 2011]
- Yang L, Liu TY, Huang RK. Theory and practice of artificial reefs in China. Guangzhou: Guangdong Science Technology Press, 2005 [杨吝, 刘同渝, 黄汝堪. *中国人工鱼礁的理论与实践*. 广州: 广东科技出版社, 2005]
- Yin ZQ, Zhang SY. The ecological effect evaluation system of protective artificial reef in East China Sea. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1): 23–31 [尹增强, 章宇宇. 东海区资源保护型人工鱼礁生态效果评价体系的初步研究. *海洋渔业*, 2012, 34(1): 23–31]
- Yu CD, Yu CG. Research on the utilization of offshore fishery

- resources and management of marine fishing operations in Southern Zhejiang. Beijing: Ocean Press, 2009, 14 [虞聪达, 俞存根. 浙江南部外海渔业资源利用与海洋捕捞作业管理研究. 北京: 海洋出版社, 2009, 14]
- Zhang H, Zhu KW, Tang JH. The effect of fishery resource enhancement in the artificial reef area in the Haizhou Gulf. *Marine Fisheries*, 2005, 27(1): 38–43 [张虎, 朱孔文, 汤建华. 海州湾人工鱼礁养护资源效果初探. *海洋渔业*, 2005, 27(1): 38–43]
- Zhang Y, Chen JF, Guo F, *et al.* Variation of seawater quality at the artificial reef area in Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 1–7 [张艳, 陈聚法, 过锋, 等. 莱州人工鱼礁海域水质状况的变化特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 1–7]

(编辑 陈 严)

Ecosystem Health Assessment of Artificial Reef Area in Long Island

ZHAO Rongrong^{1,2}, GONG Pihai², ZHANG Yan², YUAN Wei²,
GUAN Changtao², SHI Baibai³, XIE Zhenhui⁴, LI Jiao^{2①}

(1. College of National Marine Facilities Culture Engineering Technology Research Center, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. School of Animal Science and Technology, Research Center of Fishery Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract In this study, we used a fuzzy synthetic evaluation to build an ecosystem-health assessment model according to offshore sea ecosystem characteristics and artificial reef construction functions from three aspects: Physicochemical environment, biological community structure and ecosystem function. To eliminate the dimension effect of sub-indexes, normalization process was used. An analytic hierarchy process was used to assign a threshold or the ecological indicator. The synthetic health index was used to assess the health status of the artificial reef areas, radiation areas and contrast areas. Sub-indexes of artificial reef ecosystem health assessments included physical, chemical, and biological factors. Assessment standards were based on seawater quality, standard marine sediment quality, and guidance for the assessment of coastal marine ecosystem health. We conducted a series of ecosystem health assessments of artificial reefs, and radiation and control areas of Danglang Island based on the survey results of 5 voyages in 2013–2015. The results showed that the ecosystem of artificial reef areas was in a healthy state, whereas the control area was in a sub-healthy state. From the highest to the lowest, the ecological health index was: The three reef area (0.783)>radiation areas (0.646)>control area (0.594). Compared with non-reefing, the ecosystems of the reef and radiant areas were all separated from the sub-healthy state and gradually improved, however, the control area was still in a sub-healthy state and its development was unstable. Therefore, the conclusion was that the ecosystem of the artificial reef areas of Danglang Island were more stable than the control areas, and ecosystem health of radiation areas, was gotten better, due to effect of reefs. The study of reef ecosystem health and scientifically assessing artificial reef ecological effects is important for the construction of reef projects, environment protection, stock enhancement, efficient administration, and sustainable development of fisheries.

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

① Corresponding author: LI Jiao, E-mail:lijiao@ysfri.ac.cn

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20180820001

http://www.yykyjz.cn/

崔勇, 关长涛, 黄滨, 李娇, 公丕海. 波浪作用下双层网底鲆鲽网箱水动力特性的数值模拟. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 18-24

Cui Y, Guan CT, Huang B, Li J, Gong PH. Numerical simulation of the hydrodynamic characteristics of double-bottom cage for flounder fish under waves. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 18-24

波浪作用下双层网底鲆鲽网箱 水动力特性的数值模拟*



崔 勇 关长涛^① 黄 滨 李 娇 公丕海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071)

摘要 根据有限单元法建立了波浪作用下双层网底网箱的受力运动模型,通过数值计算求解双层网底的位移与倾角。先将上层网底与下层网底的计算值进行比较,然后,将双层网底网箱中下层网底与单层网底网箱开展对比分析。计算结果显示,在波浪周期内,双层网底网箱的2层网底能保持相对平行的状态。2层网底的位移与最大倾角随着波高与周期的增大而增加,并且2层网底的倾斜方向一致。在相同波浪条件作用下,下层网底的水平位移大于上层网底,二者垂直位移差异较小,下层网底最大倾角值大于上层网底。研究发现,当波高为15 cm、周期为1.4 s时,双层网底网箱的2层网底的倾角相差最大,但并未发生接触碰撞,网底可以保持相对稳定。此外,双层网底网箱的下层网底的最大位移值小于单层网底网箱,最大倾角值大于单层网底网箱。研究表明,当波浪一定时,双层网底网箱的最大锚绳力均大于单层网底网箱。

关键词 双层网底; 水动力; 有限元方法; 鲆鲽网箱

中图分类号 S953.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0018-07

鲆鲽类养殖网箱通常底部具有平台结构,主要用于牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等底栖性鱼类的养殖。目前,用于养殖鲆鲽鱼类的网箱多为方形平底结构,其水面框架由金属管材制成,底部配有张紧绳索的框架支撑底部网衣(崔勇等, 2012)。鲆鲽类养殖网箱与HDPE重力式网箱相比,主要区别为网衣深度不同和网箱底部具有平台结构。鲆鲽网箱的网底面积直接决定单体网箱的养殖产量,

因此,为增加单体网箱的产量,网箱通常设有双层或多层网底结构,可增加网箱的养殖面积,提高养殖空间利用率。多层结构的网底在波浪作用下会发生倾斜与转动,为确保鲆鲽类养殖网箱多层网底结构的安全性,需对其水动力特性开展研究。

近年来,国内外学者在离岸网箱水动力特性方面进行了一系列的研究,其中包括物理模型实验(Lader *et al*, 2005; DeCew *et al*, 2010; 黄六一等, 2007),也有利

* 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47-22)、“一带一路”国家水产养殖科技创新合作项目 2018-2020 和深远海智能化网箱整装装备产业链协同创新示范项目共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-47-22), “The Belt and Road” National Aquaculture Science and Technology Innovation Cooperation Project 2018-2020, and Deep Sea Intelligent Fish Cage Equipment Industry Chain Collaborative Innovation Demonstration Project]. 崔 勇, E-mail: cuiyong@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2018-08-20, 收修改稿日期: 2018-11-09

用计算机技术开展数值模拟(Lee *et al.*, 2008; Tsukrov *et al.*, 2003; 黄小华等, 2011)等。此外, Fredriksson 等(2003、2007)对实际养殖海区水流作用下养殖网箱的锚泊系统受力进行了海上实测。目前, 此类研究中针对鲆鲽网箱水动力特性研究的报道还比较少。赵云鹏等(2012)通过集中质量法对波浪作用下一种鲆鲽类方形网箱水动力特性开展了数值模拟研究。Gui 等(2014)对一种鲆鲽网箱在波浪作用下的水动力特性进行测试。崔勇等(2016)对一种双层网底结构鲆鲽网箱的耐流特性开展了研究, 并与单层网底网箱进行了比较分析。本文以一种双层网底鲆鲽网箱为研究对象, 基于有限元软件提供的参数化建模技术, 对其在波浪作用下的水动力特性进行数值模拟, 研究结果可为多层网底鲆鲽网箱设计优化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数值模拟方法

本研究基于有限元方法对波浪作用下双层网底鲆鲽网箱的水动力特性进行数值模拟。网箱结构主要由框架、网衣和锚绳单元构成, 本研究采用的有限元模型将网箱结构分成不同特性的单元来计算载荷。如果单元位于水中, 其水动力载荷自动施加; 如果单元位于水面以上, 则只有重力载荷。因此, 数值模型可针对结构单元的位置对其水动力进行自动调节。该数值模型通过物理水槽实验验证(Cui *et al.*, 2013), 可用于网衣与框架结构的模拟。

根据有限元动力分析方法, 网箱整体结构在波流场中的运动可由公式(1)表示(李茜等, 2003; ANSYS Incorporated, 2009):

$$M\ddot{a}(t) + Ka(t) = F(t) + R(t) \quad (1)$$

式中, $a(t)$ 、 $\ddot{a}(t)$ 分别为离散后的节点位移向量与加速度矢量; M 与 K 分别为质量矩阵与刚度矩阵; $F(t)$ 和 $R(t)$ 分别为流体静载荷和动载荷效应引起的等效节点力矢量。单元载荷通过 Morison 方程计算:

$$\begin{aligned} \{F/L\}_d = C_D \rho_w \frac{D_e}{2} \left\{ \dot{u}_n \right\} \left\{ \dot{u}_n \right\} + C_M \rho_w \frac{\pi}{4} D_e^2 \left\{ \dot{v}_n \right\} + \\ C_T \rho_w \frac{D_e}{2} \left\{ \dot{u}_t \right\} \left\{ \dot{u}_t \right\} \end{aligned} \quad (2)$$

式中, $\{F/L\}$ 为波流作用产生的单位长度上的载荷向量; C_D 、 C_T 为法向和切向拖曳力系数; C_M 为惯性力系数; $\{\dot{u}_n\}$ 、 $\{\dot{v}_n\}$ 和 $\{\dot{u}_t\}$ 分别为质点法向相对速度、法向加速度和切向相对速度向量, ρ_w 为流体密度, D_e 为直径。

1.2 算例

计算用例采用与崔勇等(2016)的双层网底鲆鲽网箱一致。其中, 原型网箱主尺寸为 $5 \text{ m} \times 5 \text{ m} \times 4 \text{ m}$, 网底面积为 16 m^2 , 上层网底距离水面为 2 m , 底面积为 9 m^2 , 即双层网底网箱的总养殖面积为 25 m^2 。上层网底四角通过聚乙烯绳索连接网箱上框架与底框架四角, 在静水条件下, 上层网底可保持水平状态(图 1)。为了与崔勇(2012)的单层网底鲆鲽网箱进行比较, 本研究计算用例采用重力相似准则, 大尺度比为 $1:20$, 模型网箱参数见表 1。波浪工况见表 2, 设计水深为 0.6 m 。

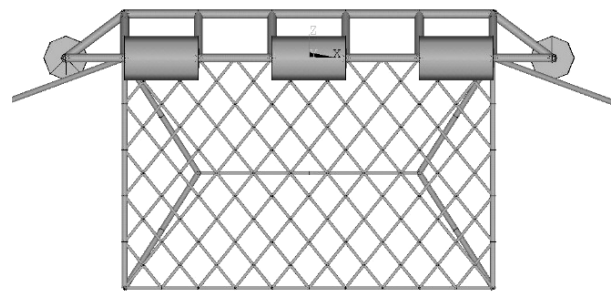


图 1 双层网底鲆鲽网箱

Fig.1 The flounder fish cage with double-bottom

2 结果与讨论

2.1 网箱运动模拟结果

在波浪作用下, 双层网底鲆鲽网箱在 1 个周期内运动变形情况的数值模拟结果见图 2。图 2 中波浪工况条件波高为 9 cm , 波周期为 1.2 s 。每张图片的时间间隔为 $1/8$ 波浪周期, 图 2 中颜色深浅表示网箱离散单元位移大小。从图 2 可以看出, 双层网底鲆鲽网箱整体结构随着波浪传播方向呈现周期性的运动趋势。本研究的计算用例中, 浮框和底框架单元本身具有一定的刚度, 其单元的形状变化较小, 而网衣单元随着时间的推移, 在波浪力的作用下产生了明显的变形。从图 2 还可以看出, 在波浪作用下, 网箱的上层网底与下层网底框架基本保持平行状态, 即 2 层网底的倾斜方向相同, 倾斜角度也基本一致。此结果与单纯水流作用下网箱 2 层网底的运动变形情况差别较大。当水流作用时, 网箱上层网底与下层网底的倾斜方向恰好相反, 导致在高流速时出现双层网底发生相互碰撞的情况(崔勇等, 2016)。而当网箱在单纯波浪作用下, 网箱的双层网底始终保持一定的间距, 并未发生相互接触的情况。此外, 从其他波浪工况作用下的计算机仿真结果显示, 当波高和波周期取更大值时,

网箱的 2 层网底仍然可以保持相对平行的状态。究其原因,可能与上层网底通过 8 根绳索分别与上框架与底

框架连接有关,2 层网底框架与网箱整体结构可以保持相对同步的运动状态。

表 1 模型网箱参数

Tab.1 Properties of the flounder fish cage used for tests

构件 Component	参数 Parameter	规格 Specification
浮架 Floating frame	外径 External diameter	6 mm
	壁厚 Wall thickness	1 mm
	长度 Length	250 mm
	材料 Material	PMMA
浮子 Buoy	直径 Diameter	30 mm
	长度 Length	50 mm
	材料 Material	泡沫 Foam
网衣 Netting	网目尺寸 Mesh size	40 mm
	网线直径 Twine diameter	2 mm
	横向缩减系数 Horizontal hanging ratio	0.6
	纵向缩节系数 Vertical hanging ratio	0.8
	高度 Height	200 mm
底框架 Bottom frame	材料 Material	PE
	重量 Weight	100 g
绳索 Rope	材料 Material	钢管 Steel pipe
	直径 Diameter	1.2 mm
	材料 Material	PP

表 2 波浪工况
Tab.2 Wave conditions

项目 Items	序号 No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
波高 Wave height (cm)	9.0	9.0	9.0	12.0	12.0	12.0	15.0	15.0	15.0
周期 Wave Period (s)	1.0	1.2	1.4	1.0	1.2	1.4	1.0	1.2	1.4

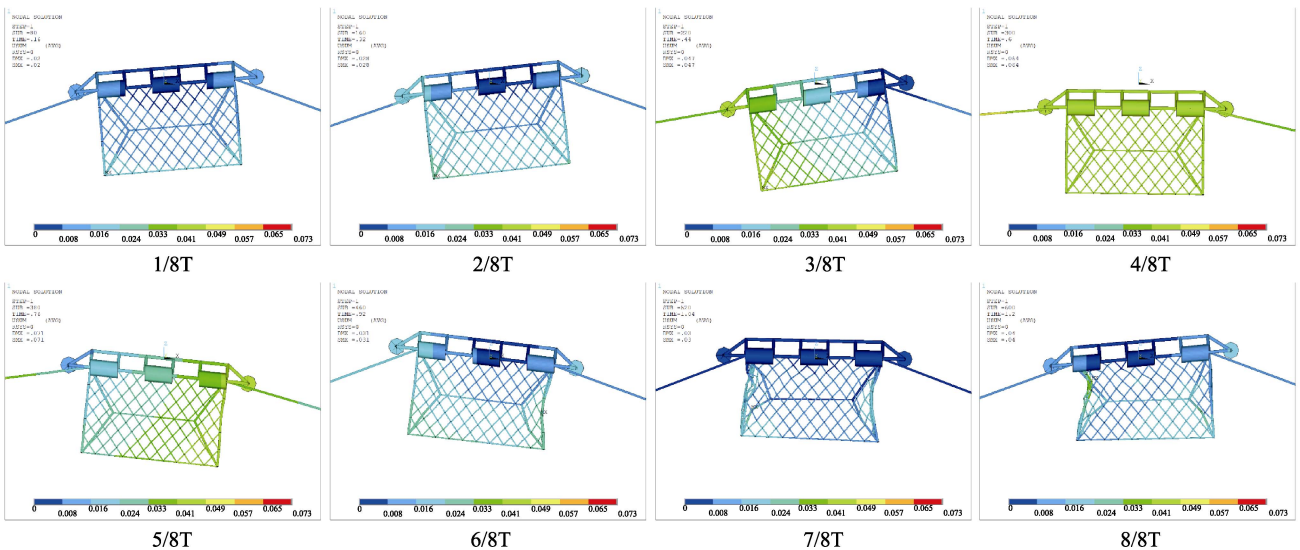


图 2 波浪作用下网箱变形模拟结果

Fig.2 Simulation results of flounder fish cages deformation under waves

2.2 网底位移与最大倾角

不同波浪工况作用下, 2 层网底在水平与垂直方向最大位移的比较值见图 3 和图 4。其中, 位移计算结果采用网底中心点位置。从图 3 可以看出, 当波浪工况相同时, 上层网底的水平位移均小于下层网底。2 层网底的水平位移随着波高与波周期的增加而增大, 其中, 当波高一定时, 最大水平位移随周期增加而增大的幅度较小; 当周期一定时, 最大位移随波高增加而增大的幅度较大。从图 4 可以看出, 当波浪工况一定时, 2 层网底的最大垂直位移值比较接近, 上层网底略小于下层网底, 仅在波高与周期取较大值时, 上层网底的垂直位移明显小于下层网底。由于 2 层网底在垂向的位移基本一致, 因此, 上层网底与下层网底框架可以保持稳定的间距。此外, 2 层网底的垂直位移随波高与波周期的变化趋势与图 3 所示的水平位移变化趋势基本相同。

上层网底与下层网底最大倾角随波浪变化模拟值的比较见图 5。从图 5 可以看出, 在同一波浪工况

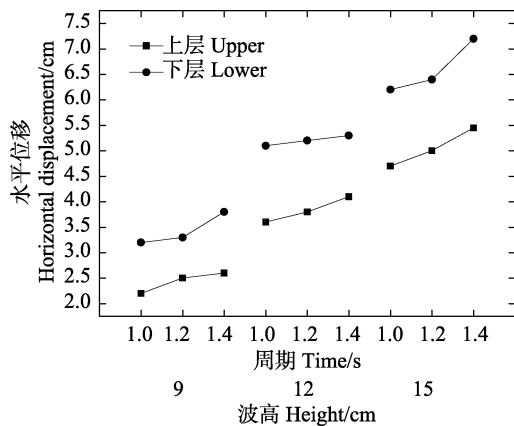


图 3 上层网底与下层网底水平位移

Fig.3 Horizontal displacement of the upper and lower bottom

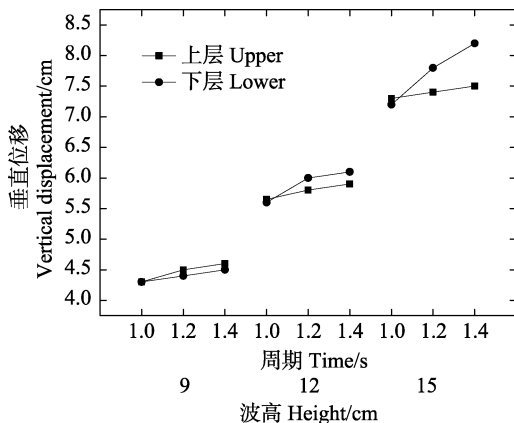


图 4 上层网底与下层网底垂直位移

Fig.4 Vertical displacement of the upper and lower bottom

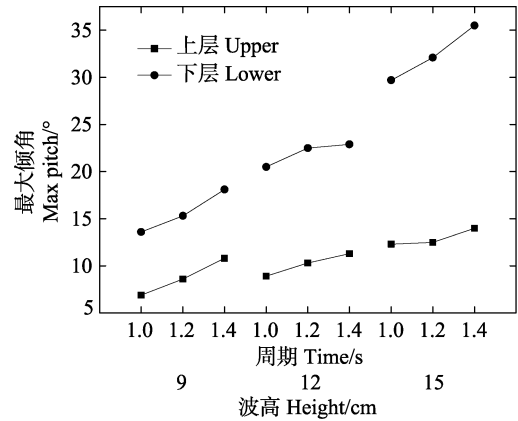


图 5 上层网底与下层网底最大倾角

Fig.5 Maximum pitch of the upper and lower bottom

作用下, 上层网底的最大倾角均小于下层网底, 并且 2 层网底取最大倾角时的倾斜方向一致, 均为逆时针方向。2 层网底的最大倾角均随波高与周期的增加而增大, 波高的改变对网底倾斜角度的影响更加显著。从数值上看, 上层网底的最大倾角范围为 7°~14°, 而下层网底的最大倾角约为 14°~36°。从模拟结果看, 同时参考图 2 所示的计算机仿真虚拟呈现, 2 层网底最大倾角的差值并不是很大, 二者的倾斜方向相同, 并且在垂直方向位移也基本相同, 因此, 2 层网底并不会发生接触碰撞而影响鲆鲽鱼类的安全生长。这与双层网底网箱在单纯水流作用下, 2 层网底由于倾斜方向相反而发生碰撞的情况差别明显。

本计算用例中, 双层网底网箱与崔勇(2012)所述单层网底网箱的网底最大位移值的比较见图 6 和图 7。其中, 双层网底网箱的水平与垂直位移均为下层网底。由图 6 和图 7 可以看出, 在相同波浪条件下, 双层网底网箱在水平与垂直方向的最大位移均小于单层网底网箱, 这可能与双层网底网箱的上层网底结构有关。由于上层网底的四角通过绳索分别与下层网底

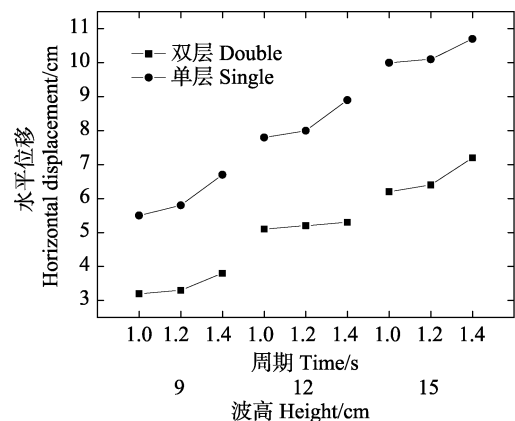


图 6 双层网底网箱与单层网底网箱水平位移

Fig.6 Horizontal displacement of the double and single bottom

四角相连接, 2层网底在波浪作用下的同步运动从而形成一个整体, 致使双层网底网箱在2个方向的最大位移均小于单层网底网箱。

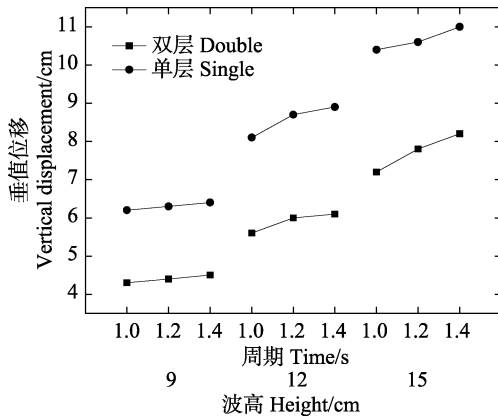


图7 双层网底网箱与单层网底网箱垂直位移

Fig.7 Vertical displacement of the double and single bottom

双层网底网箱与单层网底网箱在波浪作用下最大倾角变化的比较见图8。从图8可以看出, 当波浪工况相同时, 双层网底网箱下层网底的最大倾角均大于单层网底网箱, 这可能与双层网底网箱中上层网底的同步效应有关。从前面计算机模拟结果可以看出, 双层网底网箱的上层网底与下层网底在波浪作用下, 可以保持相对平行的状态, 2层网底通过绳索相连接, 作为整体结构惯性较大, 因而加剧了网底的倾斜。此结果与单纯水流作用下, 双层网底网箱与单层网底网箱比较恰恰相反。当水流作用时, 双层网底网箱的2层网底倾斜方向相反, 由于互相抵消作用而导致双层网底网箱的倾角小于单层网底网箱。

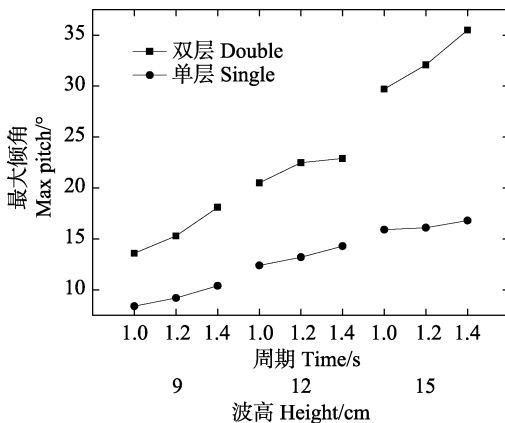


图8 双层网底网箱与单层网底网箱最大倾角

Fig.8 Maximum pitch of the double and single bottom

2.3 锚绳力

双层网底网箱与单层网底网箱迎波面最大锚绳

力的比较见图9。从图9可以看出, 2种结构网箱迎波面锚绳的最大张力随着波高与波周期的增加而增大。其中, 在波浪条件相同时, 双层网底网箱最大锚绳力均大于单层网底网箱。当波高为9 cm时, 双层网底网箱锚绳力略大于单层网底网箱; 当波高增加时, 双层网底网箱锚绳力明显大于单层网底网箱。这可能与波高较大时, 双层网底网箱作同步运动时惯性较大所致。此结果与2种网箱在单纯水流作用时的比较结果也有所不同。崔勇等(2016)研究表明, 单层网底网箱与双层网底网箱在水流作用下, 无论迎流面还是背流面最大锚绳力均差异不大, 究其原因可能与水流作用下双层网底网箱的2层网底的倾斜方向相反有关。

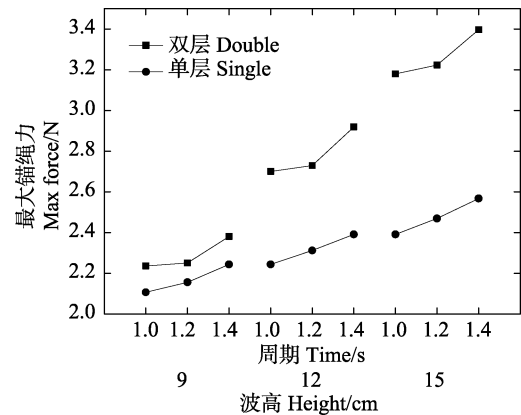


图9 双层网底网箱与单层网底网箱最大锚绳力比较

Fig.9 Comparison of the maximum mooring line force of single and double bottom floor

3 结论

本文利用有限元方法对一种双层网底鲆鲽网箱在波浪作用下的水动力特性进行了数值模拟研究, 对上层网底与下层网底的位移与最大倾角进行比较分析, 同时, 将双层网底网箱与单层网底网箱进行横向对比。从上述比较中可以看出, 在几种不同波浪工况作用下, 双层网底网箱的上、下2层网底最大倾角差距不大, 并且二者的倾斜方向始终一致。2层网底在垂直方向的位移也比较接近, 在波浪作用下可以保持相对平行的状态, 从而保证网底结构的稳定。在与单层网底网箱比较时可以看出, 双层网底网箱中的下层网底最大倾角要大于单层网底网箱, 约为单层网底网箱最大倾角的2倍。双层网底网箱与单层网底网箱位移比较时, 双层网底网箱中下层网底的位移要小于单层网底网箱, 这可能与双层网底网箱中上层网底的连接方式有关。此外, 对于波流联合作用下双层网底网箱水动力特性的研究, 有待于今后进一步开展。

参 考 文 献

- Incorporated. ANSYS user's manual. Canonsburg, USA: ANSYS, Incorporated, 2009, 270-275
- Cui Y, Guan CT, Wan R, *et al.* Numerical simulation of a flatfish cage system in waves and currents. *Aquacultural Engineering*, 2013, 56: 26-33
- Cui Y, Guan CT, Huang B, *et al.* Dynamic analysis of the long-line culture facility under waves. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 125-131 [崔勇, 关长涛, 黄滨, 等. 波浪作用下筏式养殖结构的动力分析. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 125-131]
- Cui Y, Guan CT, Li J, *et al.* Numerical simulation of the anti-current characteristics of double-bottom cages for flounder fish. *Fishery Modernization*, 2016, 43(6): 39-44 [崔勇, 关长涛, 李娇, 等. 双层网底鲆鲽网箱耐流特性的数值模拟. *渔业现代化*, 2016, 43(6): 39-44]
- Cui Y. Study on hydrodynamic characteristics of square flatfish cage. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [崔勇. 方形金属框架鲆鲽类网箱水动力学特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- DeCew J, Tsukrov I, Risso A, *et al.* Modeling of dynamic behavior of a single-point moored submersible fish cage under currents. *Aquacultural Engineering*, 2010, 43(2): 38-45
- Fredriksson DW, DeCew JC, Tsukrov I, *et al.* Development of large fish farm numerical modeling techniques with in-situ mooring tension comparisons. *Aquacultural Engineering*, 2007, 36(2): 137-148
- Fredriksson DW, Swift MR, Irish JD, *et al.* Fish cage and mooring system dynamics using physical and numerical models with field measurements. *Aquacultural Engineering*, 2003, 27(2): 117-146
- Gui FK, Zhao YP, Xu TJ, *et al.* Numerical simulation of dynamic response of a net cage for flatfish in waves. *China Ocean Engineering*, 2014, 28(1): 43-56
- Huang LY, Liang ZL, Song WH, *et al.* Experimental study on effect of reducing current velocity by square net cage structure. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 860-863 [黄六一, 梁振林, 宋伟华, 等. 方形箱网结构减流效果试验. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 860-863]
- Huang XH, Guo GX, Hu Y, *et al.* Numerical simulation of forces and motion deformation of deep-water net cages in waves and currents. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 443-450 [黄小华, 郭根喜, 胡昱, 等. 波流作用下深水网箱受力及运动变形的数值模拟. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 443-450]
- Lader PF, Enerhaug B. Experimental investigation of forces and geometry of a net cage in uniform flow. *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, 2005, 30(1): 79-84
- Lee CW, Kim YB, Lee GH, *et al.* Dynamic simulation of a fish cage system subjected to currents and wave. *Ocean Engineering*, 2008, 35(14-15): 1521-1532
- Li Q, Yang SG. The finite element dynamic analysis for self-elevating platform by ANSYS/multi-physics program. *China Offshore Platform*, 2003, 18(4): 41-46 [李茜, 杨树耕. 采用ANSYS程序的自升式平台结构有限元动力分析. *中国海洋平台*, 2003, 18(4): 41-46]
- Tsukrov I, Eroshkin O, Fredriksson DW, *et al.* Finite element modeling of net panels using a consistent net element. *Ocean Engineering*, 2003, 30(2): 251-270
- Zhao YP, Chen XF, Xu TJ, *et al.* Numerical investigation of hydrodynamic properties of gravity cage for flat-fish culture during exposure to wave action. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 889-899 [赵云鹏, 陈小芳, 许条建, 等. 波浪作用下一种鲆鲽类方形网箱水动力特性数值模拟研究. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 889-899]

(编辑 陈 严)

Numerical Simulation of the Hydrodynamic Characteristics of Double-Bottom Cage for Flounder Fish Under Waves

CUI Yong, GUAN Changtao^①, HUANG Bin, LI Jiao, GONG Pihai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071)

Abstract The double-bottom cages for flounder fish tend to move and deform under waves. Therefore, it is necessary to carry out hydrodynamic analysis for the stabilization of flounder fish cages. Herein, a numerical model of deformation of double-bottom cages under waves was established based on the finite element method, and then maximum displacement and the pitch of the double-bottom were calculated. First, results of the upper bottom were compared with that of the lower bottom. Afterwards, the results of the lower bottom of double-bottom cage were compared with that of the single-bottom cage. The simulation results showed that the two bottoms of double-bottom cages were able to stay relatively parallel during wave periods. The maximum displacement and pitch of the two bottoms increased along with not only wave height but also wave period. In addition, the inclined direction of the two bottoms was the same. Under the same wave conditions, the horizontal displacement and the maximum pitch of lower bottom were larger than those of the upper bottom, but their vertical displacements were not much different. It was found that the difference in pitch between upper and lower bottoms was the largest when the wave height was 15 cm and the wave period was 1.4 s. However, the upper and lower bottoms of the cage did not collide with each other, and the two bottoms of the cage could remain relatively stable. Moreover, under the same wave conditions, the displacement of the lower bottom of the double-bottom cage was less than that of the single-bottom cage, but the pitch of the lower bottom of the double-bottom cage was larger than that of the single-bottom cage. Additionally, the maximum mooring-line force of double-bottom cages for flounder fish was larger than that of single-bottom cages. Furthermore, the study on the hydrodynamic characteristics of double-bottom cages for flounder fish under the combined action of wave and flow should be carried out in the future.

Key words Double-bottom; Hydrodynamic characteristics; Finite element method; Cages for flounder fish

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180912001

http://www.yykxjz.cn/

张博伦, 郭彪, 于莹, 徐晓甫, 王硕. 基于稳定同位素技术的天津大神堂海域人工鱼礁区食物网结构研究. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 25-35
Zhang BL, Guo B, Yu Y, Xu XF, Wang S. Study of the food-web structure in the Dashentang artificial reef area in Tianjin Using a stable isotope technique. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 25-35

基于稳定同位素技术的天津大神堂海域人工鱼礁区食物网结构研究*



张博伦^{1,2} 郭彪^{1,2①} 于莹^{1,2} 徐晓甫^{1,2} 王硕^{1,2}

(1. 天津渤海水产研究所渔业资源与生态环境室 天津 300457;

2. 天津市海洋牧场技术工程中心 天津 300457)

摘要 本研究对2016年6月在天津大神堂3个礁区(2010年建成的鱼礁区; 2012年建成的鱼礁区; 2014年建成的鱼礁区)和对照区域采集的生物消费者及其食物源样品的碳、氮稳定同位素组成进行了分析, 通过 IsoSource 模型计算不同区域生物的食物网基础, 并利用氮稳定同位素数据计算消费者的营养级。结果显示, 根据 $\delta^{13}\text{C}$ 值可以将其食物源分为浮游植物、悬浮颗粒有机物(POM)和沉积相颗粒有机物(SOM)三类; 浮游植物对消费者的碳源贡献率(67.2%~81.5%)最大, 是大神堂海域的生物食物网的基础。不同区域同一食物源的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值没有显著性差异; 礁区内滤食性贝类毛蚶(*Arca subcrenata*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著高于对照区, 作为潜在碳源的浮游植物对其的贡献率显著增加。消费者的 $\delta^{15}\text{N}$ 值则介于 7.70‰~14.34‰之间, 消费者的营养级介于 2.0~3.95 级之间。游泳生物食性生物的 $\delta^{15}\text{N}$ 和营养级在礁区内有所提高, 礁区建成的年份越长, 其营养级与对照区域的差别越显著。稳定同位素研究表明, 人工鱼礁建设可能导致鱼礁区内滤食性生物的食物来源组成改变, 并提高游泳生物食性生物的营养级。

关键词 稳定同位素; 人工渔礁区; 食物网基础; 营养级

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0025-11

稳定同位素技术是揭示食物网中物质的循环路径和探究消费者、生产者间营养关系的一种重要方法(Tomasz *et al*, 2015; Serguei *et al*, 2014; Vinagre *et al*, 2012), 已经被广泛应用于水域生态系统食物网结构、营养关系及其动态变化的研究中(李忠义等,

2010; 魏虎进等, 2013; 麻秋云等, 2015; Serguei *et al*, 2014; Catarina *et al*, 2015)。与传统的胃含物分析法相比, 稳定同位素反映了生物体对食物的吸收并且是生物体长时期代谢的结果, 其不仅能表达生物体摄取的食物种类信息, 也表达了一段时间内生物体对食物

* 天津市水产局青年科技创新项目(J2016-10青)、天津市农业科技成果转化与推广项目(201304150)和天津市渔业发展服务中心青年科技创新项目(J2018-14青)共同资助[The work was supported by Projects of Youth Science and Technology Innovation of Tianjin Aquatic Products Bureau (J2016-10Qing), Tianjin Agricultural Science and Technology Achievement Transformation and Promotion Project(201304150), Projects of Youth Science and Technology Innovation of Tianjin Fishery Development Service Center (J2018-14Qing)]. 张博伦, E-mail: hello5521@163.com

① 通讯作者: 郭彪, 高级工程师, E-mail: oucguobiao@163.com

收稿日期: 2018-09-12, 收修改稿日期: 2018-10-19

的吸收信息(Kidd *et al.*, 1995); 因而突破了胃含物分析法研究生物摄食信息受时间和空间的限制(Kidd *et al.*, 1995; 万祎等, 2005)。氮稳定同位素沿食物链基本上是逐级递增(李忠义等, 2010; 谭鲁玉等, 2018), 所以氮稳定同位素用于计算生物的营养级, 其正确性也得到了广泛验证(李忠义等, 2010; 魏虎进等, 2013; 麻秋云等, 2015)。由于碳稳定同位素随营养层次的富集不明显, 其主要用于确定生物种的食物组成以及追踪生态系统中碳的来源(Fry, 1981; 李忠义等, 2005; 谢斌等, 2017)。

随着环渤海经济的快速发展、天津海岸带大规模的围填海工程建设、海洋捕捞业和矿产开采程度的增强, 天津市第一个国家级海洋特别保护区——天津大神堂牡蛎礁国家级海洋特别保护区海洋生态系统受到的压力也逐年增加。为保护牡蛎礁区的生物资源和生态环境, 天津市在大神堂海域开展了一系列海洋生态修复措施, 人工鱼礁建设是其中重要的一项。在进行人工鱼礁建设过程中, 了解食物网的营养基础和结构非常重要。目前关于天津市大神堂海域人工鱼礁区的报道主要集中在生物群落结构和重金属分布方面

(郭彪等, 2015; 贾婷婷等, 2015; 戴媛媛等, 2016), 未见食物网方面的报道。

因此, 本研究利用稳定同位素技术对天津市大神堂海域人工鱼礁区食物网进行研究, 探讨主要生物种类的碳氮稳定同位素特征, 进而分析不同碳源对食物网的贡献和营养结构特征, 旨在为深入研究天津大神堂海域生物群落的营养结构以及食物网的物质循环和能量流动提供基础资料, 为从营养结构角度定量评价人工鱼礁的生态效果提供参考数据, 为开展海洋生态修复与保护研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 站位设置

2016年6月分别在2010年、2012年和2014年建成的3个人工鱼礁区各设置3个采样占位, 另外礁区外围设置3个采样占位作为对照(图1)。在上述12个点位进行浮游动植物、悬浮颗粒有机物(POM)、沉积相颗粒有机物(SOM)、底栖生物和游泳动物样品采集。

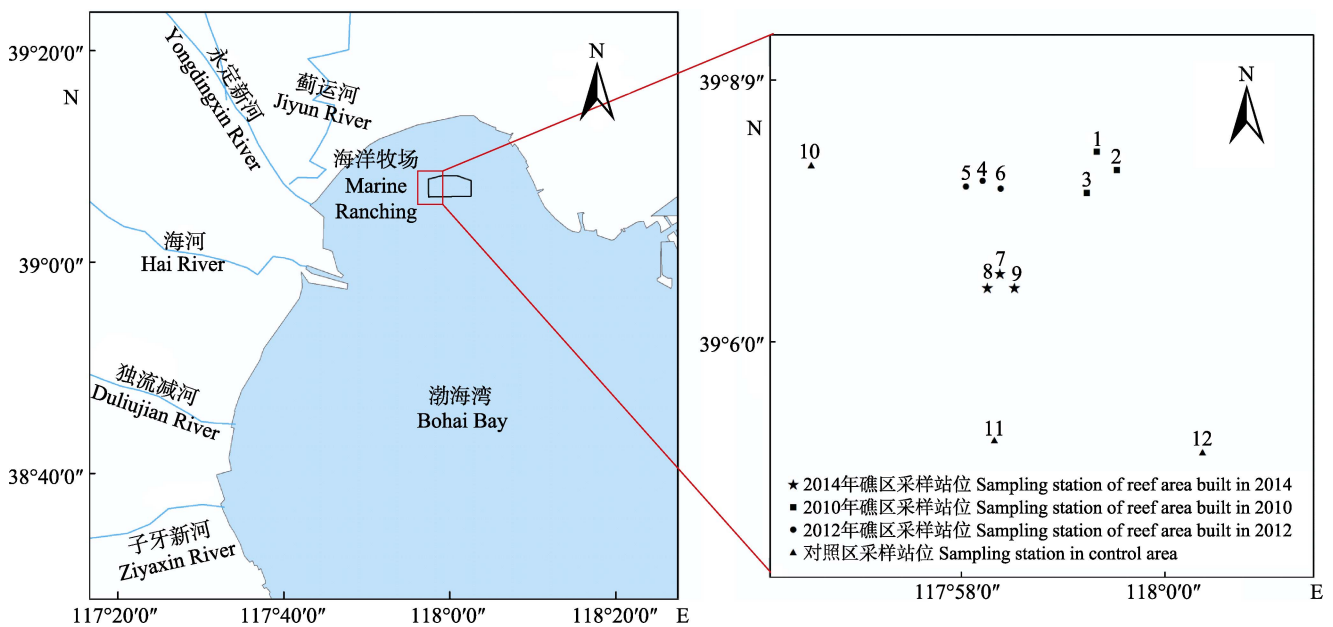


图1 采样占位设置

Fig.1 Location of sampling stations

1.2 样品采集与处理

浮游植物使用浅水Ⅲ型浮游生物网进行从水底至水表垂直拖网采样; 浮游动物采用浅水Ⅰ型浮游生物网, 从水底至水表垂直拖网采样; 使用箱式采泥器采集 SOM 样品; 利用箱式采泥器收集底栖大型无脊椎动物; 游泳生物样品利用底拖网和地笼进行采集。

在实验室内, 浮游植物样品用 160 μm 的筛绢进行过滤, 除去浮游动物和碎屑等, 经筛绢过滤后的浮游植物样品过滤到预先经马弗炉 500 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 5 h 的 Whatman GF/F 膜上。底栖大型无脊椎生物和浮游动物置于预先经 0.22 μm 滤膜过滤的海水中暂养 2-4 h, 等排空胃含物后取样。采集表层水 2 dm^3 , 过 170 μm

的筛绢后过滤到预先经马弗炉 500℃灼烧 5 h 的 GF/F 膜上收集 POM 样品。沉积物样品经过 63 μm 的筛绢分筛, 所获得的颗粒物即为 SOM 样品。鱼类取适量背部白肌, 虾取腹部肌肉, 贝类取闭壳肌, 蟹取其螯肢肌肉用于稳定同位素分析, 所有样品使用冷冻干燥机于-50℃冻干; 然后置于洁净的干燥器中用 12 mol/dm³ 的盐酸(HCl)熏 48 h, 经石英研钵充分研磨后使用稳定同位素比值分析仪进行同位素分析。

1.3 稳定性同位素分析

实验样品的稳定同位素分析在天津国际医药联合研究院进行, 运用英国 GV 公司的 IsoPrime 稳定同位素质谱仪测定样品的碳、氮稳定同位素比值。

碳、氮稳定同位素比值用国际通用的 δ 值表示, 分别以 VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) 国际标准和大气氮作为参考标准。δ¹³C、δ¹⁵N 分别按以下公式算出:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left(\frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{sample}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{VPDB}}} - 1 \right) \times 1000$$

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \left(\frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{sample}}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{air}}} - 1 \right) \times 1000$$

式中, ¹³C/¹²C_{VPDB} 为国际标准物 VPDB 的碳同位素比值, ¹⁵N/¹⁴N_{air} 为标准大气氮同位素比值。为保持实验结果的准确性和仪器的稳定性, 每测 5 个样品后加测 1 个标准样, 个别样品则进行 2~3 次复测。

1.4 数据处理

利用 IsoSource 模型来计算各个食源对消费者的贡献率(Schwarcz, 1991), 其原理是根据质量守恒原理: 1 种同位素及 2 种食物来源的能量守恒方程为:

$$\delta J_M = f_A \delta J_A + f_B \delta J_B$$

$$1 = f_A + f_B$$

式中, J_M 为消费者 M 的 1 种同位素 J 的比值; A、B 为食物源; f 为食物对消费者的贡献率。

利用 2 种稳定同位素可对 3 种及 3 种以上食物的贡献比例进行计算:

$$\delta J_M = f_A \delta J_A + f_B \delta J_B + f_C \delta J_C$$

$$\delta K_M = f_A \delta K_A + f_B \delta K_B + f_C \delta K_C$$

$$1 = f_A + f_B + f_C$$

式中, J_M 、 K_M 为消费者 M 的 2 种同位素 J 、 K 的比值; A、B、C 为食物源; f 为食物对消费者的贡献率。本研究利用 Phillips 等(2003)利用质量守恒原理反复叠加编写的 IsoSource 模型来计算各食源对消费者的贡献率。

通过氮稳定同位素比值测定, 分析天津海域非鱼礁区海洋生物营养级。其计算公式如下:

$$\text{TL} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{SC}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{blv}} + \lambda}{\text{TEF}}$$

式中, λ 为基准生物的营养级; TEF 为 1 个营养级的氮富集度; $\delta^{15}\text{N}_{\text{blv}}$ 为基准生物的 $\delta^{15}\text{N}$ 比值, 本研究计划选用浮游动物整体的氮稳定同位素平均值作为基准值(Baseline value); $\lambda=2$ (魏虎进等, 2013); TEF 为 1 个营养级的氮富集度, 平均值为 3.4‰ (Minagawa *et al.*, 1984); $\delta^{15}\text{N}_{\text{SC}}$ 为所测海洋生物的 $\delta^{15}\text{N}$ 比值。

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 采用单因素(One-way ANOVA)进行方差分析或 T 检验, 利用 Excel 2010 和 Grapher 5.0 软件作图。图表中数据为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果与分析

2.1 不同海域消费者潜在食源的 δ¹³C、δ¹⁵N 值

天津市大神堂海洋牧场不同年份礁区及对照区域潜在食源碳、氮同位素比值如表 1 和表 2 所示。经单因素方差检验, 同一食源的 δ¹³C、δ¹⁵N 值在不同区域之间没有显著性差异, 不同食源之间的碳、氮稳定同位素比值存在显著差异($P<0.05$)。

表 1 消费者潜在碳源的 δ¹³C 值(‰)

Tab.1 Values of δ¹³C for the potential carbon sources (‰)

种类 Category	沉积质 SOM	悬浮颗粒有机物 POM	浮游植物 Phytoplankton
2010 年礁区 The reef area built in 2010	-22.74±0.36 ^a	-23.47±0.40 ^b	-18.04±0.32 ^c
2012 年礁区 The reef area built in 2012	-22.48±0.53 ^a	-23.48±0.48 ^b	-18.05±0.11 ^c
2014 年礁区 The reef area built in 2014	-22.35±0.35 ^a	-23.61±0.54 ^b	-18.08±0.16 ^c
对照区 The control area	-22.59±0.35 ^a	-23.39±0.37 ^b	-18.03±0.34 ^c
均值 The average value	-22.54±0.37 ^a	-23.49±0.39 ^b	-18.05±0.22 ^c

注: 同行不同字母表示 3 种潜在碳源之间的 δ¹³C 值差异显著($P<0.05$), 下同

Note: Different letters in each row meant significant difference among the δ¹³C values of three potential carbon sources at 0.05 level. The same as below

表2 消费者潜在氮源的 $\delta^{15}\text{N}$ 值(‰)
Tab.2 Values of $\delta^{15}\text{N}$ for the potential nitrogen sources (‰)

种类 Category	沉积质 SOM	悬浮颗粒有机物 POM	浮游植物 Phytoplankton
2010年礁区 The reef area built in 2010	6.48±0.20 ^a	3.46±0.50 ^b	5.59±0.16 ^c
2012年礁区 The reef area built in 2012	6.49±0.36 ^a	3.63±0.25 ^b	5.52±0.17 ^c
2014年礁区 The reef area built in 2014	6.55±0.06 ^a	3.65±0.12 ^b	5.59±0.11 ^c
对照区 The control area	6.35±0.27 ^a	3.61±0.22 ^b	5.58±0.23 ^c
均值 The average value	6.47±0.23 ^a	3.59±0.17 ^b	5.57±0.15 ^c

2.2 不同海域消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 值

天津市大神堂海洋牧场不同年份鱼礁区及对照区域消费者碳、氮同位素比值如图2所示。对照区域

消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布从菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的-18.53‰到中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)的-17.27‰; $\delta^{15}\text{N}$ 值分布从浮游动物的7.73‰

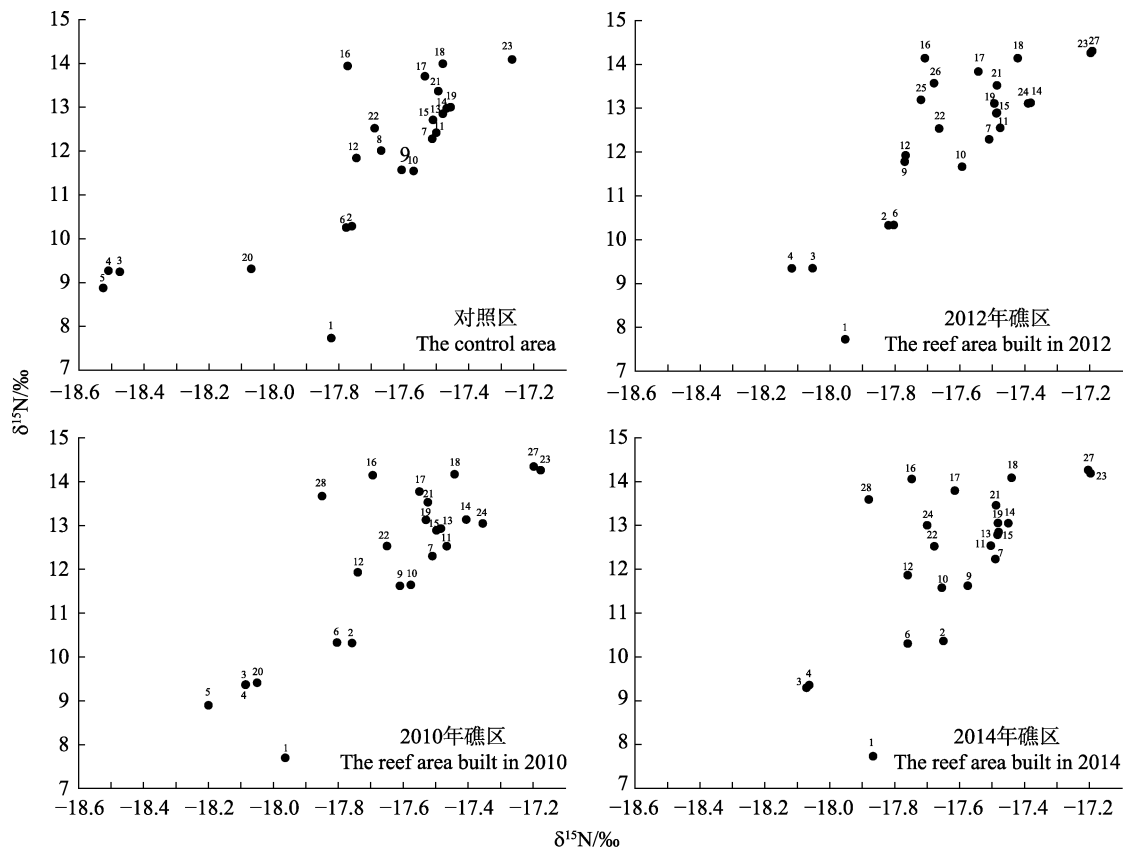


图2 不同海域消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值
Fig.2 Values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of different species from different areas

- 1: 浮游动物; 2: 扁玉螺; 3: 毛蚶; 4: 菲律宾蛤仔; 5: 长牡蛎; 6: 脉红螺; 7: 葛氏长臂虾; 8: 海蜃虾; 9: 日本鼓虾; 10: 鲜明鼓虾; 11: 口虾蛄; 12: 中国明对虾; 13: 火枪乌贼; 14: 隆线强蟹; 15: 日本关公蟹; 16: 日本蛄; 17: 三疣梭子蟹; 18: 斑尾刺鲷虎鱼; 19: 六丝钝尾鰕虎鱼; 20: 鲛; 21: 短吻红舌鲷; 22: 斑鲹; 23: 中国花鲈; 24: 长蛸; 25: 拉氏狼牙鰕虎鱼; 26: 尖嘴扁颌针鱼; 27: 许氏平鲈; 28: 钟馗鰕虎鱼
- 1: Phytoplankton; 2: *Glossaulax didyma*; 3: *A. subcrenata*; 4: *R. philippinarum*; 5: *C. gigas*; 6: *Rapana venosa*; 7: *Palaemon gravieri*; 8: *Latreutes anoplonyx*; 9: *Alpheus japonicus*; 10: *Alpheus distinguendus*; 11: *Squilla orarotia*; 12: *Fenneropenaeus chinensis*; 13: *Loligo beka*; 14: *Eucrate crenata*; 15: *Dorippe japonica*; 16: *Charybdis japonica*; 17: *Portunus trituberculatus*; 18: *Synechogobius ommaturus*; 19: *Amblychaeturichthys hexanema*; 20: *Liza haematocheila*; 21: *Cynoglossus joyneri*; 22: *Konosirus punctatus*; 23: *L. maculatus*; 24: *Octopus variabilis*; 25: *Odontamblyopus lacepedii*; 26: *Ablennes anastomella*; 27: *S. schlegeli*; 28: *T. barbatus*

到中国花鲈的 14.12‰。2010 年礁区海域消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布从长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的-18.20‰到中国花鲈的-17.18‰; $\delta^{15}\text{N}$ 值分布从浮游动物的 7.70‰到许氏平鲈(*Sebastes fuscescens*)的 14.34‰。2012 年礁区海域消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布从菲律宾蛤仔的-18.12‰到许氏平鲈的-17.19‰; $\delta^{15}\text{N}$ 值分布从浮游动物的 7.73‰到许氏平鲈的 14.30‰。2014 年礁区海域消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布从毛蚶(*Arca subcrenata*)的-18.07‰到中国花鲈的-17.20‰; $\delta^{15}\text{N}$ 值分布从浮游动物的 7.73‰到许氏平鲈的 14.26‰。

除海蜆虾 (*Latreutes anoplonyx*)、鮨 (*Liza haematocheila*)、拉氏狼牙鰕虎鱼 (*Odontamblyopus lacepedii*)、钟馗鰕虎鱼 (*Tridentiger barbatus*)和尖嘴扁

颌针鱼(*Ablennes anastomella*)因样本量较少无法进行统计分析外,对不同海域同一消费者的碳、氮同位素比值分别进行单因素方差分析或 *T* 检验。对照区域毛蚶和菲律宾蛤仔的 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著低于礁区海域($P<0.05$);长牡蛎在 2012 年和 2014 年礁区未捕获,经 *T* 检验,对照区域长牡蛎的 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著低于 2010 年礁区海域;其他渔获种类经统计分析, $\delta^{13}\text{C}$ 值未发现显著性差异(表 3)。大部分渔获种类的 $\delta^{15}\text{N}$ 值未发现统计学差异,但对照海域口虾蛄(*Squilla orarotia*)、隆线强蟹(*Eucrate crenata*)、日本关公蟹(*D. japonica*)、日本蛄(*C. japonica*)、斑尾刺鰕虎鱼(*Synechogobius ommaturus*)、短吻红舌鰕(*Cynoglossus joyneri*)和中国花鲈的 $\delta^{15}\text{N}$ 值显著低于部分年份礁区或全部年份礁区($P<0.05$) (表 4)。

表 3 不同海域统计学 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在差异的物种(‰)¹
Tab.3 Species with different values of $\delta^{13}\text{C}$ from different areas (‰)¹

物种 Species	对照区 The control area	2010 年礁区 The reef area built in 2010	2012 年礁区 The reef area built in 2012	2014 年礁区 The reef area built in 2014	单因素方差 分析结果 ANOVA result
毛蚶 <i>A. subcrenata</i>	-18.48±0.09 ^a	-18.09±0.10 ^b	-18.06±0.13 ^b	-18.07±0.18 ^b	$F_{3,15} = 9.551$ $P = 0.001$
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	-18.51±0.09 ^a	-18.09±0.11 ^b	-18.12±0.11 ^b	-18.06±0.10 ^b	$F_{3,12} = 16.432$ $P = 0.000$
长牡蛎 ² <i>C. gigas</i>	-18.53±0.10 ^a	-18.20±0.01 ^b			$F = 2.131$ $P = 0.007$

注: 1: 同行不同字母表示该物种在不同海域的 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在差异显著($P<0.05$); 2: 长牡蛎的数据不满足单因素方差分析条件, 故进行 *T* 检验

Note: 1: Different letters in each row meant significant difference among the $\delta^{13}\text{C}$ values of the same species from different areas at 0.05 level; 2: Due to the values of *C. gigas* does not meet the condition of ANOVA analyze, *T*-test was performed

表 4 不同海域统计学 $\delta^{15}\text{N}$ 值存在差异的物种(‰)
Tab.4 Species with different in values of $\delta^{15}\text{N}$ from different areas (‰)

物种 Species	对照区 The control area	2010 年礁区 The reef area built in 2010	2012 年礁区 The reef area built in 2012	2014 年礁区 The reef area built in 2014	单因素方差 分析结果 ANOVA result
口虾蛄 <i>S. orarotia</i>	12.42±0.09 ^a	12.53±0.08 ^b	12.55±0.07 ^b	12.54±0.05 ^b	$F_{3,16} = 3.529$ $P = 0.039$
隆线强蟹 <i>E. crenata</i>	12.97±0.06 ^a	13.13±0.13 ^b	13.12±0.10 ^b	13.05±0.05 ^{ab}	$F_{3,16} = 2.914$ $P = 0.066$
日本关公蟹 <i>D. japonica</i>	12.71±0.08 ^a	12.89±0.10 ^b	12.89±0.04 ^b	12.78±0.06 ^{ab}	$F_{3,10} = 2.564$ $P = 0.113$
日本蛄 <i>C. japonica</i>	13.94±0.06 ^a	14.15±0.05 ^b	14.14±0.08 ^b	14.06±0.10 ^{ab}	$F_{3,13} = 6.004$ $P = 0.009$
斑尾刺鰕虎鱼 <i>S. ommaturus</i>	13.99±0.13 ^a	14.17±0.09 ^b	14.14±0.11 ^{ab}	14.10±0.12 ^{ab}	$F_{3,16} = 2.344$ $P = 0.112$
短吻红舌鰕 <i>C. joyneri</i>	13.37±0.07 ^a	13.53±0.06 ^b	13.52±0.04 ^b	13.46±0.06 ^b	$F_{3,16} = 8.007$ $P = 0.002$
中国花鲈 <i>L. maculatus</i>	14.09±0.04 ^a	14.26±0.06 ^b	14.26±0.12 ^b	14.19±0.05 ^{ab}	$F_{3,16} = 3.406$ $P = 0.067$

2.3 潜在碳源对不同海域消费者的贡献率

近岸水域生态系统结构中消费者的碳源主要来源于浮游植物、底栖微藻、沉积相有机物、悬浮颗粒有机物、大型海藻、海草等。考虑到天津大神堂海域大型海藻和海草缺失,本研究在计算潜在碳源对消费者的贡献率时,只考虑浮游植物、SOM和POM。如表5所示,无论是在对照海域还是不同年份人工鱼礁区域,浮游植物占海区消费者的碳源比例最大,其数值范围为67.2%(对照区的菲律宾蛤仔)~81.5%[(2014年礁区的扁玉螺(*Gossaulax. didyma*)] ; SOM和POM占

海区消费者碳源的比例相近。

潜在碳源对不同海域大多数消费者的贡献率基本相似,但一些滤食性贝类(毛蚶、菲律宾蛤仔和长牡蛎)在不同海域有所差别。在对照区,浮游植物、SOM和POM对菲律宾蛤仔的碳源贡献率分别是67.2%、17.7%和15.1%;在不同年份的礁区,浮游植物、SOM和POM对菲律宾蛤仔的碳源贡献率相似,2010年礁区分别为75.2%、14.8%和10.0%,2012年礁区分别为75.0%、13.3%和11.7%,2014年礁区分别为75.9%、13.7%和10.4%。浮游植物对礁区内非

表5 基于 IsoSource 混合模型计算出的潜在碳源对消费者的贡献率(%)

Tab.5 Results of the IsoSource model for consumers mean contributions of primary producers to consumer nutrition (%)

物种 Species	对照区 The control area			2010年礁区 The reef area built in 2010			2012年礁区 The reef area built in 2012			2014年礁区 The reef area built in 2014		
	Phyto-plankton	SOM	POM	Phyto-plankton	SOM	POM	Phyto-plankton	SOM	POM	Phyto-plankton	SOM	POM
扁玉螺 <i>G. didyma</i>	79.7	10.7	9.7	79.5	11.0	9.5	78.1	12.6	9.3	81.5	10.8	7.8
毛蚶 <i>A. subcrenata</i>	68.1	16.7	15.2	75.2	14.8	10.0	76.0	14.3	9.7	75.9	13.7	10.4
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	67.2	17.7	15.1	75.2	14.8	10.0	75.0	13.3	11.7	75.9	13.7	10.4
长牡蛎 <i>C. gigas</i>	68.1	16.7	15.2	74.3	15.0	10.7	/	/	/	/	/	/
脉红螺 <i>R. venosa</i>	79.5	10.3	10.2	78.5	11.8	9.7	78.5	12.0	9.5	79.5	11.3	9.2
葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	79.0	11.5	9.5	78.8	12.2	9.0	79.2	10.3	10.4	79.5	11.8	8.7
海蜇虾 <i>L. anoplonyx</i>	76.4	13.4	10.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/
日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>	79.2	10.6	10.2	78.8	11.8	9.4	74.8	15.6	9.5	79.5	11.8	8.7
鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>	79.8	11.8	8.4	79.5	10.8	9.7	79.2	10.8	10.0	78.2	11.4	10.5
口虾蛄 <i>S. orarotia</i>	78.8	12.2	9.0	79.2	11.0	9.8	78.8	12.7	8.6	78.5	11.5	10.0
中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	75.4	14.2	10.5	75.0	15.1	9.9	75.1	12.3	12.6	75.2	13.4	11.5
长蛸 <i>O. variabilis</i>	/	/	/	80.0	10.9	9.1	79.1	11.6	9.3	73.0	15.7	11.3
火枪乌贼 <i>L. beka</i>	78.0	12.3	9.7	77.5	13.3	9.2	77.8	12.2	10.0	78.0	12.3	9.7
隆线强蟹 <i>E. crenata</i>	78.0	11.9	10.1	78.5	12.8	8.7	79.4	10.4	10.1	78.2	11.3	10.4
日本关公蟹 <i>D. japonica</i>	77.7	13.0	9.3	77.3	13.3	9.3	77.8	12.4	9.8	78.2	11.8	10.0
日本蟳 <i>C. japonica</i>	69.2	15.8	14.9	70.0	16.3	13.7	69.7	17.2	13.2	69.7	14.2	16.2
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	74.5	14.4	11.2	74.0	14.0	12.0	73.9	14.7	11.4	72.7	14.6	12.6
拉氏狼牙虾虎鱼 <i>O. lacepedii</i>	/	/	/	/	/	/	76.1	16.2	11.7	/	/	/
钟馗鰕虎鱼 <i>T. barbatus</i>	/	/	/	68.1	17.4	14.4	/	/	/	67.9	17.6	14.6
斑尾刺鰕虎鱼 <i>S. ommaturus</i>	75.0	12.9	12.1	75.0	13.9	11.1	75.8	12.4	11.8	75.2	14.6	10.2
六丝钝尾鰕虎鱼 <i>A. hexanema</i>	78.3	11.0	10.7	76.0	14.1	9.9	77.0	12.9	10.1	77.5	12.0	10.5
鲛 <i>L. haematocheila</i>	76.0	13.1	10.9	76.2	12.4	11.5	/	/	/	/	/	/
短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	76.2	13.6	10.2	74.8	15.6	9.5	76.2	12.4	11.5	76.0	14.1	9.9
斑鲷 <i>K. punctatus</i>	74.9	12.7	12.4	75.2	14.6	10.2	75.1	14.3	10.6	75.2	12.4	12.5
尖嘴扁颌针鱼 <i>A. anastomella</i>	/	/	/	/	/	/	72.0	15.1	12.9	/	/	/
中国花鲈 <i>L. maculatus</i>	78.6	12.9	8.5	80.5	9.0	10.5	79.5	13.0	7.5	79.9	11.9	8.2
许氏平鲈 <i>S. schlegeli</i>	/	/	/	79.5	11.3	9.2	79.6	12.6	7.9	79.5	12.3	8.3

律宾蛤仔的碳源贡献率约是其在对照区的 1.12 倍, 而 SOM 和 POM 的贡献率相应下降。毛蚶和长牡蛎在不同海域具有相似性规律。

2.4 消费者的营养级

经计算, 天津大神堂海域对照区、2010 年礁区、2012 年礁区和 2014 年礁区主要消费者生物种类的营养级范围分别在 2.00~3.87、2.00~3.95、2.00~3.93 和 2.00~3.92; 4 个不同区域的营养层次均为三级(图 3)。

不同区域主要消费者生物种类的营养层次相对位置类似, 除头足类外, 其他软体动物的营养级均低于 3。鱼类中, 除鲮的营养级低于 3 外, 其他鱼类的营

养级在 3.41~3.95 之间, 营养级最高的为许氏平鲈。头足类和虾蟹类均属于第 III 营养层次(3-4), 头足类、虾类和蟹类营养级最高分别为长蛸、口虾姑和日本蝠(图 3)。

除海蜇虾、鲮、拉氏狼牙鰕虎鱼、钟馗鰕虎鱼和尖嘴扁颌针鱼因样本量较少无法进行统计分析外, 对不同海域同一消费者的营养级分别进行单因素方差分析或 *T* 检验。对照区域口虾姑、隆线强蟹、日本关公蟹、日本蝠、斑尾刺鰕虎鱼、六丝钝尾鰕虎鱼、短吻红舌鲷和中国花鲈的营养级显著低于部分年份礁区或全部年份礁区($P < 0.05$)。仅短吻红舌鲷和许氏平鲈的营养级在不同年份礁区出现了差异, 2010 年礁区显著高于 2014 礁区($P < 0.05$) (表 6)。

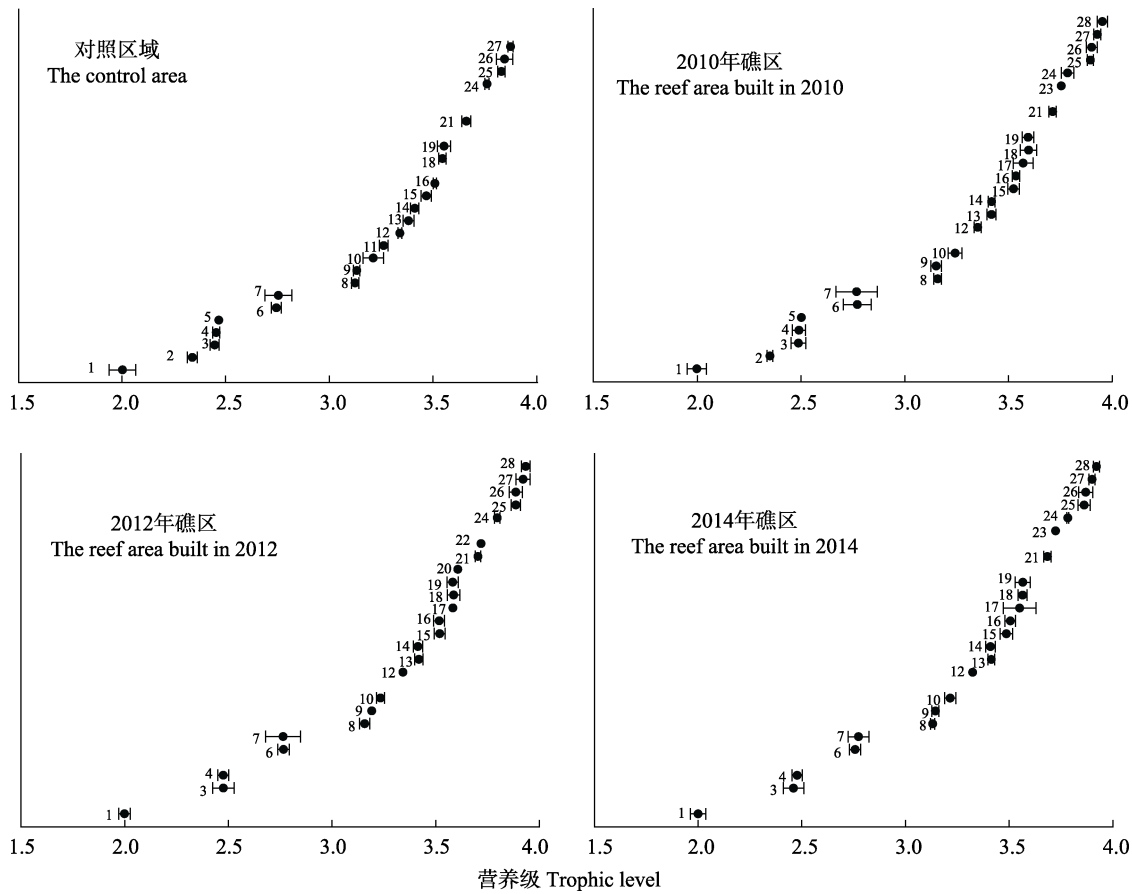


图 3 不同海域消费者营养级的分布
Fig.3 Trophic level of all consumers form different areas

- 1: 浮游动物; 2: 长牡蛎; 3: 毛蚶; 4: 菲律宾蛤仔; 5: 鲮; 6: 脉红螺; 7: 扁玉螺; 8: 鲜明鼓虾; 9: 日本鼓虾; 10: 中国明对虾; 11: 海蜇虾; 12: 葛氏长臂虾; 13: 口虾姑; 14: 斑蟹; 15: 日本关公蟹; 16: 火枪乌贼; 17: 长蛸; 18: 隆线强蟹; 19: 六丝钝尾鰕虎鱼; 20: 拉氏狼牙鰕虎鱼; 21: 短吻红舌鲷; 22: 尖嘴扁颌针鱼; 23: 钟馗鰕虎鱼; 24: 三疣梭子蟹; 25: 日本蝠; 26: 斑尾刺鰕虎鱼; 27: 中国花鲈; 28: 许氏平鲈
- 1: Phytoplankton; 2: *C. gigas*; 3: *A. subcrenata*; 4: *R. philippinarum*; 5: *L. haematocheila*; 6: *R. venosa*; 7: *G. didyma*; 8: *A. distinguendus*; 9: *A. japonicus*; 10: *F. chinensis*; 11: *L. anoplonyx*; 12: *P. gravieri*; 13: *S. orarotia*; 14: *K. punctatus*; 15: *D. japonica*; 16: *L. beka*; 17: *O. variabilis*; 18: *E. crenata*; 19: *A. hexanema*; 20: *O. lacepedii*; 21: *C. joyneri*; 22: *A. anastomella*; 23: *Tridentiger barbatus*; 24: *P. trituberculatus*; 25: *C. japonica*; 26: *S. ommaturus*; 27: *L. mac ulates*; 28: *S. schlegeli*

表6 不同海域统计学营养级存在差异的物种(‰)
Tab.6 Species with differences in trophic level from different area (‰)

物种 Species	对照区 The control area	2010年礁区 The reef area built in 2010	2012年礁区 The reef area built in 2012	2014年礁区 The reef area built in 2014	单因素方差 分析结果 ANOVA result
口虾蛄 <i>S. orarotia</i>	3.38±0.03 ^a	3.42±0.02 ^b	3.42±0.02 ^b	3.41±0.02 ^b	$F_{3,16}=4.034$ $P=0.026$
隆线强蟹 <i>E. crenata</i>	3.54±0.02 ^a	3.60±0.04 ^b	3.59±0.03 ^b	3.56±0.02 ^{ab}	$F_{3,16}=3.540$ $P=0.039$
日本关公蟹 <i>D. japonica</i>	3.47±0.02 ^a	3.53±0.03 ^b	3.52±0.03 ^b	3.49±0.03 ^{ab}	$F_{3,10}=3.130$ $P=0.074$
日本蛄 <i>C. japonica</i>	3.83±0.02 ^a	3.90±0.02 ^b	3.89±0.02 ^b	3.86±0.03 ^b	$F_{3,13}=7.006$ $P=0.005$
斑尾刺鰓虎鱼 <i>S. ommaturus</i>	3.84±0.04 ^a	3.90±0.03 ^b	3.89±0.03 ^{ab}	3.87±0.03 ^{ab}	$F_{3,16}=3.007$ $P=0.061$
六丝钝尾鰓虎鱼 <i>A. hexanema</i>	3.55±0.03 ^a	3.60±0.03 ^b	3.58±0.03 ^{ab}	3.57±0.04 ^{ab}	$F_{3,16}=2.270$ $P=0.120$
短吻红舌蛄 <i>C. joyneri</i>	3.66±0.02 ^a	3.71±0.02 ^b	3.70±0.01 ^{bc}	3.68±0.02 ^c	$F_{3,16}=10.766$ $P=0.000$
中国花鲈 <i>L. maculatus</i>	3.87±0.01 ^a	3.93±0.02 ^b	3.92±0.02 ^b	3.90±0.01 ^b	$F_{3,9}=4.227$ $P=0.040$
许氏平鲉 <i>S. schlegeli</i>	/	3.95±0.03 ^a	3.93±0.02 ^{ab}	3.92±0.01 ^b	$F_{2,11}=3.396$ $P=0.071$

注：同行不同字母表示该物种在不同海域的营养级存在差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters in each row meant significant difference among the trophic levels of the same species from different areas at 0.05 level

3 讨论

驱动整个近岸水域生态系统运转的能量主要来源于初级生产者所提供的碳源,主要由 POM、SOM、浮游植物和大型海藻组成(魏虎进等, 2013; 蔡德陵等, 2005)。天津海域大型海藻缺失, 因此其碳源主要为 POM、SOM 和浮游植物。由于不同海区中 POM 和 SOM 的潜在源不同, 其稳定同位素值可能有所差异。浮游植物的碳稳定同位素组成主要来自海洋水体中的溶解无机碳(DIC), $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 -22‰ ~ -18‰ , 并且存在着与温度和纬度的差异(吴莹等, 2002; 郭卫东等, 2001); 典型的海源有机质(主要指浮游植物)的 $\delta^{15}\text{N}$ 值介于 3‰ ~ 12‰ 之间(Maksymowska *et al.*, 2002)。本研究中 POM、SOM 和浮游植物碳、氮稳定同位素值均符合上述研究中的数值范围, 但与万祎等(2005)研究结果相比, 数值偏高, 这可能与采样时间不同有关(谢斌等, 2017; 吴莹等, 2002)。本研究中, POM、SOM 和浮游植物碳、氮稳定同位素值在 4 个不同海域没有显著性差异。大神堂海域人工鱼礁区与对照区相比, 浮游植物丰度明显增加, 但种类组成变化不大(戴媛媛等, 2018); 这佐证本研究中食物源的碳、氮稳

定同位素值在礁区和非礁区没有显著性差异的结论。

毛蚶、菲律宾蛤仔和长牡蛎 3 种滤食性贝类, 其主要食物为有机碎屑和浮游植物, 虽然大神堂海域人工鱼礁区与对照区相比, 浮游植物的种类组成变化不大, 但浮游植物的丰度增加(戴媛媛等, 2018)。因此, 礁区中这 3 种滤食性贝类其摄食的食物组成中, 浮游植物量可能会相应增加。基于 IsoSource 模型计算的潜在碳源对消费者贡献率结果显示, 浮游植物对礁区中毛蚶、菲律宾蛤仔和长牡蛎的贡献率显著高于对照区域。3 种潜在碳源中, 浮游植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值最高, 因而本研究中礁区内的毛蚶、菲律宾蛤仔和长牡蛎的 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著高于对照区域。这说明人工鱼礁的投放会导致滤食性贝类的食物组成发生变化, 进而提高浮游植物对其的贡献率。

本研究中所有海域, 消费者 $\delta^{15}\text{N}$ 值则介于 7.70‰ ~ 14.34‰ 之间, 消费者的营养级介于 2.0~3.95 级之间。与大多数学者研究的结果相似(李忠义等, 2010; 魏虎进等, 2013; 麻秋云等, 2015; 万祎等, 2005; 谢斌等, 2017), 不同食性的消费者处于食物网中不同的地位, 浮游生物食性的消费者(如毛蚶、菲律宾蛤仔、长牡蛎和鲰)位于食物网的底端, 游泳生物食性的消

费者(如日本蟳、斑尾刺鰕虎鱼、中国花鲈和许氏平鲉)处于食物链的上层。

许多研究表明, 投放人工鱼礁可使大量生物聚集在鱼礁区, 起到聚集、养护和增殖渔业资源的效果, 增加了礁区生物的丰度(Fabi *et al.*, 2002; 汪振华等, 2010)。这就增加了游泳生物食性、性情凶猛鱼类或甲壳类, 特别是中国花鲈、斑尾刺鰕虎鱼、日本蟳等生物在人工鱼礁区捕食营养级相对较高的被捕食者的机率; 而在非人工鱼礁区, 该机率则相对较低。由于氮稳定同位素沿食物链基本上是逐级递增(李忠义等, 2010), 故本研究中对照区口虾蛄、隆线强蟹、日本关公蟹、日本蟳、斑尾刺鰕虎鱼、短吻红舌鲷和中国花鲈的 $\delta^{15}\text{N}$ 值和营养级显著低于其在部分年份礁区或全部年份礁区的数值。

人工鱼礁的生态效益是在建成后逐步显现的(郭彪等, 2015; 吴忠鑫等, 2012), 礁区生物营养级显著高于对照区域的生物种类数量, 2014 年礁区仅有 3 种, 而较早投礁的 2010 年礁区则高达 7 种。在所有调查渔获的生物中, 仅有短吻红舌鲷和许氏平鲉的营养级在不同年份礁区出现了差异, 2010 年礁区显著高于 2014 年礁区。一般情况下, 鱼礁投放后鱼礁区鱼类和大型无脊椎动物群落结构会在 1~5 年内达到一个新的平衡(Bohnsack *et al.*, 1985)。本研究中, 同一种生物的营养级在不同礁区的差别, 说明 2012 年和 2014 年礁区的生物群落结构尚未完全形成新的平衡, 礁区的生态效应正在逐步显现。

总之, 由于人工鱼礁区生物丰度增加, 滤食性贝类的食物组成中, 浮游植物的贡献率增加; 肉食性、凶猛的生物捕获高营养级被捕食者的机率可能增加, 从而导致其营养级有所提高。随着礁区建成年份的增加, 礁区的生态效应逐步显现, 礁区食物网中营养级相对较高的生物对这种改变响应较为明显。

参 考 文 献

- Bohnsack JA, Sutherland DL. Artificial reef research: A review with recommendations for future priorities. *Bulletin of Marine Science*, 1985, 37(1): 11–39
- Cai DL, Li HY, Tang QS, *et al.* The establishment of continuous nutrition spectra in the food web of the Yellow Sea and the East China Sea ecosystem: The results from stable isotope techniques. *Science in China(C)*, 2005, 35(2): 123–130 [蔡德陵, 李红燕, 唐启升, 等. 黄东海生态系统食物网连续营养谱的建立: 来自碳氮稳定同位素方法的结果. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(2): 123–130]
- Catarina, Vanessa M, Luis N, *et al.* Food web of the intertidal rocky shore of the west Portuguese coast—determined by stable isotope analysis. *Marine Environmental Research*, 2015(110): 53–60
- Dai YY, Wang H, Zhang BL, *et al.* Distribution of lead in multi-phase mediums of artificial reefs and potential ecological risk in summer. *Journal Environment and Health*, 2016, 33(4): 345–349 [戴媛媛, 王宏, 张博伦, 等. 夏季渤海湾人工鱼礁区多相介质铅的分布特征及其潜在生态风险. *环境与健康杂志*, 2016, 33(4): 345–349]
- Dai YY, Yang S, Hou CQ, *et al.* Relationships between the structure of phytoplankton community and environmental factor in artificial reefs of Tianjin coast. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(2): 60–66 [戴媛媛, 杨森, 侯纯强, 等. 礁区浮游植物群落结构特征及其与环境因子的关系. *海洋湖沼通报*, 2018(2): 60–66]
- Fabi G, Sala A. An assessment of biomass and diel activity of fish at an artificial reef (Adriatic Sea) using a stationary hydroacoustic technique. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59(2): 411–420
- Fry B. Natural stable carbon isotope tag traces Texas shrimp migrations. *Fishery Bulletin United States*, 1981, 79(2): 337–345
- Guo B, Yu Y, Zhang BL, *et al.* Changes of nekton community characteristics in artificial reef area, Dashedang, Tianjin. *Marine Fisheries*, 2015, 37(5): 409–418 [郭彪, 于莹, 张博伦, 等. 天津大神堂海域人工鱼礁区游泳动物群落特征变化. *海洋渔业*, 2015, 37(5): 409–418]
- Guo WD, Yang YP, Wu LX, *et al.* Stable carbon isotope study on trophic relationships of Zhubi reef ecosystem in Nansha Islands. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, 21(1): 94–101 [郭卫东, 杨逸萍, 吴林兴, 等. 南沙诸碧礁生态系营养关系的稳定碳同位素研究. *应用海洋学学报*, 2002, 21(1): 94–101]
- Jia TT, Gao Y, Hou CQ, *et al.* Distribution characteristics and ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments around artificial reefs in offshore area of Bohai Bay. *Journal Environment and Health*, 2015, 32(12): 1092–1096 [贾婷婷, 高燕, 侯纯强, 等. 渤海湾近岸人工鱼礁区表层沉积物重金属分布特征及生态风险评价. *环境与健康杂志*, 2015, 32(12): 1092–1096]
- Kidd KA, Schindler DW, Hesslein RH, *et al.* Correlation between stable nitrogen isotope ratios and concentrations of organochlorines in biota from a freshwater food web. *The Science of the Total Environment*, 1995(160–161): 381–390
- Li ZY, Jin XS, Zhuang ZM, *et al.* Applications of stable isotope techniques in aquatic ecological studies. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(11): 3052–3060 [李忠义, 金显仕, 庄志猛, 等. 稳定同位素技术在水域生态系统研究中的应用. *生态学报*, 2005, 25(11): 3052–3060]
- Li ZY, Zuo T, Dai FQ, *et al.* Trophic level analysis of organisms from Changjiang estuary and adjacent waters of southern Yellow Sea in spring with stable isotope technology. *Journal*

- of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 103–109 [李忠义, 左涛, 戴芳群, 等. 运用稳定同位素技术研究长江口及南黄海水域春季拖网渔获物的营养级. 中国水产科学, 2010, 17(1): 103–109]
- Maksymowska D, Richard P, Piekarek-Jankowska H, *et al.* Chemical and isotopic composition of the organic matter sources in the Gulf of Gdansk (Southern Baltic Sea). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2008, 51(5): 585–598
- Ma QY, Han DY, Liu H, *et al.* Construction of a continuous trophic spectrum for the food web in jiaozhou bay using stable isotope analyses. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(21): 7207–7218 [麻秋云, 韩东燕, 刘贺, 等. 应用稳定同位素技术构建胶州湾食物网的连续营养谱. 生态学报, 2015, 35(21): 7207–7218]
- Minagawa M, Wada E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1984, 48(5): 1135–1140
- Phillip DL, Gregg JW. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too many sources. *Oecologia (Berlin)*, 2003, 136(2): 261–269
- Szwarcz HP. Some theoretical aspects of isotope paleodiet studies. *Journal of Archaeological Science*, 1991(18): 261–275
- Serguei IK, Vladimir IK, Karen S, *et al.* Trophic structure of the abyssal benthic community in the Sea of Japan inferred from stable isotope and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 2014(500): 121–137
- Tan LY, Wang YK, Tang XX, *et al.* Distribution characteristics of the stable nitrogen isotope in different tissues of small yellow croaker and the ecological significance in the Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 30–35 [谭鲁玉, 王玉堃, 唐学玺, 等. 黄海小黄鱼不同组织中 $\delta^{15}\text{N}$ 的分布特征及其生态学意义. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 30–35]
- Tomasz M, Niedźwiecki M, Małgorzata A, *et al.* Stable isotope analyses revealed high seasonal dynamics in the food web structure of a peatbog. *International Review of Hydrobiology*, 2015, 100(5–6): 141–150
- Vinagre C, Máguas C, Cabral HN, *et al.* Food web structure of the coastal area adjacent to the Tagus estuary revealed by stable isotope analysis. *Journal of Sea Research*, 2012, 67(1): 21–26
- Wan W, Hu JY, An LH, *et al.* Study on the trophic levels of the main species in Bohai bay food network by using stable nitrogen and carbon isotope. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(7): 708–712 [万祎, 胡建英, 安立会, 等. 利用稳定氮和碳同位素分析渤海湾食物网主要生物种的营养层次. 科学通报, 2005, 50(7): 708–712]
- Wang ZH, Zhang SY, Wang K. Fish and macroinvertebrates community structure in artificial habitat around Sanheng Isle, Shengsi, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(8): 2026–2035 [汪振华, 章守宇, 王凯. 三横山鱼礁生境鱼类和大型无脊椎动物群落特征. 生态学报, 2010, 30(8): 2026–2035]
- Wei HJ, Zhu XM, Ji YN, *et al.* Study on the food web structure and their trophic levels of marine ranching area in Xiangshan Harbor. *Journal of Applied Oceanography*, 2013, 32(2): 250–257 [魏虎进, 朱小明, 纪雅宁, 等. 基于稳定同位素技术的象山港海洋牧场区食物网基础与营养级的研究. 应用海洋学学报, 2013, 32(2): 250–257]
- Wu Y, Zhang J, Zhang ZF, *et al.* Seasonal variability of stable carbon and nitrogen isotope of suspended particulate matter in the Changjiang river. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 546–552 [吴莹, 张经, 张再峰, 等. 长江悬浮颗粒物中稳定碳、氮同位素的季节分布. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 546–552]
- Wu ZX, Zhang L, Zhang XM, *et al.* Nekton community structure and its relationship with main environmental variables in Lidao artificial reef zones of Rongcheng. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(21): 6737–6746 [吴忠鑫, 张磊, 张秀梅, 等. 荣成俚岛人工鱼礁区游泳动物群落特征及其与主要环境因子的关系. 生态学报, 2012, 32(21): 6737–6746]
- Xie B, Li YK, Zhang H, *et al.* Food web foundation and seasonal variation of trophic structure based on the stable isotopic technique in the marine ranching of Haizhou Bay, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(7): 2292–2298 [谢斌, 李云凯, 张虎, 等. 基于稳定同位素技术的海州湾海洋牧场食物网基础及营养结构的季节性变化. 应用生态学报, 2017, 28(7): 2292–2298]

(编辑 江润林)

Study of the Food-Web Structure in the Dashentang Artificial Reef Area in Tianjin Using a Stable Isotope Technique

ZHANG Bolun^{1,2}, GUO Biao^{1,2}^①, YU Ying^{1,2}, XU Xiaofu^{1,2}, WANG Shuo^{1,2}

(1. Department of Fisheries Resources and Ecologic Environment, Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457; 2. Center for Marine Ranching Engineering Science Research of Tianjin, Tianjin 300457)

Abstract The present study aimed to quantitatively evaluate the ecological effects of artificial reefs from the perspective of the food-web structure and provide reference material for marine ecological restoration and conservation research. A stable isotope technique was applied to analyze consumers and their potential carbon sources. Samples were collected from the reef areas built in 2010, 2012, and 2014 and the control area in Dashentang during June 2016. An IsoSource model was used to construct the food web. Stable isotopes were used to calculate the trophic levels of the consumers. The results showed that food sources can be categorized into three categories based on the $\delta^{13}\text{C}$ values of phytoplankton, particulate organic matter, and soil organic matter. Phytoplankton represented the largest source of carbon for consumers (67.2%~81.5%). The findings from the IsoSource mix model revealed that phytoplankton were the main contributors to the food web in the studied areas. There were no significant differences in the $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ values of the same food sources from different areas. The $\delta^{13}\text{C}$ values of suspension-feeding bivalves, including *Arca subcrenata*, *Ruditapes philippinarum*, and *Crassostrea gigas*, were significantly higher in the reef areas than in the control area. The proportion of phytoplankton in the carbon sources for suspension-feeding bivalves was significantly higher in the reef areas than in the control area. The $\delta^{15}\text{N}$ values of consumer species ranged from 7.70‰ to 14.34‰, and the trophic levels ranged from 2.0 to 3.95. The $\delta^{15}\text{N}$ values or trophic levels of piscivorous consumers were higher in the reef areas than in the control area, and the level of significance increased with the duration of the reefs. The findings indicate that artificial reefs might induce an abundance of organisms in reef areas, leading to changes in the composition of the food sources of suspension-feeding bivalves and an increase in the trophic levels of piscivorous consumers.

Key words Stable isotope; Artificial reef area; Food web; Trophic level

① Corresponding author: GUO Biao, E-mail: oucguobiao@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181017002

http://www.yykxjz.cn/

田永胜, 唐江, 马文辉, 成美玲, 李振通, 吴玉萍, 张晶晶, 王林娜, 庞尊方, 王晓梅, 翟介明. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 36-47
Tian YS, Tang J, Ma WH, Cheng ML, Li ZT, Wu YP, Zhang JJ, Wang LN, Pang ZF, Wang XM, Zhai JM. Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tukula* (♂) using cryopreserved sperm. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 36-47

蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀) 杂交后代发育及生长特征分析*



田永胜^{1,2①} 唐江^{1,3} 马文辉⁵ 成美玲^{1,4} 李振通^{1,3}
吴玉萍^{1,4} 张晶晶^{1,3} 王林娜^{1,2} 庞尊方⁵ 王晓梅⁵ 翟介明⁵

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023;
5. 莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

摘要 蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)在自然环境中存在地理分布、繁殖时间和温度等方面的生殖隔离。本研究利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵人工授精,在水温为30℃、盐度为20的条件下培育,对其胚胎发育、胚后变态发育进行了详细的观察,利用显微镜和解剖镜拍摄、记录胚胎发育和变态发育的形态特征和发育时序,统计了杂交受精率、孵化率和畸形率,并对鱼苗生长进行了测量。结果显示,杂交受精卵经过1037 min完成胚胎发育。原肠早期,在胚层一侧就形成了胚盾,神经管在胚孔封闭时也开始出现,在视泡和耳囊发育的同时,克氏囊(末球)也开始形成。在心脏跳动之前,胚体先开始抽动,当977 min肌节发育到23对时,心脏开始间歇性的跳动,间歇时间24~40 s,心率98次/min;发育到1018 min时,间歇时间变短,心率约为93次/min;之后间歇性现象消失,心跳频率达到93次/min,这些现象在以往鱼类胚胎发育资料中均无记载。变态发育的典型特征是三叉棘的生长和退化,杂交幼鱼3 mm(10 d)时,形成背鳍棘和腹鳍棘;全长21.5 mm(35 d)时,三叉棘退化,完成变态发育;55.3 mm(45 d)时,表型特征与成体相似。冷冻精子的受精率、孵化率和畸形率分别为(76.67±5.77)%、(85.67±5.13)%和(6.33±1.54)%,与新鲜精子无显著差异($P<0.05$)。鱼苗65 d时,体长达到8.89 cm,杂交后代体色趋于一致,且生长速度快;1龄时,平均全长和体重分别达(32.58±1.60) cm和(559.76±80.85) g。对比养殖实验显示,1龄棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代体重是棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代的1.63倍,全长为1.24倍;这一时期的生长方程为 $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$ 。研究结果表明,蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼杂交胚胎和胚后发育不存在遗传障碍,后代受精率和孵

* 烟台市重点研发计划(2016JH021)、烟台市高端人才引进“双百计划”项目和黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019002; 20603022018019)共同资助 [The work was supported by Yantai Science and Technology Development Plan (2016JH021), the Double-Hundred Talent Project of Yantai City, Shandong Province, and Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes, YSFRI, CAFS (20603022019002; 20603022018019)].

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

收稿日期: 2018-10-17, 收修改稿日期: 2018-11-13

化率高、畸形率低, 具有生长快杂交优势, 为2种石斑鱼杂交育种和苗种大量培育提供了一定的遗传基础。

关键词 蓝身大斑石斑鱼; 棕点石斑鱼; 杂交; 胚胎发育; 变态发育; 成活率

中图分类号 Q321+.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0036-12

蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*), 俗称金钱斑, 是石斑鱼的大型品种之一, 在我国南部海域、台湾北部及澎湖海域有分布。身体为白色到灰色, 全身覆盖着大块的黑斑, 分布于5~150 m的深度海水中。蓝身大斑石斑鱼生长快、肉质鲜美, 能生长到2 m, 体重达100 kg。近年来, 人们对其人工繁殖和养殖技术(沈士新, 2011)、性别转化(Yeh *et al*, 2003)、神经坏死病防治(Kai *et al*, 2010)及线粒体基因(Yang *et al*, 2016)等进行了研究, 但相关的研究报道不多。由于人工繁殖和苗种培育技术还未成熟, 市场上的养殖量很少, 但通过杂交育种将其生长优势性状充分利用, 有利于改良杂交后代的生长性状。

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)又称老虎斑, 广泛分布于印度洋和太平洋的热带、亚热带海域, 是主要的石斑鱼养殖品种之一, 生长速度较慢, 当年养殖苗种体重可达493 g(符书源等, 2013)。因此, 近年来利用棕点石斑鱼为母本与鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)雄鱼进行杂交, 培育出了“虎龙杂交斑”, 生长速度较母本提高110%(张海发等, 2014), 并对杂交后代胚胎发育(陈超等, 2014)、摄食与生长(于欢欢等, 2015)、染色体核型(刘莉等, 2016)、亲本和杂交后代甲基化变异特点(周莹等, 2017)等进行了研究。“虎龙杂交斑”又称珍珠龙胆, 是目前市场上大量养殖的石斑鱼杂交品种, 每年的苗种量大约在1亿尾左右, 极大推动了石斑鱼养殖产业的发展, 但在养殖中发现多批鱼苗畸形率高和死亡率高的问题。为了提高棕点石斑鱼及杂交后代生长速度、抗病性能和养殖品质, 在其品种改良方面还需进一步探索。

蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼在自然环境中存在着一定的地理分布、繁殖时间和温度等方面的生殖隔离, 未发现自然杂交的现象。本研究利用冷冻精子可以突破以上生殖隔离的特点, 在国内外首次研究和冷冻保存了蓝身大斑石斑鱼的精子, 并建立了精子冷冻库, 并首次利用其冷冻精子与棕点石斑鱼进行杂交育种实验, 对其杂交后代胚胎和胚后变态发育、受精率、畸形率、正常发育率进行详细的观察和统计分析, 以期对蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼杂交育种及石斑鱼种质改良提供生物学依据。

1 材料与方 法

1.1 蓝身大斑石斑鱼精子冷冻保存

利用莱州明波水产有限公司培育的蓝身大斑石斑鱼亲鱼群体30尾, 体重为20~30 kg/尾, 体长为50~70 cm, 在4~6月性成熟季节, 挑选发育较好的雄鱼, 利用5~10 mg/L MS-222麻醉(上海康汀生物科技有限公司), 在胸鳍基部一次注射绒毛膜促性腺激素(HCG)200~300 IU/kg、促排卵激素类似物(LHRH-A)35 µg/kg进行人工催产(HCG和LHRH-A购自宁波第二激素厂), 注射48 h后, 利用挤压腹部法采集成熟雄鱼精液, 利用精子冷冻保存液ELs-3冷冻保存精子(Tian *et al*, 2015), 将精子贮存在生物液氮罐中, 受精时在37℃水浴中解冻。

1.2 棕点石斑鱼卵子的采集和杂交受精

利用以上公司培育的棕点石斑鱼亲鱼50尾, 体重为3~7 kg/尾, 体长为30~40 cm, 在性成熟季节利用人工挤压腹部法采集1尾成熟鱼卵子2000 g, 将卵盛在塑料盆中, 将解冻的蓝身大斑石斑鱼精子5 ml加入卵中, 充分搅拌混合, 加入2倍体积海水(30℃)激活受精, 精卵受精比例为1:400。同时采集成熟蓝身大斑石斑鱼雄鱼新鲜精子与棕点石受精卵受精, 作为对照组。加入海水后静置5~10 min, 分离过滤下沉的死卵, 将上浮卵利用海水反复冲洗和过滤, 洗去卵液, 之后将受精卵放入3 m³孵化罐中孵化, 水温保持30℃, 盐度30, 同时给孵化水中充氧5~10 mg/L。

1.3 胚胎发育及受精率、孵化率统计

在受精卵孵化过程中连续采集受精卵样本, 利用DSY2000X倒置生物显微镜(重庆光电仪器有限公司)观察胚胎发育过程, 记录胚胎发育特征和发育时间, 同时在镜下拍摄胚胎发育特征照片。胚胎发育到囊胚期, 分别采集冷冻精子受精卵和新鲜精子受精卵100~200粒统计受精率, 孵化出膜后统计孵化率及正常发育率, 分别进行3次统计。

1.4 胚后变态发育观察

受精卵发育到尾芽期时, 利用筛绢网从孵化缸中

将受精卵过滤,在静水中自然沉淀分离下沉的死卵,将受精卵运输到育苗车间,放入 30 m³ 水泥池中孵化和培育,每池放入受精卵 300 g,鱼苗培育水温为 26℃~27℃,培育方法参照棕点石斑鱼和云纹石斑鱼人工繁育及工厂化养殖技术(王建钢等,2008;宋振鑫等,2012)。变态发育早期,每 5 d 采集鱼苗观察 1 次,发育后期,每 10 d 采集鱼苗观察 1 次,同时测量体长并拍摄发育特征图片。

1.5 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与珍珠龙胆生长对比

在莱州明波水产有限公司,利用工厂化循环水进行棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代(简称金虎斑)与珍珠龙胆生长对比养殖实验,分别在 2 个 30 m³ 流水池中放养金虎斑和珍珠龙胆鱼苗 2000 尾,体长为 6~7 cm。养殖池循环水量为 12~18 个循环,水温 22℃~28℃、pH 7.8~8.2、盐度 28~32、养殖池出水口溶氧量(DO)≥10 mg/L、氨氮(NH₄-N)≤0.1 mg/L,投喂颗粒饲料,每天投喂 2 次,投喂量为鱼体重的 2%~3%。在杂交鱼苗生长到 180~370 d,在养殖群体中随意抽取 40~50 尾,对其生长体重、全长、体长和体高进行测量,利用 Excel 软件计算平均值,并利用幂函数模型 $W=aL^b$ 拟合体重和全长生长方程,分析其生长速率。

1.6 发育图片及数据处理

胚胎发育和胚胎后发育图片利用 Photoshop 软件进行编辑处理。受精率、孵化率和正常发育率数据利用 SPSS 程序单因素方差分析法(One-way ANOVA)处理,采用 Student-Newman-Keuls 进行多重比较和差异显著性分析, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。计算数据利用 Excel 程序作图。

2 结果

2.1 杂交胚胎发育

棕点石斑鱼(♀)和蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎经过细胞分裂期、囊胚期、原肠期、胚体形成、视泡和耳囊形成、神经脊和肌节形成、尾芽期、心跳期和胚转动期发育,完成胚胎发育,在 30℃ 水温下历时 1037 min,孵化出膜,每一阶段的发育时间和发育特征的详细描述见表 1 和图 1。

2.2 杂交鱼苗变态发育

杂交鱼苗在孵化后第 2 天卵黄囊明显缩小,鳍褶从头部到卵黄囊后连为一体,发育完整,肠为直管状,

排泄孔从腹部伸出,体长为 2 mm。孵化后 5 d 鱼苗胸鳍、腹鳍完成分化,晶体黑色素加深,身体出现色素黑斑,体长约为 2.5 mm。孵化后 10 d 鱼苗三叉棘形成,背鳍、尾鳍和臀鳍膜仍然相连,肌节清晰,在腹部后侧形成 1 个黑色素斑,肠道中充满食物,体长达 3 mm。孵化后 15 d 鱼苗冠状棘、腹鳍棘继续伸长,可达尾鳍基部,背鳍、尾鳍和臀鳍完全分化,鳍条清晰,体长达 4.3 mm。孵化后 20 d 鱼苗,三叉棘变粗,棘上小刺清晰,腹鳍棘开始收缩变短,上颌齿明显,体长达 8.7 mm。孵化后 25 d 鱼苗,腹鳍刺明显变短,体长为 11.5 mm。孵化后 30 d 鱼苗,背鳍棘和腹鳍棘明显收缩,背鳍棘至尾柄前端,腹鳍棘到臀鳍起点,尾部色素斑消失,体长为 15.3 mm。孵化后 35 d 鱼苗,背鳍棘和腹鳍棘退化,尾鳍发达,在各鳍条上出现节状黑色素斑,体长为 21.5 mm。孵化 45 d 鱼苗,变态完成,体表出现方格状黑色素斑,背区黑色斑大,背区变小,腹部色素变淡,背鳍、尾鳍和臀鳍上形成羽状色素斑,体长达 55.3 mm。孵化后 65 d 鱼苗体长达到 88.9 mm(图 2)。

2.3 杂交胚胎发育率

利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵杂交的受精率、孵化率和畸形率分别为(76.67±5.77)%、(85.67±5.13)%和(6.33±1.54)%,利用新鲜精子受精的受精率、孵化率和畸形率分别为(83.33±2.89)%、(86.67±5.77)%和(6.33±0.58)%,使用冷冻精子和新鲜精子无显著差异(图 3)。

2.4 杂交鱼苗的生长

通过对 180~370 日龄金虎斑鱼苗生长全长、体长和体重性状的测量,拟合了这一时期杂交鱼苗的生长方程: $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$,指数 $b=2.8079<3$,鱼苗处于异速生长时期(图 5)。220 日龄平均体重为(179.08±42.54) g,平均全长达(22.03±1.29) cm,平均体长为(21.96±1.22) cm,平均体高为(6.11±0.81) cm(图 4)。1 龄时,金虎斑平均体重达(559.76±80.85) g,全长达(32.58±1.60) cm,体长为(26.43±1.42) cm。通过在工厂化流水池养殖对比,1 龄金虎斑体重是珍珠龙胆的 1.63 倍,全长是 1.24 倍,金虎斑的生长速度显著快于珍珠龙胆(表 2)。

3 讨论

3.1 石斑鱼远缘杂交育种

在世界上石斑鱼约有 100 种,是分布在热带和亚热带海域的大型鱼类,少数分布在温带;在我国有

表 1 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育时序和特征
 Tab.1 The development timing and characteristics of hybrid embryos of *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂

发育时间 Development time (min)	胚胎时期 Embryo stage	发育特征 Development characteristics	图 Figures
0	受精卵	卵中具一大油球, 卵质透明	图 1.1
40	胚盘形成	在胚胎动物极形成一盘状突起	图 1.2
45	2 细胞	胚盘分裂为二	图 1.3
52	4 细胞	2 细胞纵裂为 4 细胞	图 1.4
65	8 细胞	4 细胞纵裂为 8 细胞	图 1.5
80	16 细胞	8 细胞横裂为 16 细胞	图 1.6
95	32 细胞	8 细胞等分裂为 32 细胞	图 1.7
108	64 细胞	32 细胞等分裂为 64 细胞	图 1.8
124	128 细胞	64 细胞分裂为 128 细胞	图 1.9
145	256 细胞	128 细胞分裂为 256 细胞	图 1.10
164	多细胞期	细胞球大量分裂, 分裂球无法分辨	
180	桑葚胚期	细胞球急骤增多, 似桑椹结构	
187	高囊胚期	囊胚突起, 呈一帽状	图 1.11
219	低囊胚期	囊胚细胞向四周扩展, 帽状体变低	图 1.12
263	原肠早期	胚层形成, 在囊胚四周翻卷成环状	图 1.13
349	原肠早中期	胚层向植物极下包至卵黄 2/5, 胚盾出现, 在原肠一侧出现一盾形结构	图 1.14
380	原肠中期	原肠下包至卵黄 1/2, 胚盾更加清晰	图 1.15
393	原肠中后期	原肠下包近 4/5, 胚盾在一侧呈条状, 头部开始变粗	图 1.16
442	原肠后期	原肠在植物极形成圆形胚孔, 胚盾加粗	图 1.17
461	胚孔封闭期	胚孔封闭, 胚体形成、变粗	图 1.18
477	胚体形成	胚孔消失, 胚体加长, 神经脊开始形成, 胚体中间出现一管状结构	图 1.19
505	胚体形成	胚体头端加粗, 尾部形成一透明小圆球, 似克氏囊初步形成	
543	胚体形成	胚体加长, 头部两侧膨大, 视泡原基形成, 神经脊完全形成, 胚体背面形成一管状结构	图 1.20
577	视泡形成	视泡突起, 脊索明显, 尾部末球出现, 胚体中部腹侧出现肌节 4-5 节	图 1.21
595	耳囊形成	在视泡后侧耳囊突起, 同时形成 8 对肌节	图 1.22
620	肌节期	肌节持续分化达到 9~10 节, 克氏囊呈球状附于胚体尾腹部	图 1.23
634	肌节期	肌节数达 11~12 节, 尾部开始伸长	图 1.24
673	脑泡形成	15~16 对肌节, 视泡、耳囊明显膨大, 脑室形成	图 1.25,26
688	尾芽期	18~19 对肌节, 尾部开始向一侧偏转	图 1.27
743	晶体、耳石形成	晶体、耳石明显形成, 脑室分化完整	图 1.28
800	心包形成	头部后腹面形成心包突起, 胚体长度约为卵周长的 1/2	图 1.29
938	胚体抽动	胚体形成间歇性抽动	图 1.30
971	胚体抽动	胚体约为卵周长的 8/12, 胚体抽动频率增加, 大约 20 次/min	图 1.31
977	心跳期	心脏开始间歇性跳动, 间歇时间约 24-40 s, 在跳动期 1 min 大约跳动 98 次, 跳动约 103 次后间歇一次, 此时肌节发育到 23 对	图 1.32
1018	胚体转动期	心跳仍有间歇性停止现象, 但时间缩短到 17 s 左右, 心率大约 93 次/min, 胚体开始间歇性转动	图 1.33
1027	孵化期	鱼苗出膜, 心跳间歇性跳动现象消失, 刚孵化鱼苗卵黄囊长度约为鱼苗长度的 2/3, 尾部不能完全伸直	图 1.34
1037	孵化鱼苗	孵化后 10 h 鱼苗, 尾部伸直变长, 卵黄囊约为体为 1/2	图 1.35

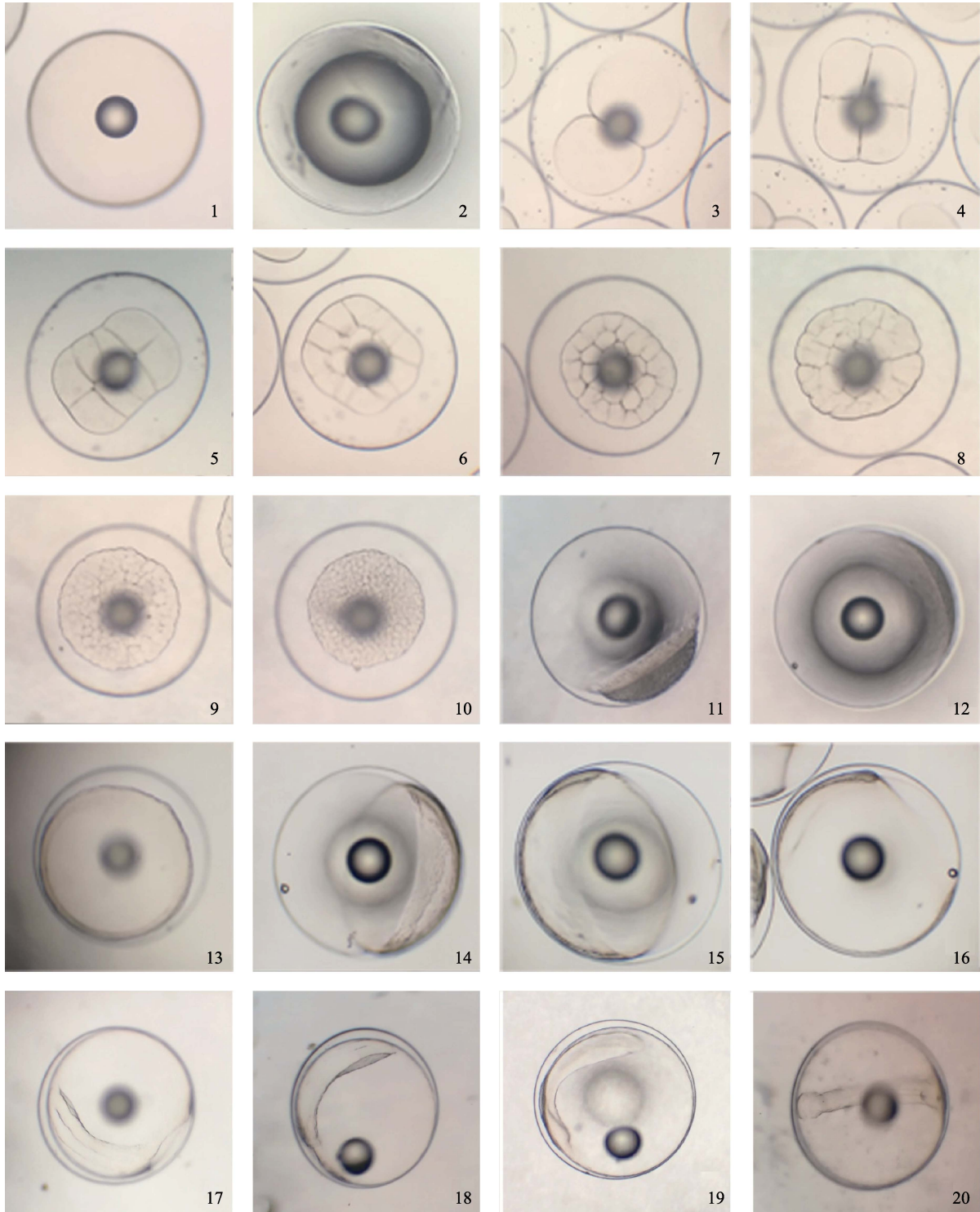


图1 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育(×40)

Fig.1 The development characteristics of hybrid embryos of *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂(×40)

- 1: 受精卵; 2: 胚盘形成; 3: 2细胞; 4: 4细胞; 5: 8细胞; 6: 16细胞; 7: 32细胞; 8: 64细胞; 9: 128细胞; 10: 256细胞;
 11: 高囊胚; 12: 低囊胚; 13: 原肠早期; 14: 原肠早中期; 15: 原肠中期; 16: 原肠中后期; 17: 原肠后期;
 18: 胚孔封闭; 19: 胚体形成; 20: 胚体头部膨大
- 1: Fertilized egg; 2: Blastoderm formation; 3: 2-cell; 4: 4-cell; 5: 8-cell; 6: 16-cell; 7: 32-cell; 8: 64-cell; 9: 128-cell;
 10: 256-cell; 11: High blastocyst; 12: Low blastocyst; 13: Early phase of gastrocoele; 14: Early-meta phase of gastrocoele;
 15: Metaphase of gastrocoele; 16: Meta-anaphase of gastrocoele; 17: Anaphase of gastrocoele;
 18: Blastopore closed; 19: Embryo formation; 20: Embryo's head bulges

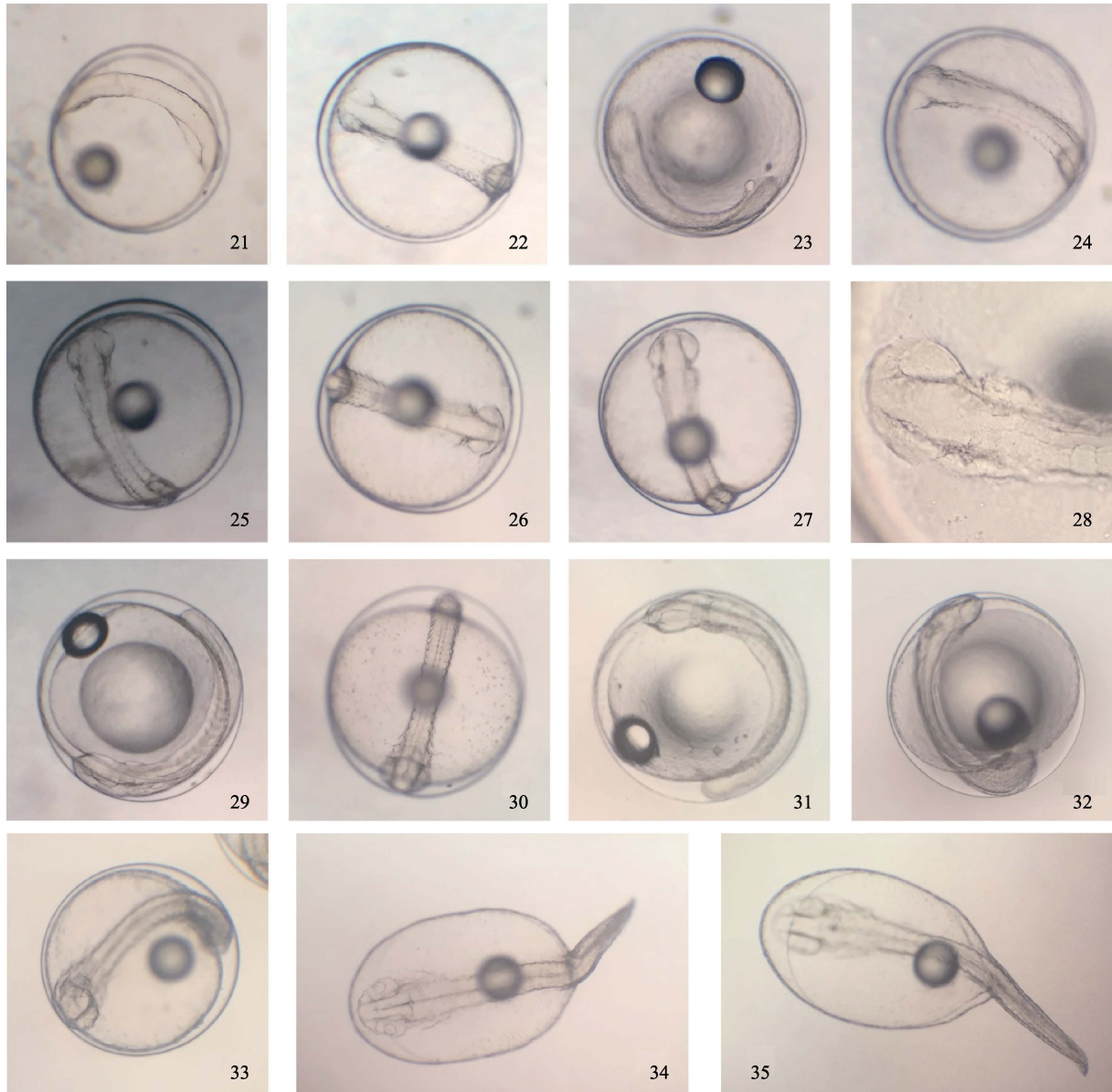


图 1(续) 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育(×40)

Fig.1 (continued) The development characteristics of hybrid embryos *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂(×40)

21: 视泡形成; 22: 耳囊形成; 23: 克氏囊形成; 24: 11~12 对肌节发育; 25: 15~16 对肌节; 26: 脑泡形成;
27: 18~19 对肌节, 尾芽偏转; 28: 晶体、耳石形成×100; 29: 心包形成; 30: 胚体抽动; 31: 胚体约为
卵周长的 8/12; 32: 心跳期; 33: 胚体转动; 34: 初孵鱼苗; 35: 孵化后 10 h

21: Optic vesicle formation; 22: Otic capsule formation; 23: Gram sac formation; 24: 11~12 pairs muscle development;
25: 15~16 pairs muscle; 26: Brain vesicle formation; 27: 18~19 pairs muscle; tail bud deflection; 28: Crystals and otoliths are
formed×100; 29: Heart-sac formation; 30: Embryonic body twitch; 31: The embryo is about 8/12 of the circumference of
the egg; 32: Heartbeat period; 33: Embryo turn; 34: Newly-hatched fry; 35: 10 h post hatching

36 种石斑鱼(孟庆闻等, 1995), 2016 年, 石斑鱼捕捞量达 128538 t, 养殖产量达 108319 t(农业部渔业渔政管理局编制, 2016)。目前, 主要石斑鱼养殖品种有云纹石斑鱼(*E. moara*)、棕点石斑鱼、褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)及杂交品种等 10 多个种。但是在养殖过程中纯种石斑鱼苗种成活率低、畸形率高、病

害多这一现象, 一直影响着石斑鱼产业的发展, 因此, 人们一直在探索解决这一问题的有效途径。

杂交育种可使不同品种或品系的优良性状发生遗传组合, 达到改良鱼类性状的目的, 培育出优良养殖品种。国内外一些石斑鱼养殖者对石斑鱼的杂交苗种培育进行了多种尝试, 例如, 地中海石斑鱼(*E. costae*)×东大西洋石斑鱼(*E. marginatus*) (Glamnina *et al*,

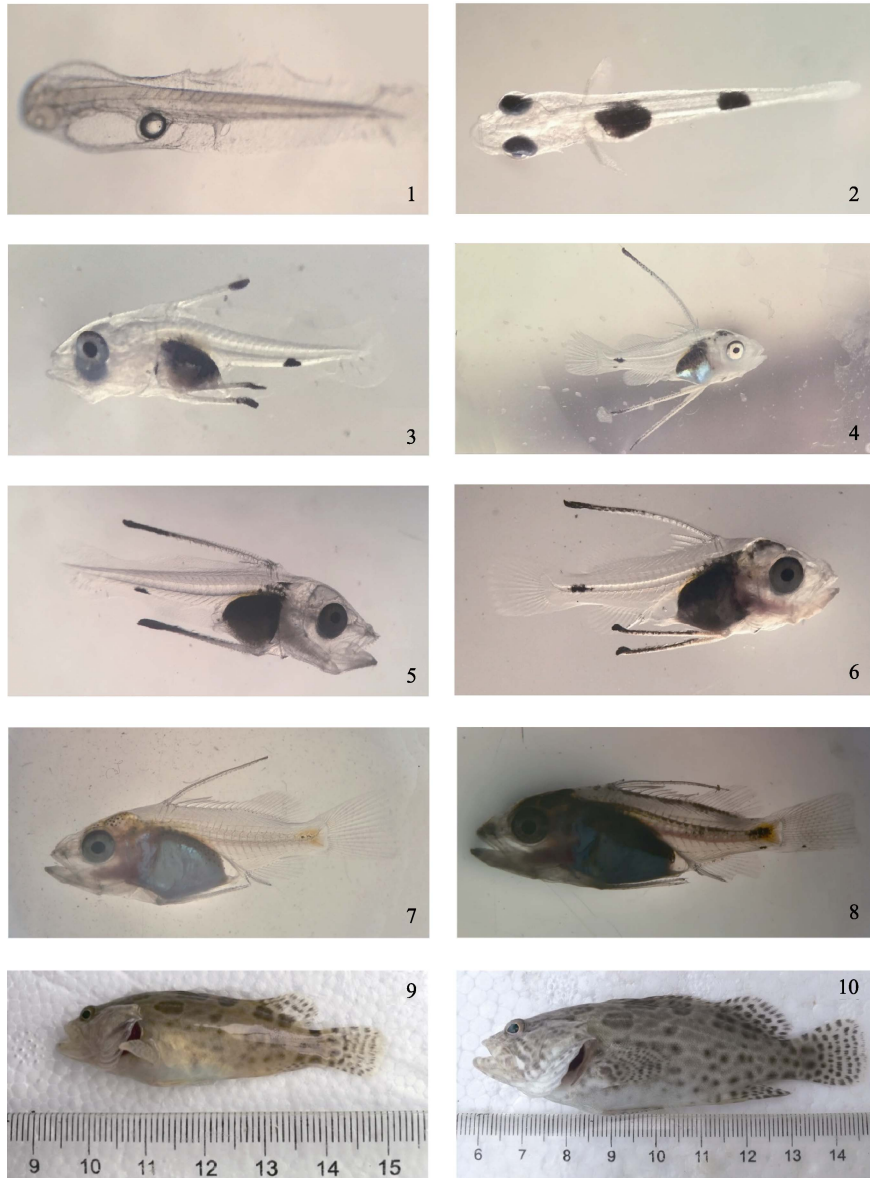


图2 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗变态发育

Fig.2 Metamorphosis development of hybrid juvenile fish *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂

- 1: 孵化后 2 d (×40); 2: 孵化后 5 d (×40); 3: 孵化后 10 d (×5); 4: 孵化后 15 d (×3); 5: 孵化后 20 d 鱼苗 (×3);
 6: 孵化后 25 d (×3); 7: 孵化后 30 d (×3); 8: 孵化后 35 d (×3); 9: 孵化后 45 d (×1); 10: 孵化后 65 d (×1)
 1: 2 d post hatching (×40); 2: 5 d post hatching (×40); 3: 10 d post hatching (×5); 4: 15 d post hatching (×3);
 5: 20 d post hatching (×3); 6: 25 d post hatching (×3); 7: 30 d post hatching (×3); 8: 35 d post hatching (×3);
 9: 45 d post hatching (×1); 10: 65 d post hatching (×1)

2001)、斜带石斑鱼 (*E. coioides*) ♀ × 赤点石斑鱼 (*E. akaara*) ♂ (刘付永忠等, 2007)、斜带石斑鱼 ♀ × 鞍带石斑鱼 (*E. lanceolatus*) ♂ (杨少森, 2010)、云纹石斑鱼 ♀ × 七带石斑鱼 (*E. septemfasciatus*) ♂ (李炎璐等, 2015)、棕点石斑鱼 ♀ × 鞍带石斑鱼 ♂ (陈超等, 2014)、云纹石斑鱼 ♀ × 鞍带石斑鱼 ♂ (田永胜等, 2017a) 等杂交苗种培育, 但大部分杂交后代畸形率高、成活率低, 在生产中未能被大量养殖应用, 目前仅有“虎龙杂交

斑”(张海发等, 2014)和“云龙石斑鱼”(田永胜等, 2017b)在生产中得到了大量推广养殖, 为石斑鱼养殖产业发展发挥了重要作用。蓝身大斑石斑鱼在自然环境中的种群数量较少, 具有生长快的优势, 是近年来新开发的养殖品种, 但由于人工繁殖和苗种培育技术还远未成熟, 在市场上出售的苗种数量相当少, 未形成产业优势。另外, 国际上对蓝身大斑石斑鱼研究报道很少, 对其养殖生物学特点及遗传性状的了解也

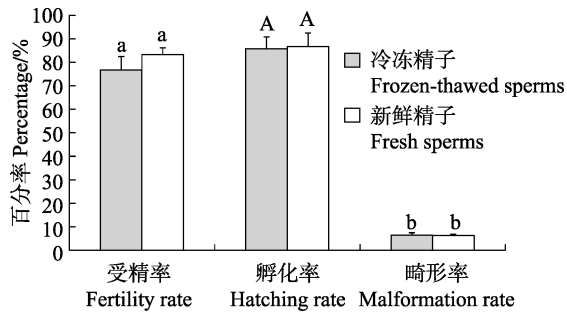


图 3 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与新鲜精子受精率、孵化率和畸形率比较($n=3, P<0.05$)

Fig.3 The comparison of the rate of fertilization, hatching rate and malformation rate of frozen sperm and fresh sperm of *E. tukula*



图 4 220 d 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗
Fig.4 Hybrid juvenile fish of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂ at 220 d

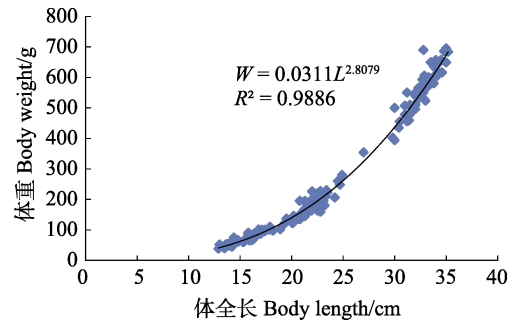


图 5 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗生长曲线

Fig.5 Growth curve of the hybrid juvenile fish of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂

相当有限。国际上对棕点石斑鱼的研究较早, 养殖技术也相对成熟, 1992 年, 日本开始对棕点石斑鱼进行人工繁殖研究(王涵生, 1997), 目前利用微卫星可以对繁殖群体进行跟踪管理(Lo *et al.*, 2008), 并对虎龙杂交斑的分子遗传特性进行分析(Huang *et al.*, 2015)。但是, 还未见利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵进行杂交育种的研究报道。本研究对蓝身大斑石斑鱼的精子冷冻保存技术进行了研究, 建立了其精子冷冻库, 实现了不同品种之间的异地受精繁育。

表 2 1 龄棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交斑与珍珠龙胆生长对比

Tab.2 Growth comparison of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂ and *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ at one-year-old

	体重 Weight (g)	全长 Full length (cm)	体长 Body length (cm)	头长 Head length (cm)	体高 Body height (cm)
金虎斑 E.FT	559.76±80.85	32.58±1.60	26.43±1.42	10.63±0.78	8.76±0.59
珍珠龙胆 E.FL	343.05±52.56	26.24±1.32	21.23±0.92	8.93±0.47	7.46±0.49

3.2 杂交胚胎发育

对杂交后代胚胎发育进行研究可以直接判断杂交后代发育生物学性状, 检测两种鱼类品种杂交可育的可行性。大部分鱼类胚胎的发育过程大体上被划分为细胞分裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节期、尾芽期、心跳期、孵化前期和出膜期, 但每一种鱼类胚胎的细胞分裂方式和速度、组织分化和器官形成时间、发育进程等也各具特点。鞍带石斑鱼受精卵在水温(29±0.5)°C 条件下经过 18 h 30 min 完成胚胎发育(周玲等, 2010)。棕点石斑鱼在水温 26.5°C~28.0°C 条件下历时 1325 min 完成胚胎发育(林彬等, 2010)。棕点石斑鱼卵与蓝身大斑石斑鱼冷冻精子杂交胚胎的发育经过卵裂、囊胚、原肠、脊索、神经、视听器官、肌节、心跳、胚体转动等时期的发育, 在 30°C 经过 1037 min 完成胚胎发育, 杂交后代的发育时间明显较母本快。在云纹石斑鱼(♀)与鞍带石斑鱼♂杂交胚胎发

育中也发现杂交后代胚胎发育较母本快 1 h 现象(Chen *et al.*, 2018)。这两种杂交的父本都为生长快、体型大的鞍带石斑鱼和蓝身大斑石斑鱼, 可能是父本的生长快遗传基因促进了胚胎的生长, 提高了胚胎发育的速度。

本研究为了揭示杂交后代的发育特征, 对棕点石斑鱼卵与蓝身大斑石斑鱼冷冻精子杂交胚胎的发育过程进行详细观察, 发现原肠早期在胚层一侧就形成了胚体初形——胚盾, 脊索发育早期——神经管在胚孔封闭时也开始出现, 在视泡和耳囊发育的同时, 克氏囊(末球)也开始形成, 这些现象在其他鱼类胚胎发育中从未有过描述。以往的文献对鱼类胚胎发育过程人为进行了划分, 但其胚胎发育过程在各个时期并没有严格的界线, 比如视泡发育同时肌节也开始出现。肌节发育是胚胎最明显的特征, 当肌节 15~16 对时, 脑泡形成, 18~19 对肌节时, 尾部开始向一侧偏转, 表

示进入了尾芽期,因此,作者认为,以肌节数量为量化指标对胚胎发育进程作描述,可以更清楚地了解胚胎发育的进展。

本研究发现,胚胎在心脏跳动之前胚体先开始抽动,当肌节发育到 23 对时,心脏开始间歇性的跳动,初期间歇时间较长,发育到 1018 min 时,间歇时间变短,之后间歇性现象消失,心跳频率达到 93 次/min,这些现象在以往鱼类胚胎发育资料中都未有记载。

3.3 变态发育和生长

变态发育普遍存在于鲆鲽鱼类和石斑鱼类中,一个多世纪以来,比目鱼类变态发育和外形不对称引起人们的广泛兴趣,鲍宝龙等(2012)对比目鱼眼睛移位的组织学模型和眼睛移位信号调控途径等进行了研究,近年通过比较基因组学和转录组学对牙鲆变态发育进行了研究,认为甲状腺素、视黄酸信号在眼睛转移中具有决定性作用(Shao *et al.*, 2017)。石斑鱼变态发育的典型特征是背鳍棘和腹鳍棘的生长和退化,三叉棘的形成和退化在石斑鱼发育中具有生态适应性,但三叉棘在发育史中的意义还未见相关报道。斜带石斑鱼仔鱼变态过程与甲状腺细胞生成和活动密切相关,变态高峰期甲状腺细胞活动也十分活跃,变态后期甲状腺活动也减弱(唐啸尘等, 2010)。*E. marginatus* 幼鱼在全长 2.9 mm 时形成背鳍棘, 5.5 mm 时形成腹鳍棘, 13.8 mm 幼鱼变态完成, 26.8 mm 开始营定居生活(Cunha *et al.*, 2013)。本研究中杂交石斑鱼幼鱼在全长 3 mm 时形成背鳍棘和腹鳍棘,全长 21.5 mm 时三叉棘退化,完成变态发育, 55.3 mm 时表型特征与成体相似。本文杂交石斑鱼完成变态发育的体长大于 Dusky grouper,可见杂交石斑的生长速度比较快,具有明显的杂交优势。

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*♀)和赤点石斑鱼(*E. akaara*♂)杂交受精率、孵化率和畸形率分别为 87.3%、91.6%和 9.5%(杨求华等, 2014)。虎龙杂交斑是目前石斑鱼中养殖最普遍的杂交品种,杂交受精率 97%,孵化率为 81%,苗种成活率为 5%~10%(张海发等, 2014)。本研究中,金虎斑的受精率、孵化率分别为 76.67%和 86.67%,杂交后代畸形率相当低,仅为 6.33%左右,而且杂交后代生长速度快,65 d 鱼苗生长全长达到 8.89 cm; 5 个月生长全长达 17 cm,体重达 150 g; 1 龄时全长达 32.58 cm,体重达 559.76 g,生长最快的全长达 34.18 cm,体重达 640.61 g。珍珠龙胆发育至 70 d 时,幼鱼平均全长为 7.55 cm(李炎璐等, 2015),5 月龄体长为 17 cm,体重为 100 g; 1 龄时全长达 26.24 cm,体重达 343.05 g; 1 龄金虎斑体

重是珍珠龙胆的 1.63 倍。可见利用蓝身大斑石斑鱼和鞍带石斑鱼雄鱼分别与棕点石斑鱼雌鱼杂交,蓝身大斑石斑鱼为父本的杂交后代在生长方面具有更显著的杂交优势,是一个具有养殖前景的杂交种。

3.4 杂交遗传基础

棕点石斑鱼核型为 $2n=48(48t)$,NF 为 48(舒虎等, 2012),蓝身大斑石斑鱼染色体核型为 $2n=48t$,2 种鱼的染色体属于石斑鱼属中典型的高位类原始类群,是进化过程中出现较早的物种(刘苏等, 2017)。另外,从其胚胎发育、变态发育和鱼苗的生长方面也可以证明,2 种鱼在杂交育种中不存在任何遗传障碍,杂交后代与亲本在分子基础上的遗传研究还在开展中,之后将逐步为 2 种鱼的杂交育种提供丰富的遗传佐证。

本研究通过对蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼杂交受精卵胚胎发育、变态发育,受精率、孵化率和畸形率研究,以及杂交后代的生长比较分析,说明以上 2 种石斑鱼在遗传上具有较高的相似性,完全可以实现杂交育种,而且杂交后代体色趋同性强,具有明显的生长快的杂交优势,是一个具有推广养殖前景的新杂交种,本研究结果为以上 2 种石斑鱼杂交育种提供了一定的遗传依据。

参 考 文 献

- Bao BL. The eye migration and evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 728-737 [鲍宝龙. 比目鱼类的眼睛移位和不对称的进化起源. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 728-737]
- Chen C, Kong XD, Li YL, *et al.* Embryonic and morphological development in the larva, juvenile, and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 135-145 [陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 135-145]
- Chen ZF, Tian YS, Wang PF, *et al.* Embryonic and larval development of a hybrid between kelp grouper *Epinephelus moara*♀×giant grouper *E. lanceolatus*♂ using cryopreserved sperm. *Aquaculture Research*. 2018, 1-7. DOI: 10.1111/are.13591
- Cunha ME, Ré P, Quental-Ferreira H, Gavaia PJ, *et al.* Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. *Journal of Fish Biology*, 2013, 83(3): 448-465
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of

- Agriculture. 2016 yearbook of fishery statistics of China. Beijing: China Agriculture Press, 2016, 5 [农业部渔业渔政管理局. 2016年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016, 5]
- Fu SY, Liu JY, Wang YB, *et al.* Study on the model of pond net box culture of brown spot grouper. Fisheries Science and Technology Information, 2013, 40(2): 64–65 [符书源, 刘金叶, 王永波, 等. 棕点石斑鱼池塘网箱养殖模式研究. 水产科技情报, 2013, 40(2): 64–65]
- Glamnina B, Glavić N, Skaramuca B, *et al.* Early development of the hybrid *Epinephelus costae*♀×*E. marginatus*♂. Aquaculture, 2001, 198(1–2): 55–61
- Huang YS, Li ZB, Ning YF, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in hybrid giant tiger grouper. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 14706–14710
- Kai YH, Su HM, Tai KT, *et al.* Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine, 2010, 28(4): 996–1001
- Li YL, Chen C, Wang QY, *et al.* Comparative analysis of growth characteristics between hybrid F₁ by *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus septemfasciatus* (♂) and the offspring of their parents. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 42–49 [李炎璐, 陈超, 王清印, 等. 云纹石斑鱼(*E. moara*) (♀) × 七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*) (♂) 杂交 F₁ 生长特征与其亲本子代的比较. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 42–49]
- Lin B, Huang ZW, Luo J, *et al.* Embryonic development observation of *Epinephelus fuscoguttatus*. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2010, 23(1): 87–93 [林彬, 黄宗文, 骆剑, 等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 87–93]
- Liu L, Zhang Y, Chen C, *et al.* Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid F₁ (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 33–41 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂) F₁ 染色体制备方法及核型分析. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 33–41]
- Liu S, Yang Y, Zhang HF, *et al.* The karyotype of *Epinephelus tukula*. Marine Sciences, 2017, 41(12): 46–51 [刘苏, 杨宇, 张海发, 等. 蓝身大斑石斑鱼染色体核型分析. 海洋科学, 2017, 41(12): 46–51]
- Liufu YZ, Zhao HH, Liu XC *et al.* Preliminary study on the hybrid red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*)♂×Orange spotted grouper(*E. coioides*)♀. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(3): 72–75 [刘付永忠, 赵会宏, 刘晓春, 等. 赤点石斑鱼♂与斜带石斑鱼♀杂交初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 72–75]
- Lo LC, Yue GH. Microsatellites for broodstock management of the tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. Animal Genetics, 2008, 39(1): 90–91
- Meng QW, Su JX, Miao XZ. Fishes Taxonomy. Beijing: China Agriculture Press, 1995, 606–622 [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京, 中国农业出版社, 1995, 606–622]
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. Nature Genetics, 2017, 49(1): 119–124
- Shen SX. Establishment of hatchery and broodstock techniques of potato grouper, *Epinephelus tukula*. NTOU: Department of Aquaculture, 2011, 6: 28 [沈士新. 蓝身大石斑(*Epinephelus tukula*) 种苗繁殖及育成技术之研究. 台湾海洋大学: 水产养殖学系, 2011, 6: 28]
- Shu H, Wei QL, Luo LJ, *et al.* Karyotypes analysis of four grouper fishes from coastal waters of Guangdong. Guangdong Agricultural Sciences, 2012(8): 124–128 [舒虎, 魏秋兰, 罗丽娟, 等. 广东沿海4种石斑鱼的染色体组型分析. 广东农业科学, 2012(8): 124–128]
- Song ZX, Chen C, Zhai JM, *et al.* Biological characteristics and progress of artificial breeding technique for kelp bass, *Epinephelus moara*. Fishery Information and Strategy, 2012, 27(1): 47–54 [宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼生物学特性及人工繁育技术研究进展. 渔业信息与战略, 2012, 27(1): 47–54]
- Tian YS, Jiang J, Wang N, *et al.* Sperm of the giant grouper: Cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper. Journal of Reproduction and Development, 2015, 61(4): 333–339
- Tian YS, Chen ZF, Duan HM, *et al.* The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara*(♀)×*E. lanceolatus*(♂) by using cryopreserved and the related genetic effect analysis. Journal of Fisheries of China, 2017a, 41(12): 1807–1819 [田永胜, 陈张帆, 段慧敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应. 水产学报, 2017a, 41(12): 1807–1819]
- Tian YS, Duan HM, Tang J, *et al.* Analysis of phenotypic quantitative traits of kelp grouper, giant grouper and hybrid progeny. Journal of Shanghai Ocean University, 2017b, 26(6): 808–818 [田永胜, 段会敏, 唐江, 等. 石斑鱼杂交种“云龙斑”与亲本的表型数量性状判别分析. 上海海洋大学学报, 2017b, 26(6): 808–818]
- Tang XC, Liu XC, Lin HR. The development of thyroid of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) larvae during metamorphosis. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 210–215 [唐啸尘, 刘晓春, 林浩然. 斜带石斑鱼仔鱼变态

- 过程中甲状腺的发育变化. 水生生物学报, 2010, 34(1): 210–215]
- Wang HS. The problems and situation in the artificial propagation of grouper, *Epinephelus*. Journal of Dalian Fisheries University, 1997, 12(3): 44–51 [王涵生. 石斑鱼 *Epinephelus* 人工繁殖研究的现状与存在问题. 大连水产学院学报, 1997, 12(3): 44–51]
- Wang JG, Qiao ZG, He QH. Study on artificial seedling technology of the brown grouper. Scientific Fish Farming, 2008(7): 25–26 [王建钢, 乔振国, 何启惠. 棕点石斑鱼人工育苗技术研究. 科学养鱼, 2008(7): 25–26]
- Yang QH, Huang ZC, Zheng LY, et al. Embryonic development and growth of hybrid from the hybridization of *Epinephelus moara*(♀)×*E. akaara*(♂). Marine Fisheries, 2014, 36(3): 224–232 [杨求华, 黄种持, 郑乐云, 等. 云纹石斑鱼(♀)×赤点石斑鱼(♂)杂交子代胚胎发育及生长. 海洋渔业, 2014, 36(3): 224–232]
- Yang SS. Crossbreeding of *Epinephelus coioides*♀ and *E. lanceolatus*♂ and genetic analysis of the hybrid. Master's Thesis of South China Normal University, 2010 [杨少森. 斜带石斑鱼♀与鞍带石斑鱼♂杂交及 F₁ 遗传分析. 华南师范大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Yang Y, Xie Z, Peng C, et al. The complete mitochondrial genome of the *Epinephelus tukula* (Perciformes, Serranidae). Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(1): 520–522
- Yeh SL, Dai QC, Chu YT, et al. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. Aquaculture, 2003, 228(1–4): 371–381
- Yu HH, Li YL, Chen C, et al. Feeding habits and growth characteristics of larval, juvenile, and young F₁ of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂). Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 968–977 [于欢欢, 李炎璐, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 仔、稚、幼鱼的摄食与生长特性分析. 中国水产科学, 2015, 22(5): 968–977]
- Zhang HF, Lin HR, Zhang Y, et al. Breeding method of hybrid "tiger dragon grouper". Patent number: ZL201010249402, 2014.03.05 [张海发, 林浩然, 张勇, 等. 杂交“虎龙斑”的培育方法. 专利号 ZL201010249402, 授权公告日 2014.03.05]
- Zhou L, Wen WM, Li JL, et al. Studies on embryonic development, morphological development and feed changeover of *Epinephelus lanceolatus* larva. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(1): 293–302 [周玲, 翁文明, 李金亮, 等. 鞍带石斑鱼胚胎发育及仔鱼形态发育、饵料转变的观察研究. 中国农学通报, 2010, 26(1): 293–302]
- Zhou Y, Huan YL, Luo J, et al. Methylation-sensitive amplification polymorphism analysis of genomic DNA methylation on *Epinephelus lanceolatus*, *Epinephelus fuscoguttatus* and their hybrid generation. Journal of Hainan University (Natural Science), 2017, 35(2): 145–152 [周莹, 韩玉龙, 骆剑, 等. 鞍带石斑鱼、棕点石斑鱼及其杂交子代 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 海南大学学报(自然科学版), 2017, 35(2): 145–152]

(编辑 冯小花)

Development and Growth of Hybrid Offspring of Brown Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × Blue Speckled Grouper *Epinephelus tulcula* (♂) Using Cryopreserved Sperm

TIAN Yongsheng^{1,2}①, TANG Jiang^{1,3}, MA Wenhui⁵, CHENG Meiling^{1,4}, LI Zhentong^{1,3}, WU Yuping^{1,4},
ZHANG Jingjing^{1,3}, WANG Linna^{1,2}, PANG Zunfang⁵, WANG Xiaomei⁵, ZHAI Jieming⁵

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

Abstract In the natural environment, there is reproductive isolation between *Epinephelus tulcula* and *E. fuscoguttatus* due to their different geographical distribution and reproduction time and temperature. In this study, we used frozen sperm from *E. tulcula* and eggs from *E. fuscoguttatus* for artificial insemination. The fertilized eggs were incubated in water at a temperature of 30 °C and salinity of 20. The embryonic development and post-embryonic metamorphosis were observed in detail. The morphological characteristics and developmental times of hybrid offspring were observed using a microscope and dissecting mirror. We determined the fertilization rate, hatching rate, and deformity rate, and the fry growth parameters were measured. The results showed that the fertilized eggs completed embryo development 1037 maf (min after fertilization). Early in gastrula an embryonic shield was formed on one side of the germ layer, and the neural tube also began to appear when the blastopore was closed. Additionally, as the optic vesicle and the ear vesicle developed, the Kirschner's capsule (end ball) also developed. It was found that the embryoid twitch preceded the heartbeat. When the sarcomere developed to 23 pairs (977 maf), the heart began to beat intermittently at a rate of 98 beats/min and the interval of 24~40 s. The interval of the heartbeat reduced at 1018 maf with a heart rate of 93 beats/min, and then the intermittent phenomenon disappeared. These phenomena have not been documented in previously. The typical feature of metamorphosis is the growth and degeneration of the trigeminal spine. When the hybrid juvenile grew to 3 mm (10 daf, days after fertilization), it formed dorsal and pelvic pin spines. When the length reached 21.5 mm (35 daf), the trigeminal spine degenerated and the metamorphosis was complete. When hybrid juveniles grew to 55.3 mm (45 daf), their phenotypic characteristics were similar to that of the adult. The fertilization rate, hatching rate, and malformation rate of the frozen sperm were (76.67±5.77)%, (85.67±5.13)%, and (6.33±1.54)%, respectively, and there was no significant difference in these parameters when compared to those of fresh sperm ($P<0.05$). At the 65 daf, the body length of hybrid fry reached 8.89 cm. Then, the offspring of the hybrids tended to be more consistent in body color and they grew very fast. The average body length and body weight of hybrid fish were (32.58±1.60) cm and (559.76±80.85) g at one year old. By contrast farming, the weight of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. tulcula*♂ was 1.63-fold of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂, and the total length of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. tulcula*♂ was 1.24-fold of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂. The growth equation in this period was $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$. The results suggest that there is no genetic disorder in the hybrid embryos and post-embryonic development between *E. tulcula*♂ and *E. fuscoguttatus*♀. The offspring showed high fertility and hatching rate, but low malformation rate. Moreover, the offspring showed heterosis of rapid growth. The study provides a genetic basis for hybrid breeding and seed cultivation of these two grouper species.

Key words *Epinephelus tulcula*; *Epinephelus fuscoguttatus*; Crossbreeding; Embryo development; Metamorphosis; Survival rate

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180907001

http://www.yykxjz.cn/

王桂兴, 张晓彦, 孙朝徽, 赵雅贤, 都威, 侯吉伦, 王玉芬. 牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 48-55

Wang GX, Zhang XY, Sun ZH, Zhao YX, Du W, Hou JL, Wang YF. Genetic analysis of four generations of a successive meiogynogenetic population in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 48-55

牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析*



王桂兴 张晓彦 孙朝徽 赵雅贤 都威 侯吉伦^① 王玉芬^①

(中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100)

摘要 为了研究纯合度和遗传相似度在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)连续四代减数分裂雌核发育家系中的变化规律,本研究利用分布在不同连锁群上的 24 个高重组率微卫星标记对牙鲆连续减数分裂雌核发育二代(G2)、三代(G3)、四代(G4)家系及普通家系对照组进行了遗传分析。结果显示,24 个微卫星位点在对照组、G2、G3、G4 家系中,分别检测到 96、42、32 和 32 个等位基因,平均等位基因数分别为 4.00、1.98、1.33 和 1.33;期望杂合度分别为 0.6416、0.3472、0.1694 和 0.1492;纯合度分别为 0.3503、0.6528、0.8306 和 0.8508;遗传相似系数分别为 0.5822、0.9238、0.9890 和 0.9988。24 个位点中已有 17 个纯合,但尚有 7 个保持杂合状态。同时,将上述结果和已发表的减数分裂雌核发育一代(G1)家系的数据进行分析,结果表明,诱导连续减数分裂雌核发育不仅能提高个体的纯合度,同时也可提高子代个体间的遗传相似度;纯合度和遗传相似度在 G1、G2 和 G3 家系中能够得到逐步提高,代际之间差异显著($P<0.05$);但在 G4 家系中趋于稳定,与 G3 家系差异不显著。G4 家系的遗传相似性(0.9988)已高于连续 20 代全同胞交配所获得的理论值(0.9860),连续诱导减数分裂雌核发育是快速建立鱼类近交系的良好方法。

关键词 牙鲆; 微卫星; 雌核发育克隆系; 遗传多样性; 杂合位点

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0048-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽亚目(Pleuronectoidei)、牙鲆科(Paralichthyidae)、牙鲆属(*Paralichthys*),广泛分布于中国沿海地区、俄罗斯远东海域、日本及朝鲜半岛,为冷温性大型经济鱼类,也是中国重要的海产经济鱼类。牙鲆雌性个体生长速度快于雄性,在人工养殖条件下,445 日龄时,雌牙

鲆的平均体重是雄牙鲆的 1.8 倍;773 日龄时,差异达 2.9 倍(Yamamoto, 1999)。在生产中,养殖全雌牙鲆将获得更高的经济效益。鉴于此,中国水产科学研究院北戴河中心实验站的科研人员利用人工诱导减数分裂雌核发育技术,培育出全雌牙鲆新品种“北鲆 1 号”和单交种“北鲆 2 号”(刘海金等, 2017),并在生产上进行了推广应用,取得了良好的经济效益。

* 河北省自然科学基金优秀青年科学基金(C2018107006)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Hebei Province(C2018107006), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 王桂兴, E-mail: 13903343053@163.com

^① 通讯作者: 侯吉伦, 副研究员, E-mail: jilunhou@126.com; 王玉芬, 副研究员, E-mail: wangyf-8000@163.com

收稿日期: 2018-09-07, 收修改稿日期: 2018-10-13

人工诱导减数分裂雌核发育具有操作简便, 诱导效率高等特点, 可快速提高纯合度和固定母本性状, 在鱼类性别控制及遗传分析等方面都具有重要价值, 已在上百种鱼类中得到应用(Komen *et al.*, 2007)。牙鲆人工诱导雌核发育研究始于1986年, 田畑和男等(1986)通过冷休克和静水压染色体加倍技术, 建立了牙鲆减数分裂和有丝分裂雌核发育的诱导方法, 并用同工酶证明了纯合子的成立。Yamamoto(1999)在诱导牙鲆有丝分裂的基础上, 再次诱导减数分裂雌核发育, 建立了克隆系, 并用DNA指纹图谱技术进行了验证。徐成等(2002)运用同工酶、王伟等(2005)通过微卫星标记均证明减数分裂雌核发育牙鲆存在杂合基因型, 不能直接用于培育克隆。但连续诱导减数分裂雌核发育能够显著提高鱼类的纯合度和相似度, 在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)连续两代雌核群体(叶小军等, 2010)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)连续三代减数雌核发育群体(唐首杰等, 2014)和翘嘴鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)连续两代减数分裂雌核发育群体(李倩等, 2015)中得到验证。

本研究室开展了大量的牙鲆雌核发育诱导研究, 优化了减数分裂雌核发育的诱导参数(刘海金等, 2010a), 并用微卫星标记进行了遗传分析(刘海金等, 2010b; 朱晓琛等, 2006)。自2007年, 开展了连续多代减数分裂雌核发育家系的制备, 分别于2009和2014年建立了连续减数分裂雌核发育二代和三代家系, 并利用高重组率微卫星标记开展了遗传特征分析(王桂兴等, 2012; 侯吉伦等, 2014)。研究表明, 连续减数分裂雌核发育诱导不仅提高了个体的纯合度, 同时提高了子代个体间的遗传相似度。

本研究在上述基础上, 利用2014年所制备的性成熟三代个体进行诱导, 获得了牙鲆连续减数分裂雌核发育四代家系, 并用覆盖牙鲆连锁群的24个微卫星标记进行了纯合度、遗传相似度等遗传特征的分析, 进一步探讨等位基因在连续多代减数分裂雌核发育过程中的遗传变化规律, 以期为牙鲆的纯系建立及品种改良提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 连续四代减数分裂雌核发育家系的构建

本研究在中国水产科学研究院北戴河中心实验站开展。2007年, 以真鲷(*Pagrus major*)精子作为异源精子, 经紫外线照射灭活, 与1尾野生雌性牙鲆所产卵子受精, 并在激活后3 min, 施以0℃、45 min的冷休克处理进行减数分裂雌核发育诱导, 获得第一代减

数分裂雌核发育家系(G1)。2009年, 利用G1内发育成熟的1尾个体再度诱导减数分裂雌核发育, 获得连续第二代减数分裂雌核发育家系(G2)。2014年, 以G2家系内性成熟的1尾个体进行减数分裂雌核发育诱导, 获得了连续三代减数分裂雌核发育家系(G3)。2018年, 对G3家系内成熟的1尾雌性个体再次诱导雌核发育, 获得连续四代减数分裂雌核发育家系(G4)。

1.2 样品采集与基因组DNA提取

采集作为母本的G3家系亲鱼无眼侧的胸鳍和G4家系的15日龄仔鱼全鱼40尾, 置于100%乙醇中固定, -20℃保存。以2尾野生雌雄鱼普通受精的后代作为对照组(Control, C)。基因组DNA采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根, DP324-02)提取。另外, 本实验室尚保存着G2和G3家系的DNA样品(各30尾), 在本研究中用相同标记再次进行了检测和数据分析。

1.3 微卫星引物

微卫星引物全部选自牙鲆第二代遗传连锁图谱(Castaño-Sánchez *et al.*, 2010), 根据本课题组(刘永新等, 2013; Liu *et al.*, 2013)的实验结果, 选取24个高重组率标记, 所选位点覆盖牙鲆24个连锁群。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列、退火温度和GenBank登录号见表1。

1.4 微卫星基因型检测

利用FAM和HEX分2批对24对引物的正向引物5'端进行荧光标记, 标记为FAM, 被激发后呈蓝色; 标记为HEX, 被激发后呈绿色。PCR反应体系为15 μl, 包括10×buffer 1.5 μl, Mg²⁺ (25 mmol/μl) 1.5 μl, dNTPs (10 mmol/μl)各0.25 μl, 上下游引物(10 pmol/μl)各0.15 μl, Taq DNA聚合酶(5 U/μl) 0.2 μl, 模板DNA(30~50 ng) 1 μl, ddH₂O 9.5 μl。PCR反应程序: 94℃预变性3 min; 94℃ 25 s, 50℃~54℃ 25 s, 72℃ 60 s, 35个循环; 最后72℃延伸10 min。PCR扩增在PE9700型PCR仪上进行。取1 μl PCR产物与10 μl的Hidi Formamid和GeneScan™-500 LIZ Size Standard混合液(Hidi Formamid : GeneScan™-500 LIZ Size Standard=80 : 1)充分混合, 95℃变性5 min, 结束后迅速转移至冰上冷却。处理后的产物通过ABI 3700测序仪进行毛细管电泳, 并利用GeneMarker V2.2.0软件进行基因分型。

1.5 统计指标

等位基因数(Number of alleles, N_a)、期望杂合度

表 1 24 对微卫星标记位点引物序列、核心序列、退火温度和 GenBank 登录号
Tab.1 Primer sequences, core sequences, annealing temperatures, and accession number in GenBank
of 24 microsatellite loci in the *P. olivaceus*

位点 Locus	重复碱基 Core sequences	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 T_m	连锁群 Linkage group	登录号 GenBank accession No.
<i>Poli1076TUF</i>	(AC) ₃₄	F: GGTTTAAACGGTAGAGTTTGCACAGC R: GGAAGCCACTACCATACCAATACCA	62	1	AB458945
<i>Poli1077TUF</i>	(CA) ₁₁	F: CCTGCTCACTCACTGTTTCGTA CTCT R: ACAGGAGTGAATGATGGAGACGAC	62	2	AB458946
<i>Poli1831TUF</i>	(CA) ₂₀	F: TCACCTCACAGTGTTC AATAACC R: ACACAAGACGAGGACCTCTACC	62	3	AB459116
<i>Poli148TUF</i>	(TG) ₁₆	F: GGCTGCTGACGTAGATGACA R: CGGAGTACCGGTCAGAGAAC	62	4	AB459422
<i>Poli9TUF</i>	(CA) ₂₀	F: GATCTGCAGAAACACACTCA R: GCGAGTTCTTCTCAAATGC	62	5	AB037980
<i>Poli107TUF</i>	(CA) ₂₇	F: TGGAAGAGATGTGCACTTGACTGTC R: AACTGTCACCTCTGAGTGGACCG	60	6	AB037990
<i>Poli159TUF</i>	(CA) ₁₀	F: CACAAGGAAGTCCCCATGTT R: GGTGTGTGTGGGAGTGACAG	62	7	AB459431
<i>Poli1825TUF</i>	(GA) ₂₉	F: ACAAGCGGTGCACATTTAAC R: TTCAAACAGGAGCTGCATTG	62	8	AB459110
<i>Poli1936TUF</i>	(CA) ₁₃	F: CAGAAATCGTTATGCACCCATT R: GCTGCTAAATCCCCTTGACAG	60	9	AB459201
<i>Po15</i>	(CA) ₁₀	F: GTTTGTTTGGCTGCACAATG R: GCACCCTCTCAGCTTGTTCT	60	10	AB057727
<i>Poli907TUF</i>	(TG) ₁₃	F: CCACACTGTCGGGCTATTA R: GTGTTCCAGATGGACGGACT	60	11	EF112845
<i>Poli212TUF</i>	(CA) ₃₃	F: ATTTTAATTG CCAGTACACC CCTCC R: CCTTCGTCTAATTAATTGACAAGTGCA	60	12	AB459478
<i>Poli966TUF</i>	(CA) ₁₅	F: GCCTGGAGGAGAAAACAACA R: AACCTCCAAGGCACAACAAC	60	13	EF112892
<i>Poli1819TUF</i>	(CA) ₂₅	F: GGAGAATGCGAGTTCTGTCTTT R: AACTGCAATAATGCACCTCCTT	63	14	AB459105
<i>Po13</i>	(CA) ₁₃	F: ATCCCGTAACAGCCAATCAG R: CGTCCAGGACAATCAGGACT	60	15	AB046746
<i>Po25A</i>	(GATG) ₁₀	F: AGTCAGGTTTCAGGCCACTG R: CAGAAGTGTGTCGCAGGAA	60	16	AB046749
<i>Poli1915TUF</i>	(CA) ₂₀	F: CACTCGAAGCTCCTAACAGTGA R: CCTTTGCTCTGAGCTGAACTG	60	17	AB459185
<i>Poli1010TUF</i>	(CA) ₁₇	F: TAACTCCGGTCTGTGAAGC R: CAGTCCGATCCAACACAATG	60	18	AB458907
<i>Poli1490TUF</i>	(CTT) ₇	F: CAACACTGCGTCACCATCTT R: AGTGTCCACACCTCTCAGC	60	19	DQ889052
<i>Poli1838TUF</i>	(CA) ₁₆	F: CTCTTCAGTTAACCCCAAGTG R: TGACACAGCATTACCTGAGACC	54	20	AB459120
<i>Poli1925TUF</i>	(CA) ₁₇	F: GTAAAACAATGTTGCAGCCAGA R: TCCTCCATCAGTGTGAGTAAGG	62	21	AB459193
<i>poli1498TUF</i>	(AGA) ₁₅	F: TTCCTCCTGATGCTTCTTGTT R: TTCGGCAAAAACCTGACACT	58	22	DQ889058
<i>Poli-RC27-TUF</i>	(AC) ₂₄	F: CCAATGCATCAATACGTACACA R: GAAGGGGTGCTATGAGATGG	55	23	AB030937
<i>Poli1872TUF</i>	(CA) ₁₈	F: CCAGAGGACAGTTGGCTTTC R: GGAGCGACCACGTAGAAGAC	61	24	AB459147

表3 雌核发育系 G1、G2、G3、G4 和对照组 C 的遗传参数的均值比较

Tab.3 T-test of genetic parameters among G2, G3, G4 and control

家系 Family	杂合位 点数 Number of heteroge- neous locus	等位 基因数 N_a	期望 杂合度 H_e	纯合度 H_{om}
C	23	4.00±1.3 ^a	0.6497±0.1816 ^a	0.3503±0.1816 ^a
G1*	15	2.00±0.0 ^b	0.5071±0.0019 ^b	0.4929±0.0019 ^b
G2	13	1.98±0.8 ^c	0.3472±0.2418 ^c	0.6528±0.2418 ^c
G3	7	1.33±0.5 ^d	0.1694±0.2445 ^d	0.8306±0.2445 ^d
G4	7	1.33±0.5 ^d	0.1492±0.2331 ^d	0.8508±0.2331 ^d

*引用王桂兴等(2012)的数据; 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$), 下同

* Data from Wang *et al* (2012); values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), the same as below

位基因数和期望杂合度显著低于对照组($N_a=4.0$, $H_e=0.6497$) ($P<0.05$), 而纯合度则显著高于对照组($H_{om}=0.3503$) ($P<0.05$); 前三代连续雌核发育系 G1、G2 和 G3 在遗传参数上有显著的变化, 到第四代 G4 家系在遗传上趋于稳定。如纯合度, 从 G1(0.4929)到 G2(0.6528), 再到 G3(0.8306)逐步提高, 且代际间差异显著($P<0.05$), 但 G3 与 G4(0.8508)差异不显著。另外, 杂合位点数随着雌核发育代数的增加而逐渐减少, 但从 G3 到 G4 家系时趋于稳定, 不再明显减少。

2.2 遗传相似度分析

结合已发表的 G1 数据, 对连续雌核发育二倍体及对照组(C)家系内个体间的遗传相似度进行均值比较(表4)。结果表明, G1、G2、G3 和 G4 的遗传相似度分别为 0.8917、0.9238、0.9890 和 0.9988, 均显著高于对照组(0.5822), G3 和 G4 的遗传相似度已超过近交系的理论值(0.986)。在连续减数分裂雌核发育过程中, 遗传相似度的变化规律与纯合度类似, G1 到 G2, 再到 G3 均有显著提高($P<0.05$), G3 到 G4 增幅不显著。

2.3 不同位点的纯合效率和近交系数

表5结果显示, G4 家系中, 24 位点中有 17 个已完全纯合, 近交系数达 1.0000, 但仍有 7 个位点保持杂合状态, 近交系数仅为 0.0963~0.3439。近交系数是衡量微卫星位点纯合速率的一个指标, 并且微卫

表4 G1、G2、G3、G4 和对照组家系内的个体间遗传相似度的

Tab.4 Genetic similarity indices among G1, G2, G3, G4 and control

家系 Family	均值 Mean	最小值 Min	最大值 Max
C	0.5822±0.0240 ^a	0.3623	0.7720
G1*	0.8917±0.0182 ^b	0.7233	1.0000
G2	0.9238±0.0176 ^c	0.7695	1.0000
G3	0.9890±0.0123 ^d	0.9542	1.0000
G4	0.9988±0.0112 ^d	0.9895	1.0000

星位点的纯合速率与重组率紧密相关。在 7 个杂合位点中, *Poli1825TUF*、*Po13* 和 *Po25A* 3 个位点仅检测到 1 个纯合个体, 近交系数为 0.0963, 重组率高达 0.9750。*Po15*、*Poli1010TUF* 和 *Poli1872TUF* 3 个位点纯合个体数为 2 个, 近交系数为 0.1855, 重组率为 0.9500。*Poli1925TUF* 检测到的纯合个体数为 4, 近交系数较高, 为 0.3439, 重组率为 0.9000。

3 讨论

本研究首次报道了牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的建立, 并通过 24 个高重组率微卫星标记进行了遗传特征研究。连续诱导减数分裂雌核发育能够快速提高牙鲆的纯合度和相似度, 与 Nagy 等(1982)的研究结果相比, 牙鲆减数分裂雌核发育一代相当于 9~10 个世代的全同胞交配, 二代相当于 11~12 个世代的全同胞交配(王桂兴等, 2012)。而 G4 家系较前三代雌核发育家系具有更高的纯合度和相似度, 其遗传相似度(0.9988)已高于连续 20 代全同胞交配所获得的理论值(0.9860)。另外, 在大黄鱼(叶小军等, 2010)连续两代减数雌核发育群体内个体间平均相似系数达 0.8672, 团头鲂(唐首杰等, 2014)连续三代减数分裂雌核发育群体内个体间的平均遗传相似度为 0.9845, 翘嘴鲌(李倩等, 2015)连续两代减数分裂雌核发育群体个体间的平均遗传相似度为 1.0000。上述研究结果表明, 连续诱导减数分裂雌核发育, 能快速地提高遗传相似系数, 是快速建立鱼类近交系的良好方法。

本研究与大黄鱼(叶小军等, 2010)、团头鲂(唐首杰等, 2014)等连续雌核发育研究均显示, 连续诱导减数分裂雌核发育过程中, 不同位点的纯合速率不同, 在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系中也存在类似现象(王日芳等, 2017)。另外, 结合已经发表的牙鲆雌核发育一代、二代及三代结果, 发现标记的纯合速率与其重组率显著相关, 低重组率的位点纯合

表 5 G4 家系中 24 个微卫星位点上纯合个体数量、比率、重组率和近交系数
Tab.5 Number of homozygote, recombination frequency, breeding coefficients in gynogens of *P. olivaceus* for 24 detected microsatellite loci in G4

位点 Locus	纯合个体数 Number of homozygote	纯合比例 Ratio	重组率 Recombination frequency	近交系数 F
<i>Poli1076TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1077TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1831TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli148TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli9TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli107TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli159TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1825TUF</i>	1	0.0250	0.9750	0.0963
<i>Poli1936TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Po15</i>	2	0.0500	0.9500	0.1855
<i>Poli907TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli212TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli966TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1819TUF</i>	1	0.0250	0.9750	0.0963
<i>Po13</i>	1	0.0250	0.9750	0.0963
<i>Po25A</i>	1	0.0250	0.9750	0.0963
<i>Poli1915TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1010TUF</i>	2	0.0500	0.9500	0.1855
<i>Poli1490TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1838TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1925TUF</i>	4	0.1000	0.9000	0.3439
<i>Poli1498TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>PoliRC27TUF</i>	40	1.0000	0.0000	1.0000
<i>Poli1872TUF</i>	2	0.0500	0.9500	0.1855
平均 Mean	27.3	0.7219	0.2781	0.7579

较快, 而部分高重组率微卫星标记的纯合度不随减数分裂雌核发育代数的增加而提高(王桂兴等, 2012; 侯吉伦等, 2014)。例如, *Po25A* 位点在雌核发育一代的重组率为 0.9333, 二代为 0.9667, 三代为 1.0000, 四代为 0.9750; *Po13* 位点在一代的重组率为 0.9667, 二代为 0.9333, 四代为 0.9750。对于上述 2 个位点, 每一代出现的纯合个体数在 0~2 之间, 代际之间的重组率差异不明显。而微卫星位点重组率的高低取决于其在染色体上的位置。在水产动物上, 根据重组率的差异, 在众多物种上开展了标记-着丝粒作图, 以推定连锁群上标记和着丝粒的相对距离(Ji *et al*, 2009;

Li *et al*, 2008)。在牙鲆上, 韩慧宗等(2013)开展了微卫星标记-着丝粒作图, 并根据重组率的不同, 将标记划分为远着丝粒区域、连锁群中部和着丝粒区域 3 种类型, 远着丝粒区域标记的重组率高于 0.677。本研究中, 7 个杂合位点的重组率均高于 0.9000, 位于远着丝粒区域。研究表明, 在鉴定连续雌核发育二倍体时, 选择远着丝粒区域的标记(高重组率)才能够准确反映其纯合度、杂合度等遗传参数。

要使这些高重组率的位点纯合, 必须在减数分裂雌核发育的基础上再次诱导有丝分裂雌核发育来实现。在牙鲆上, 本团队通过筛选减数分裂雌核发育二倍体作为双单倍体诱导的亲本, 提高了诱导效率, 实现了双单倍体的批量制备(Zhang *et al*, 2018)。利用雌雄双单倍体或纯合克隆系之间的杂交, 可制备杂合克隆(刘海金等, 2017)。杂合克隆的杂种优势明显, 在育种上具有宝贵的价值。但在鱼类上, 利用有丝分裂雌核发育或雄核发育诱导双单倍体效率极低, 基于双单倍体的纯合克隆系制备则难度更高, 目前只有少数几种鱼类成功制备了纯合克隆系(Komen *et al*, 2007)。但从双单倍体到纯合克隆, 再到杂合克隆, 仍有漫长的选育过程, 期间充满着诸多的不确定性。与有丝分裂雌核发育相比, 减数分裂雌核发育拥有较高的诱导效率和后代成活率, 且连续三代和四代减数分裂雌核发育具有较高的纯合度和遗传相似性, 但这些家系之间杂交的杂种优势如何, 目前尚未开展研究。如果连续多代减数分裂雌核发育家系间杂交的杂种优势和杂合克隆系相近, 则这些连续多代减数分裂雌核发育家系可作为纯合克隆系的有益补充, 丰富克隆育种的材料, 加快高产抗逆优质新品种的选育。

综上所述, 通过连续四代减数分裂雌核发育所获得的牙鲆家系, 具有高度的纯合度和遗传相似性, 可用于基因重组热点、杂种优势以及新品种选育等研究。

参 考 文 献

- Castaño-Sánchez C, Fuji K, Ozaki A, *et al*. A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). BMC Genomics, 2010, 11: 554
- Han HZ, Jiang L, Liu Y, *et al*. Identifying genetic characteristics of different diploids in Japanese flounder based on M-C mapping. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 321-329 [韩慧宗, 蒋丽, 刘奕, 等. 基于 M-C 作图鉴定牙鲆不同二倍体的遗传特征. 水产学报, 2013, 37(3): 321-329]
- Hou JL, Li C, Wang GX, *et al*. Analysis of genetic structure of three third-generation of successive meiogynogenetic families in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Engineering Science, 2014, 16(9): 26-32 [侯吉伦, 李超, 王桂兴, 等. 牙鲆连续三代减数分裂雌核发育家系的遗

- 传特征分析. 中国工程科学, 2014, 16(9): 26–32]
- Ji XS, Chen SL, Liao XL, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in *Cynoglossus semilaevis* using gynogenetic diploid families produced by the use of homologous and non-homologous sperm. *Journal of Fish Biology*, 2009, 75(2): 422–434
- Komen H, Thorgaard GH. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, 2007, 269(1): 150–173
- Li Q, Gu ZM, Jia YY, *et al.* Analysis of genetic characteristics of two successive generation meiosis gynogenetic population in *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(1): 1–11 [李倩, 顾志敏, 贾永义, 等. 翘嘴鲈连续两代减数分裂雌核发育群体的遗传特征分析. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 1–11]
- Li YY, Cai MY, Wang ZY, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(1): 83–90
- Liu HJ, Hou JL, Chang YM, *et al.* Induced meiogynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by sperm of red sea bream (*Pagrus major*). *Journal of Fisheries of China*, 2010a, 34(4): 508–514 [刘海金, 侯吉伦, 常玉梅, 等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育. 水产学报, 2010a, 34(4): 508–514]
- Liu HJ, Hou JL, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: A review. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 902–912 [刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902–912]
- Liu HJ, Liu YX, Wang YF, *et al.* Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder. *Journal of Fisheries of China*, 2010b, 34(6): 718–724 [刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异. 水产学报, 2010b, 34(6): 718–724]
- Liu YX, Han HZ, Wang QL, *et al.* Choice of microsatellite markers for identifying homozygosity of mitotic gynogenetic diploids in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Biology*, 2013, 82(2): 588–599
- Liu YX, Zhu YM, Liu YJ, *et al.* Analysis of genetic diversity in Bohai natural population of *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1609–1617 [刘永新, 朱以美, 刘英杰, 等. 牙鲆渤海自然群体的遗传多样性分析. 水产学报, 2013, 37(11): 1609–1617]
- Nagy A, Csányi V. Changes of genetic parameters in successive gynogenetic generations and some calculations for carp gynogenesis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1982, 63(2): 105–110
- Tabata K, Gorie S, Nakamura K. Induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1986, 52(11): 1901–1904 [田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦. 紫外線によるヒラメの雌性発生 2 倍体の誘起条件. 日本水産学会誌, 1986, 52(11): 1901–1904]
- Tang SJ, Li SF, Cai WQ. Analysis of genetic homozygosity and diversity of three successive generations of meio-gynogenetic population in *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(2): 3–8 [唐首杰, 李思发, 蔡完其. 团头鲂连续三代减数雌核发育群体遗传变异的微卫星分析. 淡水渔业, 2014, 44(2): 3–8]
- Wang GX, Liu HJ, Zhang XY, *et al.* Analysis of homozygosity and genetic similarity between two successive generations in a meiogynogenetic Japanese flounder family. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 381–389 [王桂兴, 刘海金, 张晓彦, 等. 牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系的遗传特征. 中国水产科学, 2012, 19(3): 381–389]
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 78–86]
- Wang W, You F, Gao TX, *et al.* Microsatellite markers analysis on artificial meiogynogenetic stock of *Paralichthys olivaceus*. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(7): 107–110 [王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析. 高技术通讯, 2005, 15(7): 107–110]
- Xu C, Wang KL, Xu YL, *et al.* Recombination and expression of paternal gene of isozymes in gynogenetic olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(1): 62–67 [徐成, 王可玲, 徐永立, 等. 雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 62–67]
- Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 1999, 173(1–4): 235–246
- Ye XJ, Wang ZY, Liu XD, *et al.* Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 144–151 [叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄花连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144–151]
- Zhang XY, Wang GX, Sun ZH, *et al.* Mass production of doubled haploids in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2018, 49(2): 420–428
- Zhu XC, Liu HJ, Sun XW, *et al.* Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Zoological Research*, 2006, 27(1): 63–67 [朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性. 动物学研究, 2006, 27(1): 63–67]

Genetic Analysis of Four Generations of a Successive Meiogynogenetic Population in the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*

WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SUN Zhaohui, ZHAO Yaxian, DU Wei, HOU Jilun^①, WANG Yufen^①
(Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100)

Abstract Artificially induced gynogenesis is a form of chromosome manipulation for sex control, accelerating both the elimination of recessive deleterious genes and the rapid establishment of inbred lines that could benefit the breeding progress in fish species. Artificially induced gynogenesis can be divided by mechanism into meiogynogenesis and mitogynogenesis. In this study, the fourth generation of a successive meiogynogenetic population (G4) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was established by induction of meiogynogenesis, in which the eggs of third-generation females (G3) were activated by ultraviolet-irradiated red sea bream (*Pagrus major*) sperm, followed by a cold-shock treatment at 0°C, starting 3 min after activation and lasting 45 min. We evaluated the genetic structure of the control, G2, G3, and G4 populations with 24 microsatellite markers and a high recombination rate that covered all linkage groups of the flounder. The efficiency of successive meiogynogenesis in terms of producing a highly inbred line was quantified by calculating the homozygosity and genetic similarity. The results showed that 96, 42, 32, and 32 alleles were detected in the control, G2, G3, and G4 populations, respectively; the average numbers of alleles were 4.00, 1.98, 1.33, and 1.33, respectively; and the average expected heterozygosities were 0.6416, 0.3472, 0.1694, and 0.1492, respectively. The average homozygosities among the 24 analyzed loci were 0.3503, 0.6528, 0.8306, and 0.8508, respectively. In the G4 population, 17 loci were homozygous, while 7 remained heterozygous. With respect to genetic similarity, the average similarity indexes between offsprings within populations were 0.5822, 0.9238, 0.9890, and 0.9988, respectively. Among G1, G2, and G3 populations, the homozygosity and genetic similarity index increased significantly ($P < 0.05$) with generations. However, the differences in homozygosity and genetic similarity index between G3 and G4 were not significant. Our results indicate that artificially induced successive meiogynogenesis can effectively increase the homozygosity of individuals, as well as the genetic similarity of offspring within a population. Successive meiogynogenesis has a higher induction rate than mitogynogenesis, and therefore is a useful alternative method for establishing clonal lines in fish.

Key words *Paralichthys olivaceus*; SSR; Gynogenesis clonal line; Genetic diversity; Heterozygous locus

^① Corresponding author: HOU Jilun, E-mail: jilunhou@126.com; WANG Yufen, E-mail: wangyf-8000@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181214002

http://www.yykxjz.cn/

胡鹏莉, 吴瑞, 鲁康乐, 王玲, 宋凯, 张春晓. 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 56-65

Hu PL, Wu R, Lu KL, Wang L, Song K, Zhang CX. Effects of replacing fish meal with composite protein on growth, diet digestibility, and gut health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 56-65

复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响^{*}



胡鹏莉 吴瑞 鲁康乐 王玲 宋凯 张春晓^①

(集美大学水产学院 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室 厦门 361021)

摘要 以初均重为(5.80±0.07) g的花鲈(*Lateolabrax maculatus*)幼鱼为实验对象, 研究复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化和肠道健康的影响。用复合蛋白分别替代对照组饲料中0、20%、40%、60%和80%的鱼粉, 配制5种等氮等脂的实验饲料, 分别用这5种饲料投喂花鲈70 d; 养殖实验期间水温为(29.5±1.5)°C, 盐度为29±1, 溶解氧≥6.5 mg/L。养殖实验结束后采集样品进行分析, 结果显示, 20%替代组花鲈生长性能与对照组无显著差异($P>0.05$), 但随鱼粉替代比例的升高, 花鲈增重率(WGR)、存活率(SR)、饲料效率(FE)以及蛋白质效率(PER)显著下降($P<0.05$), 花鲈肠道蛋白酶活性以及饲料干物质、粗蛋白与粗脂肪表观消化率皆显著降低($P<0.05$), 且花鲈后肠黏膜组织结构出现损伤, 肠道促炎因子TNF- α 、IL-1 β 基因表达量升高, 抗炎因子基因IL-4、IL-10表达量相应降低。研究表明, 复合蛋白替代花鲈饲料中鱼粉比例不宜超过20%。

关键词 复合蛋白; 花鲈; 生长; 消化; 肠道组织结构; 炎性因子

中图分类号 S965.211 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0056-10

鱼粉是最常见的饲料蛋白源之一, 因其含有的氨基酸全面、适口性好等优点, 成为水产饲料中最常使用的蛋白源(吴子林, 1995)。至2018年, 我国海水养殖产量已达2000万t(农业部渔业渔政管理局, 2018), 水产养殖业对配合饲料的依赖使得我国对鱼粉的需求量逐年递增。然而鱼粉原料供应量却不断的降低, 同时伴随着现代水产集约化养殖模式的迅猛发展, 过度捕捞以及渔业资源退化等情况, 寻找水产饲料中替代鱼粉的蛋白源已然迫在眉睫(van Huis, 2013; Abowei *et al*, 2011)。

近年来, 昆虫蛋白已逐渐成为动物饲料中蛋白替代的研究热点(Ogunji *et al*, 2008)。目前, 已有黄粉虫、

黑水虻、蚕蛹粉和蝇蛆粉等应用水产饲料研究中。本研究中使用的复合蛋白是一种以豆粕等饲料原料为底物, 由蝇蛆和有益微生物经过严格控制的共生环境进行繁殖、生长、发酵、转化和合成, 再经浓缩和低温烘干而成的高品质动物源性蛋白, 其主要成分为蝇蛆粉, 蛋白含量高, 氨基酸全面, 在保证营养充足的同时, 还有利于改善底物原料利用率和动物肠道健康。已有研究表明, 在用蝇蛆粉替代鱼粉之后, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)可以较好地摄食和消化蝇蛆粉蛋白(Wang *et al*, 2017); 在用家蝇蛆粉替代尖吻鲈饲料中鱼粉的研究中发现, 家蝇蛆粉可以达到75%的替代鱼粉水平而不影响其生长和饲料系数

^{*} 国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-47)]. 胡鹏莉, E-mail: 970260221@qq.com

^① 通讯作者: 张春晓, 教授, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2018-12-14, 收修改稿日期: 2019-01-30

(Lin *et al.*, 2017)。而本研究就是探究复合蛋白在花鲈饲料中替代鱼粉的适宜水平。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)又称为海鲈、七星鲈、寨花等, 由于其为广温、广盐性鱼类, 且其具有味道鲜美、营养价值高、生长快、抗病性强等优势(Men *et al.*, 2014), 而被广泛养殖, 2017年其年产量已达15.66万t, 是我国养殖产量较高的海水鱼类(农业部渔业渔政管理局, 2018)。本研究以花鲈为研究对象, 通过分析复合蛋白替代鱼粉后对花鲈生长、消化及肠道健康的影响, 确定其适宜的鱼粉替代水平, 为复合蛋白在花鲈商业饲料中的合理使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

根据花鲈营养需求, 配制蛋白含量为43%, 脂肪含量为12%的基础饲料。用复合蛋白(由江门鑫肽生物蛋白有限公司提供)分别替代基础饲料中0、20%、40%、60%和80%的鱼粉(复合蛋白与鱼粉营养组成见表1), 并添加三氧化二钇为指示剂配制成5种饲料。

表1 鱼粉与复合蛋白营养组成(%)
Tab. 1 Nutrient composition of fish meal and composite protein (%)

营养成分 Nutrient composition	鱼粉 Fish meal	复合蛋白 Composite protein
氨基酸 Amino acid		
赖氨酸 Lys	6.36	7.56
缬氨酸 Val	3.24	3.57
蛋氨酸 Met	3.25	3.27
异亮氨酸 Ile	3.39	2.67
亮氨酸 Leu	4.20	3.89
苏氨酸 Thr	3.32	2.86
苯丙氨酸 Phe	2.38	2.29
组氨酸 His	2.59	0.61
精氨酸 Arg	4.62	2.83
色氨酸 Trp	0.57	0.31
天冬氨酸 Asp	5.80	3.78
酪氨酸 Tyr	1.69	1.44
丝氨酸 Ser	2.43	4.57
谷氨酸 Glu	8.74	5.80
脯氨酸 Pro	3.17	6.18
甘氨酸 Gly	3.43	4.03
丙氨酸 Ala	3.88	2.70
胱氨酸 Cys	0.78	1.92
营养水平 Nutrient level		
粗蛋白 Crude protein	68.73	69.72
粗脂肪 Crude lipid	9.87	3.43
粗灰分 Crude ash	14.10	7.00

将各种饲料原料粉碎过筛, 然后制成粒径分别为1.5 mm和2.5 mm的颗粒料, 饲料放置于烘箱中在55℃下5 h烘干, 然后用自封袋封好, 保存于-20℃冰箱中备用。饲料配方及营养组成见表2。

表2 实验饲料配方及主要营养成分(干物质, %)
Tab. 2 Formulation and nutrient composition of experimental diets (Dry basis, %)

原料 Ingredients	0	20%	40%	60%	80%
鱼粉 Fish meal	35.00	28.00	21.00	14.00	7.00
复合蛋白 Composite protein	0.00	6.96	13.92	20.87	27.83
面粉 Wheat flour	28.30	27.88	27.47	27.06	26.64
豆粕 Soybean meal	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
鱿鱼膏 Squid paste	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼油 Fish oil	3.00	3.46	3.91	4.37	4.83
豆油 Soybean oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
卵磷脂 Lecithin	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素 C Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
多维 Vitamin premix ^①	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
多矿 Mineral premix ^②	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
三氧化二钇 Yttrium(III)-oxide	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
营养组分 Nutrition level(%)					
粗蛋白 Crude protein	43.26	43.25	43.17	43.12	43.06
粗脂肪 Crude lipid	12.11	12.10	12.08	12.09	12.10
粗灰分 Crude ash	9.87	9.28	9.11	8.39	8.13

注: ①维生素混合物(mg/kg 饲料): 硫胺素, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 B₁₂, 0.1 mg; 维生素 K₃, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.2 mg; 维生素 A 乙酸酯, 32 mg; 维生素 D₃, 5 mg; α -生育酚, 120 mg; 乙氧基喹啉, 150 mg; 微晶纤维素, 1511.7 mg

②复合矿物质(mg/kg 饲料): 一水硫酸镁, 4000 mg; 一水硫酸锰, 50 mg; 碘化钾(1%), 100 mg; 氯化钴(1%), 100 mg; 五水硫酸铜, 20 mg; 一水硫酸亚铁, 260 mg; 一水硫酸锌, 150 mg; 亚硒酸钠(1%), 50 mg; 微晶纤维素, 5270 mg

Notes: ① Vitamin premix (mg/kg diet): thiamin, 25 mg; riboflavin, 45 mg; hydrochloric acid pyridoxine, 20 mg; vitamin B₁₂, 0.1 mg; vitamin K₃, 10 mg; inositol, 800 mg; pantothenic acid, 60 mg; nicotinic acid, 200 mg; folic acid, 20 mg; biotin, 1.2 mg; retinal acetate, 32 mg; vitamin D₃, 5 mg; alpha tocopherol, 120 mg; ethoxy quinoline, 150 mg; microcrystalline cellulose, 1511.7 mg

② Mineral premix (mg/kg diet): MgSO₄·H₂O, 4000 mg; MnSO₄·H₂O, 50 mg; KI(1%), 100 mg; CoCl₂(1%), 100 mg; CuSO₄·5H₂O, 20 mg; FeSO₄·H₂O, 260 mg; ZnSO₄·H₂O, 150 mg; Na₂SeO₃(1%), 50 mg; microcrystalline cellulose, 5270 mg

1.2 实验鱼与饲养管理

花鲈鱼苗购自厦门农信渔联信息科技有限公司花鲈育苗场,在福建大北农海康养殖基地工厂化水泥池网箱中进行暂养,待实验鱼稳定后,以基础饲料驯化7 d。正式养殖实验前,鱼苗饥饿处理24 h,选取规格均一为(5.80±0.07) g、体格健康的花鲈600尾,随机分配到20个循环养殖缸内(400 L),每缸30尾鱼,每种饲料设4个重复,进行为期70 d的养殖实验。养殖期间水温为(29.5±1.5)℃,盐度为29±1,溶解氧≥6.5 mg/L。每天饱食投喂2次(08:00; 16:30),认真记录每个缸中花鲈的摄食和生长情况,并用虹吸管从缸底部收取粪便到过滤袋上,保存于-20℃冰箱用于测定饲料的表现消化率。

1.3 样品采集与分析

1.3.1 样品采集 养殖实验结束后,将鱼饥饿24 h后用丁香酚(1:10000)麻醉,进行称重和计数。每缸随机取9尾鱼,尾静脉取血后,采集前肠、中肠和后肠分别装入冻存管中,然后置于-80℃冰箱保存;每缸机取3尾鱼采集后肠放入提前装有波恩试剂的冻存管中,置于4℃冰箱保存,用于肠道组织学观察;每缸取3尾鱼用于花鲈体成分的分析。

1.3.2 饲料营养成分与全体组成的测定 原料、饲料、鱼体和粪便等常规成分测定均采用AOAC(1995)的方法进行。其中水分是在105℃烘箱中烘至恒重,粗蛋白测定采用杜马斯燃烧法定氮,测定仪器为全自动定氮仪(Elementar, rapid N Exceed)。粗脂肪测定采用索氏抽提法(溶剂为乙醚);粗灰分测定是在马弗炉中550℃灼烧12 h。饲料和粪便样品中矿物元素的测定是先用加酸微波消解(Jupiter-B, 多通量微波消解仪,上海新仪微波化学科技有限公司),后用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-OES, Prodigy 7, Leemae Labs, 美国)测定。

1.3.3 肠道消化酶活的测定 肠道消化酶活性检测,首先将采集的肠道样品解冻,用生理盐水匀浆后2500 r/min 4℃离心10 min,取上清液于-80℃冰箱中备用。其中淀粉酶(AMS)和脂肪酶(LPS)活力使用试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)测定,肠道蛋白酶活力采用福林-酚试剂法测定,肠道总蛋白采用考马斯亮蓝法测定(购自南京建成生物工程研究所)。所有样品的检测严格按照说明书的操作步骤规范完成。

1.3.4 肠道炎症因子基因表达 肠道总RNA提取用RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂,所有操作均严格按照说明书的操作步骤进行。用NanoDrop ND-2000分光光度计测定RNA浓度,琼脂糖凝胶电泳测定RNA完整性,然后用Thermo RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit对高质量的RNA进行cDNA合成,首先加入1 μg RNA, 1 μl Oligo(dT)₁₈,并加ddH₂O至12 μl,进行65℃反应5 min,然后向上述体系中加入5×Reaction Buffer (4 μl), Ribolock RNase Inhibitor (1 μl), 10 mmol/L dNTP Mix(2 μl), RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (1 μl)混匀,按照42℃ 60 min、25℃ 5 min、70℃ 5 min进行反应。

实时荧光定量PCR用于检测炎症因子mRNA水平。使用SYBR[®]Green Master Mix(AceQ[®]qPCR, 南京诺唯赞生物科技有限公司)试剂在Thermal cycler (ABI StepOne Plus[™])仪器上进行实时荧光定量PCR。反应体系如下: SYBR[®]Green Master Mix (10 μl), 上游引物(10 μmol/L, 0.5 μl), 下游引物(10 μmol/L, 0.5 μl), cDNA模板(9 μl)。反应条件如下: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共40个循环,所有反应均进行3个重复。选择β-actin作为内参基因,数据结果采用2^{-ΔΔC_t}法分析,引物序列见表3。

1.4 计算公式

实验结束后对每缸鱼逐一进行称重并计数,计算

表3 荧光定量引物序列
Tab. 3 Primers used for real-time PCR

基因名称 Genes	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	退火温度 T _m (℃)
β-actin	F:CAACTGGGATGACATGGAGAAG	R:TTGGCTTTGGGGTTCAGG	60
IL-1β	F:GTCAACTTACGTGCACCCTG	R:AAATCGTACCATGTCGCTGC	61
TNF-α	F:GATCGTCATCCCACAAACCG	R:GCTTTGCTGCCTATGGAGTC	61
IL-4	F:ACCATGCATTACTACAGCACTG	R:CACATTCAGGGGCGTTTGTGTC	61
IL-10	F:TTCAAACCTCCGTTTCGCTG	R:TCACTCTTGAGCTCGTCGAA	61

注: IL-1β: 白细胞介素-1β; TNF-α: 肿瘤坏死因子 α; IL-4: 白细胞介素-4; IL-10: 白细胞介素-10
Notes: IL-1β: Interleukin-1β; TNF-α: Tumor necrosis factor α; IL-4: Interleukin-4; IL-10: Interleukin-10

存活率(Survival rate, SR, %)、增重率(Weight gain rate, WGR, %)、特定生长率(Specific growth rate, SGR, %)、蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER)、饲料效率(Feed efficiency, FE)、摄食率(Feeding rate, FR, %/d)。公式如下:

$$SR=(N_t/N_0)\times 100;$$

$$WGR=100\times(W_t-W_0)/W_0;$$

$$SGR=(\ln W_t-\ln W_0)\times 100/t;$$

$$PER=(W_m-W_n)/M;$$

$$FE=(W_m-W_n)/W_g;$$

$$FR=100\times W_g/(W_m/2+W_n/2)/t;$$

式中, N_0 为实验初始花鲈尾数, N_t 为实验结束存活的花鲈尾数, M 为蛋白质摄入量(g), W_n 和 W_m 分别为花鲈初始总重和终末总重; W_0 和 W_t 分别为花鲈初始均重和终末均重(g); W_g 为实验中花鲈摄入饲料总重(g); t 为饲养天数(d)。

饲料营养成分表观消化率计算公式如下:

营养成分表观消化率(%)=[1-(饲料中 Y_2O_3 %×粪便中某营养成分%)/(粪便中 Y_2O_3 %×饲料中某营养成分%)]×100

1.5 数据处理

所有实验数据均采用 SPSS 22.0 统计软件进行

One-way ANOVA 分析, 用 Duncan's 法多重比较, 差异显著水平为 $P<0.05$ 。所有数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 实验结果

2.1 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长性能和饲料利用率的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长性能和饲料利用的影响见表 4。研究表明, 20%替代组花鲈WGR、SGR、SR和FR与 0 组(对照组)相比显著差异不显著($P>0.05$), 而FE和PER显著降低($P<0.05$); 随复合蛋白替代鱼粉比例继续升高, 花鲈WGR、SGR、FE和PER均显著降低($P<0.05$), 至 80%替代组为最低, 而FR显著增加($P<0.05$); SR则在替代比例至 60%时显著降低($P<0.05$)。

2.2 复合蛋白替代鱼粉对花鲈体组成的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈体组成的影响见表 4。研究表明, 花鲈全体粗蛋白含量随复合蛋白替代水平增加而降低, 至 80%替代组显著降低($P<0.05$)。而鱼体水分、粗脂肪和粗灰分含量各组均无显著差异($P>0.05$)。

表 4 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长性能和饲料利用率的影响
Tab. 4 Effects of substituting fishmeal with composite protein on growth performance and feed utilization of *L. maculatus*

组别 Groups(%)	初体重 IBW(g)	末体重 FBW(g)	增重率 WGR(%)	特定生长率 SGR(%/d)	饲料效率 FE	蛋白质效率 PER	存活率 SR(%)	摄食率 FR(%/d)
0	5.78±0.03	63.31±1.10 ^a	993.19±20.37 ^a	3.42±0.03 ^a	0.94±0.01 ^a	2.19±0.01 ^a	100.00±0.00 ^a	3.14±0.03 ^d
20	5.81±0.06	59.71±2.05 ^a	928.26±31.27 ^a	3.33±0.04 ^a	0.90±0.01 ^b	2.10±0.01 ^b	98.33±0.96 ^a	3.26±0.05 ^{cd}
40	5.80±0.07	51.86±1.26 ^b	791.87±16.27 ^b	3.13±0.03 ^b	0.87±0.01 ^c	2.02±0.01 ^c	95.00±2.15 ^a	3.37±0.06 ^{bc}
60	5.80±0.02	45.61±1.33 ^b	688.22±24.22 ^c	2.95±0.04 ^c	0.75±0.01 ^d	1.74±0.03 ^d	87.50±3.70 ^b	3.48±0.02 ^{ab}
80	5.82±0.05	32.25±2.25 ^b	453.77±36.76 ^d	2.44±0.09 ^d	0.73±0.01 ^d	1.70±0.02 ^d	86.67±3.04 ^b	3.60±0.05 ^a

注: 表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下表同

Note: The values in the same column with different upper small letter indicate significant difference ($P<0.05$), the same as the followings

表 5 复合蛋白替代鱼粉对花鲈体组成的影响(鲜重, %)
Tab. 5 Effects of substituting fishmeal with composite protein on body composition of *L. maculatus* (Fresh-matter, %)

组别 Groups(%)	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	粗灰分 Crude ash
0	69.11±0.29	17.33±0.21 ^a	8.63±0.30	4.93±0.10
20	69.23±0.21	17.26±0.04 ^a	8.74±0.11	4.90±0.12
40	69.91±0.46	17.25±0.18 ^a	7.81±0.56	4.93±0.17
60	70.06±0.24	16.99±0.10 ^{ab}	7.94±0.49	5.09±0.04
80	70.19±0.40	16.71±0.13 ^b	7.91±0.24	5.06±0.07

2.3 复合蛋白替代鱼粉对花鲈后肠组织结构的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈后肠组织结构的影响如图1。花鲈后肠组织学观察发现,各组肠道黏膜皱襞清晰,由肠腔向肠壁方向可清晰观察到黏膜层、黏膜下层、肌层以及浆膜层。其中,对照组和20%替代组花鲈后肠绒毛形态完整,整齐伸入肠腔内,无破损、脱落现象,杯状细胞正常;但是当替代比例至40%时,观察到肠道黏膜中杯状细胞开始增多;随替代比例继续升高,肠道黏膜皱襞弯曲伸入肠腔内,固有层变宽,

肠上皮细胞出现空泡。

2.4 复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道消化酶活性的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道消化酶活性的影响见表6。研究表明,花鲈肠道蛋白酶活性随复合蛋白替代鱼粉比例增加而逐渐降低,40%替代组开始显著降低($P<0.05$);而花鲈肠道淀粉酶和脂肪酶活性无显著差异($P>0.05$),但随复合蛋白替代鱼粉比例升高呈降低的趋势。

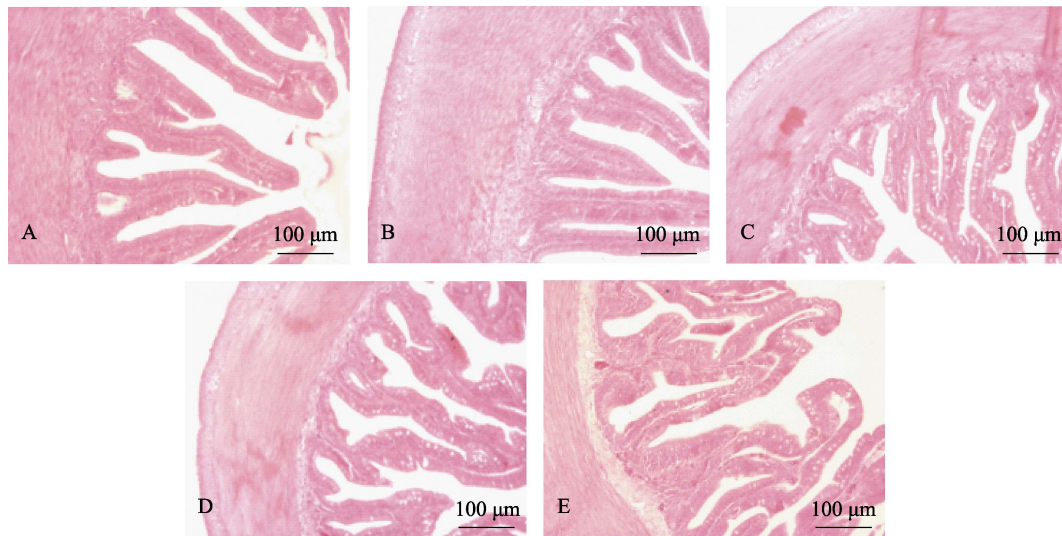


图1 复合蛋白替代鱼粉对花鲈后肠组织结构的影响($\times 200$)

Fig. 1 Effects of substituting fishmeal with composite protein on posterior intestine morphology of *L. maculatus* ($\times 200$)

A~E 分别代表对照组(0)、20%、40%、60%和80%替代组

Among A~E represents 0, 20%, 40%, 60% and 80% replacement proportion of fish meal with composite protein, respectively

表6 复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道消化酶活性的影响

Tab. 6 Effects of substituting fishmeal with composite protein on enzyme activities of intestine of *L. maculatus* (U/mg prot)

组别 Groups	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase	脂肪酶 Lipase
0	108.07 \pm 6.03 ^a	2.25 \pm 0.25	46.09 \pm 2.70
20%	87.88 \pm 12.87 ^a	2.36 \pm 0.17	41.74 \pm 5.85
40%	48.32 \pm 8.31 ^b	2.35 \pm 0.31	37.75 \pm 4.51
60%	32.18 \pm 5.93 ^b	2.23 \pm 0.21	37.39 \pm 2.07
80%	31.15 \pm 1.74 ^b	2.17 \pm 0.14	35.22 \pm 3.04

2.5 复合蛋白替代鱼粉对花鲈营养物质表观消化率的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈营养物质和能量表观消化率的影响见表7。研究表明,花鲈干物质、粗蛋白与粗脂肪表观消化率随复合蛋白替代鱼粉比例升

高而降低,但20%替代组与0组相比差异不显著,其中干物质与粗蛋白表观消化率在替代水平超过40%时出现显著降低($P<0.05$),而粗脂肪表观消化率则是在60%替代组出现显著性降低($P<0.05$)。

表7 复合蛋白替代鱼粉对花鲈营养物质表观消化率的影响

Tab. 7 Effects of substituting fishmeal with composite protein on apparent digestibility coefficients of the nutrients of *L. maculatus* (%)

组别 Groups	干物质 Dry matter	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid
0	70.63 \pm 1.52 ^a	88.53 \pm 1.58 ^a	94.75 \pm 0.63 ^a
20%	67.95 \pm 1.81 ^{ab}	85.45 \pm 2.21 ^{ab}	92.76 \pm 1.25 ^a
40%	64.43 \pm 0.16 ^{bc}	83.53 \pm 0.83 ^b	93.82 \pm 0.85 ^a
60%	60.58 \pm 0.84 ^c	79.01 \pm 0.91 ^c	87.49 \pm 1.18 ^b
80%	61.94 \pm 1.35 ^c	78.56 \pm 0.41 ^c	84.93 \pm 1.57 ^b

2.6 复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道促炎因子和抗炎因子基因表达量的影响

复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道促炎因子IL-1 β , TNF- α 基因表达量的影响见图2。研究表明,前肠IL-1 β 和TNF- α 基因表达量仅在80%替代组显著升高($P < 0.05$),其他替代组与0组差异不显著($P > 0.05$)。中肠IL-1 β 基因表达量各组差异不显著,而TNF- α 基因表达量随替代比例增加而升高,在60%和80%替代组显著升高($P < 0.05$)。后肠IL-1 β 基因表达量在20%替代组与0组差异不显著,但当替代比例超过40%时,IL-1 β 基因表达量显著升高($P < 0.05$);后肠中TNF- α 基因表达量在80%替代组显著高于0组($P < 0.05$),其他替代组与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

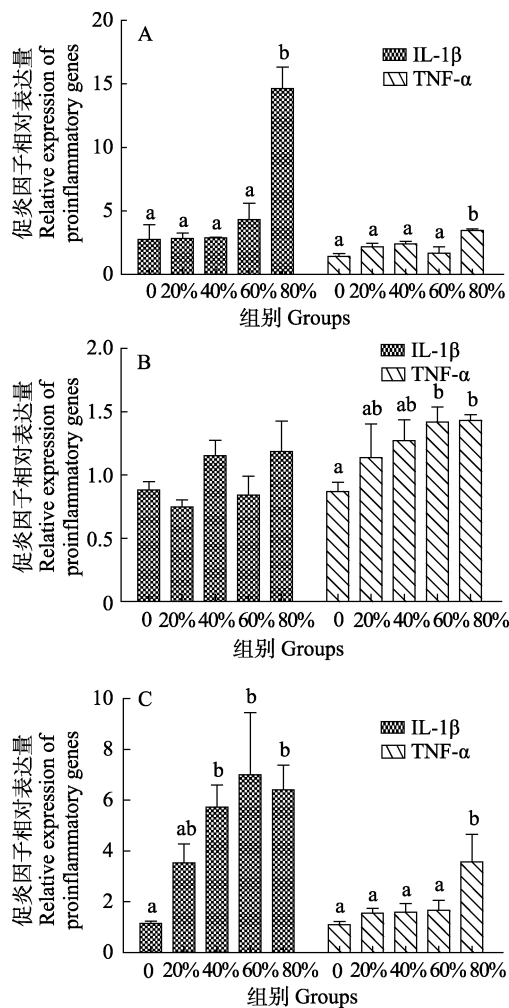


图 2 复合蛋白替代鱼粉对花鲈前肠(A)、中肠(B)和后肠(C)促炎因子 IL-1 β , TNF- α 基因表达量的影响
Fig. 2 Effects of substituting fishmeal with composite protein on relative expression of IL-1 β , TNF- α in the *L. maculatus* proximal intestine (A), midintestine (B) and posterior intestine (C)

复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道抗炎因子IL-4, IL-10基因表达量的影响见图3。研究表明,前肠IL-4基因相对表达量各替代组与对照组(0组)相比差异均不显著($P > 0.05$),但前肠中各替代组IL-10基因的表达量均显著高于对照组($P < 0.05$),其中80%替代组最高。中肠IL-4和IL-10基因表达量随替代比例升高呈先升高后降低趋势,IL-4在20%替代组达到最高后至80%组最低,IL-10基因表达量在替代比例超过40%后显著降低($P < 0.05$),但各替代组与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。后肠各组间IL-4基因表达量不受复合蛋白替代鱼粉比例影响,各组间无显著差异($P > 0.05$);而

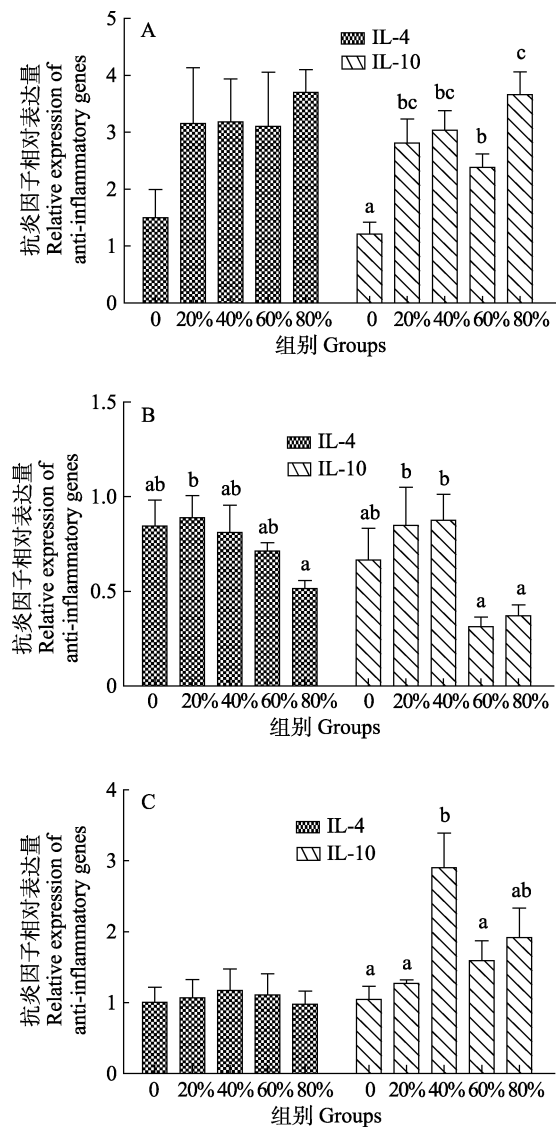


图 3 复合蛋白替代鱼粉对花鲈前肠(A)、中肠(B)和后肠(C)抗炎因子 IL-4, IL-10 基因表达量的影响
Fig. 3 Effects of substituting fishmeal with composite protein on relative expression of IL-4, IL-10 in the *L. maculatus* proximal intestine (A), midintestine (B) and posterior intestine (C)

IL-10基因相对表达量则是40%替代组显著高于其他各组, 其他各组间无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长性能和饲料利用的影响

本研究中, 复合蛋白替代20%鱼粉时, 对花鲈的生长和SR无显著影响, 但当替代比例至40%时, 显著降低花鲈的生长性能; 当替代比例达至60%时, SR也显著降低。本研究中使用的复合蛋白主要成分为蝇蛆粉, 而蝇蛆粉替代饲料鱼粉已有相关研究, 孟素宣等(2016)发现, 在锦鲤中替代比例达60%而不影响锦鲤的生长性能; Ezewudo等(2015)发现, 在吉富罗非鱼(GIFT strain Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)中可替代50%鱼粉; 在鱼粉供应日益紧张的形势下, 蝇蛆粉替代鱼粉的研究具有较大的开发潜力。但不同养殖品种替代水平有差异, 可能与不同鱼类对饲料中营养物质的消化吸收能力不同, 所使用的蝇蛆粉的加工工艺以及营养水平有关。而花鲈为海水肉食性鱼类, 肠道较短, 对蝇蛆粉的消化可能较锦鲤、罗非鱼弱。其次, 本研究使用的复合蛋白, 各种必需氨基酸含量低于鱼粉, 随替代比例升高导致饲料氨基酸缺乏(窦秀丽, 2014; 李燕, 2010), 不能满足花鲈的生长营养需求, 从而影响其生长性能。另有研究表明, 蝇蛆幼虫体内存在难以被水产动物消化利用的甲壳素(Ogunji *et al.*, 2008), 会对饲料利用产生一定影响, 在用蝇蛆粉替代鱼粉后, 会显著降低FE和PER, 导致花鲈摄入的营养成分减少。文远红等(2013)发现, 在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)中当蝇蛆粉添加比例大于8.94%时, WGR和FE显著下降; 而在非洲鲶鱼(*Silurus asotus*) (Fasakin *et al.*, 2015)、杂交鲶(*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) (Sogbesan *et al.*, 2005)和黄鳝(*Monopterus albus*) (杨帆, 2011)中均有类似的报道出现。因此, 解决蝇蛆粉的饲料利用问题, 是提高替代水平的一个重要研究方向。

本研究发现, 复合蛋白替代鱼粉显著影响花鲈的体成分, 当复合蛋白替代鱼粉比例为80%时, 全体粗蛋白含量显著降低, 表明高比例复合蛋白替代鱼粉会降低花鲈蛋白质沉积, 可能是由于高比例复合蛋白替代鱼粉后, 饲料中氨基酸比例不均衡, 鱼类无法利用摄食到的饲料进行蛋白质的合成(梅琳等, 2015), 从而影响全体蛋白的沉积。Wang等(2017)在尼罗罗非鱼中发现, 用蝇蛆粉替代鱼粉后, 对尼罗罗非鱼体成分无显著影响; 刘黎等(2014)在青鱼中发现, 随替代鱼

粉比例升高, 鱼体水分、粗脂肪和粗灰分含量不受影响, 但粗蛋白含量逐渐升高。出现这些差异的原因可能是不同鱼类对饲料中营养成分的需求不同引起的鱼体营养物质沉积的差异。

3.2 复合蛋白替代鱼粉对花鲈消化的影响

本研究表明, 复合蛋白替代20%鱼粉不影响饲料中干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率, 但随复合蛋白替代鱼粉比例升高, 干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率均显著降低。本实验结果与Kroeckel等(2012)在大菱鲆中用黑水虻替代鱼粉的研究结果一致, 而在尼罗罗非鱼发现(Wang *et al.*, 2017), 蝇蛆粉替代鱼粉后, 饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率虽不受替代比例影响, 但随替代比例升高有降低的趋势。可能是由于昆虫蛋白中含有甲壳素, 而鱼类肠道中缺乏分解甲壳素的酶和微生物(Kroeckel *et al.*, 2012), 从而影响饲料中营养物质的消化吸收; 而且甲壳素在昆虫中一般是与蛋白结合以蛋白聚糖的形式存在, 这种存在形式也阻碍肠道对营养物质的消化吸收(Ogunji *et al.*, 2008)。其次, 肠道消化酶结果表明, 肠道蛋白酶活性随复合蛋白替代鱼粉比例升高而降低, 但20%替代组无显著影响, 但当替代水平超过40%时, 蛋白酶活性显著降低; 而脂肪酶和淀粉酶活性虽不受饲料中复合蛋白替代鱼粉比例的影响, 但随复合蛋白替代鱼粉比例升高呈降低的趋势。同样, 在黄鳝(杨帆, 2011)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (曹俊明等, 2012)和彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *Pengze*) (郭玉阳等, 2012)的研究中发现, 当饲料中添加高水平蝇蛆蛋白会显著降低肝胰脏消化酶活性。因此, 蝇蛆粉对消化能力的影响可能也是限制其在水产饲料中应用的一大因素。综上, 复合蛋白替代20%鱼粉不会对花鲈的消化能力产生显著影响, 但高比例替代鱼粉会严重影响其消化能力, 这可能也是蛋白沉积减少的一个重要原因。

3.3 复合蛋白替代鱼粉对花鲈肠道健康的影响

鱼类肠道是鱼体赖以吸收与利用营养物质的重要场所, 肠道结构的健康完整与其能否正常行使生理功能密切相关, 而在鱼粉替代的研究中对肠道健康的影响是评价其替代水平的一项重要指标。相关研究发现, 大西洋鲑(*Salmo salar*)后肠组织形态可以直观地反映出由植物蛋白引起的肠道炎性特征(Krogdahl *et al.*, 2015; van den Ingh *et al.*, 1991); 同样, 豆粕替代鱼粉后引起花鲈肠道绒毛长度与宽度、肌层厚度降低, 隐窝深度增加(王亚如, 2017)。本研究肠道组织

学观察发现, 随复合蛋白替代鱼粉比例升高, 实验组花鲈后肠黏膜杯状细胞逐渐增多。当替代比例超过60%时, 黏膜皱襞固有层变宽, 皱襞上皮细胞出现空泡, 绒毛长度增加, 杯状细胞显著增多。这些结果表明, 复合蛋白高比例替代鱼粉引起花鲈肠道组织结构损伤, 且随替代比例升高其受损程度加重, 这可能与复合蛋白中含有一定比例的豆粕有关。而在蝇蛆粉替代鱼粉的研究中发现, 在黄颡鱼中, 低比例蝇蛆粉替代鱼粉对黄颡鱼肠道影响不显著, 仅在100%替代组发现黄颡鱼前肠绒毛出现损伤, 皱襞固有层变宽, 部分微绒毛脱落(文远红等, 2015)。而肠道组织结构出现损伤的原因推测是替代鱼粉后引发了肠道炎症反应。因此, 本研究对引起肠道炎症反应的分子机制进行了进一步的探讨。

肠道炎症因子是用来评价肠道炎症反应的重要指标, 研究发现, 促炎因子与抗炎因子的失衡是肠道黏膜损伤的重要因素之一(Pichai *et al*, 2012)。而肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)在鱼类炎症研究中受到广泛关注, 常作为研究炎症反应的指标之一。本研究表明, 复合蛋白替代饲料中鱼粉引起花鲈肠道炎症因子TNF- α 、IL-1 β 基因表达上调, 而TNF- α 和IL-1 β 基因表达上调具有促炎性反应; 而IL-4和IL-10作为抗炎性细胞因子通过调控白介素类因子的方式促进相关免疫反应(Rogy *et al*, 2000), 本研究中复合蛋白替代鱼粉引起抗炎因子IL-4和IL-10基因表达下调。相关报道指出, 在肠道发生炎症病变时, 往往伴随着促炎因子如TNF- α 和IL-1 β 等基因的表达量升高以及IL-4、IL-10表达量的降低(王少鑫等, 2015; 岳文杰等, 2012; 姬培震等, 2015; Szkaradkiewicz *et al*, 2009; 万国仕等, 2011)。因此, 本研究中复合蛋白高比例替代鱼粉引发了肠道炎症反应, 可能是由于复合蛋白替代鱼粉后使肠道内促炎因子与抗炎因子失衡, 肠道生态平衡被打破, 从而引发肠道炎症反应。这也是高比例替代鱼粉造成肠道组织结构损伤的一大重要原因。

4 结论

复合蛋白替代20%鱼粉不会对花鲈的生长性能产生负面影响, 但随着替代比例的升高, 影响花鲈生长, 降低花鲈肠道对营养物质的消化能力, 引发肠道促炎因子与抗炎因子失衡, 导致炎症反应, 影响肠道健康。综合以上结论, 建议复合蛋白替代花鲈饲料鱼粉比例不宜超过20%。

参 考 文 献

- Abowei JFN, Ekubo AT. A review of conventional and unconventional feeds in fish nutrition. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2011, 2(4): 179-191
- Cao JM, Yan J, Huang YH, *et al*. Effects of replacement of fish meal with housefly maggot meal on growth performance, antioxidant and non-specific immune indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 529-537 [曹俊明, 严晶, 黄燕华, 等. 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾生长、抗氧化和免疫指标的影响. *水产学报*, 2012, 36(4): 529-537]
- Dou XL. The study on the optimum requirement of dietary valine, histidine and threonine of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) in the middle and late growing stage. Master's Thesis of Dalian Ocean University of China, 2014, 1-69 [窦秀丽. 鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)生长中后期缬氨酸、组氨酸和苏氨酸营养需求的研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 1-69]
- Ezewudo BI, Monebi CO, Ugwumba AAA. Production and utilization of *Musca domestica* maggots in the diet of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fingerlings. *African Journal of Agricultural Research*, 2015, 10(23): 2363-2371
- Fasakin EA, Balogun AM, Ajayi OO. Evaluation of full-fat and defatted maggot meals in the feeding of clariid catfish *Clarias gariepinus* fingerlings. *Aquaculture Research*, 2015, 34(9): 733-738
- Guo YY, Luo L, Chen RX, *et al*. The effects of replacing fish meal with different proportions of fermented maggot protein in diet on growth performance and liver function of Pengze crucian carp. *China Feed*, 2012(21): 26-29 [郭玉阳, 罗莉, 陈任孝, 等. 蝇蛆复合发酵蛋白替代鱼粉对彭泽鲫的生长性能和肝脏功能的影响. *中国饲料*, 2012(21): 26-29]
- Ji PZ, Zhang Y, Li XP, *et al*. Effect of Fuzi Lizhong Tang on expression of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β of spleen and kidney Yang deficiency type ulcerative colitis rats through enema. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2015(14): 124-128 [姬培震, 张怡, 李雪萍, 等. 附子理中汤灌肠对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 表达的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2015(14): 124-128]
- Kroeckel S, Harjes AGE, Roth I, *et al*. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute—Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 2012, 364-365: 345-352
- Krogdahl Å, Gajardo K, Kortner TM, *et al*. Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(15): 3887-3902
- Li Y. Optimal requirements of branch chain amino acids and histidine in diets of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* and large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* R. Doctoral

- Dissertation of Ocean University of China, 2010 [李燕. 鲈鱼和大黄鱼支链氨基酸与组氨酸营养生理的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- Lin YH, Mui JJ. Evaluation of dietary inclusion of housefly maggot (*Musca domestica*) meal on growth, fillet composition and physiological responses for barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2478–2485
- Liu L, Ye JY, Wu CL, *et al.* Effects of maggot meal on growth performance, body composition and digestive enzymes activities of black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 43–50 [刘黎, 叶金云, 吴成龙, 等. 饲料中蝇蛆粉用量对青鱼生长、体成分和消化酶活力的影响. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 43–50]
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92]
- Men KK, Ai QH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary corn gluten meal on growth, digestion and protein metabolism in relation to IGF-I gene expression of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 2014, 428–429: 303–309
- Meng SX, Shi DJ, Qin J, *et al.* Effects of fish meal replacement by maggot meal on growth performance, body composition, body color and non-specific immunity of *Cyprinus carpio* L. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(8): 2066–2070 [孟素宣, 史东杰, 秦佳, 等. 蝇蛆粉替代鱼粉对锦鲤生长、体组成、体色和非特异性免疫的影响. 湖北农业科学, 2016, 55(8): 2066–2070]
- Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. China fisheries statistical yearbook 2018. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [农业部渔业渔政管理局. 2018中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- Ogunji JO, Kloas W, Wirth M, *et al.* Housefly maggot meal (maggot meal) as a protein source for *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Asian Fisheries Science*, 2008, 21(3–4): 319–331
- Pichai MVA, Ferguson LR. Potential prospects of nanomedicine for targeted therapeutics in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(23): 2895–2901
- Rogy MA, Beinbauer BG, Reinisch W, *et al.* Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. *Human Gene Therapy*, 2000, 11(12): 1731–1741
- Sogbesan AO, Ajuonu ND, Madu CT, *et al.* Growth response, feed conversion rate and cost benefits of hybrid catfish fed maggot meal based diets in outdoor tanks. *Fison Conference Proceedings*, 2005, 896: 231–237
- Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugała I, *et al.* Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2009, 57(4): 291–294
- van den Ingh TSGAM, Krogdahl Å, Olli JJ, *et al.* Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A morphological study. *Aquaculture*, 1991, 94(4): 297–305
- van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58(1): 563–583
- Wan GS, Zhao ZZ, Qian YL, *et al.* Changes in serum levels of SOCS-3, IL-6 and TNF- α and their correlation in patients with ulcerative colitis. *World Chinese Journal of Digestology*, 2011, 19(32): 3370–3373 [万国仕, 赵振中, 钱一龙, 等. 血清 SOCS-3、IL-6、TNF- α 在溃疡性结肠炎患者中的变化及其相互关系. 世界华人消化杂志, 2011, 19(32): 3370–3373]
- Wang L, Li J, Jin JN, *et al.* A comprehensive evaluation of replacing fishmeal with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Growth performance, flesh quality, innate immunity and water environment. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(5): 983–993
- Wang SX, Pu J, Liu CQ, *et al.* Expression and clinical significance of cytokine TNF- α , IL-6 and IL-4 in ulcerative colitis. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2015, 24(1): 104–106 [王少鑫, 浦江, 刘超群, 等. 炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-4 在溃疡性结肠炎中的表达及临床意义. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(1): 104–106]
- Wang YR. Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). Master's Thesis of Jimei University, 2017, 1–68 [王亚如. 豆粕替代鱼粉对花鲈生长性能和肠道健康的影响. 集美大学硕士研究生学位论文, 2017, 1–68]
- Wen YH, Cao JM, Huang YH, *et al.* Effects of fish meal replacement by maggot meal on growth performance, body composition and plasma biochemical indexes of juvenile yellow catfish (*Peltobagrus fulvidraco*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(1): 171–181 [文远红, 曹俊明, 黄燕华, 等. 蝇蛆粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、体组成和血浆生化指标的影响. 动物营养学报, 2013, 25(1): 171–181]
- Wen YH, Huang YH, Wang HX, *et al.* Effect of replacement of fish meal with maggot meal on antioxidant indexes, digestive enzyme activities, foregut and hepatopancreas histological structure of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Feed Industry*, 2015, 36(4): 29–35 [文远红, 黄燕华, 王国霞, 等.

- 蝇蛆粉替代鱼粉对黄颡鱼抗氧化指标、消化酶活性及前肠、肝胰脏组织结构的影响. 饲料工业, 2015, 36(4): 29–35]
- Wu ZL. Application of fishmeal in feed. China Feed, 1995(1): 23–24 [吴子林. 鱼粉在饲料中的作用. 中国饲料, 1995(1): 23–24]
- Yang F. Research of replacing fish meal with maggot meal in feed for *Monopterus albus*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 [杨帆. 蝇蛆在黄颡饲料中替代鱼粉的应用研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2011]
- Yue WJ, Liu Y, Xu W, *et al.* The expression of IL-2, IL-4, IL-17 and IL-10 in ulcerative colitis (UC) mucosa and its relation with disease activity. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2012, 39(5): 454–459 [岳文杰, 刘懿, 徐薇, 等. 溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜中 IL-2、IL-4、IL-17 和 IL-10 的表达特点及其与疾病活动度的关系. 复旦学报(医学版), 2012, 39(5): 454–459]

(编辑 陈辉)

Effects of Replacing Fish Meal with Composite Protein on Growth, Diet Digestibility, and Gut Health in Japanese Seabass (*Lateolabrax maculatus*)

HU Pengli, WU Rui, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao^①

(Xiamen Key Laboratory of Feed Testing and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract This study was conducted to evaluate the effects of replacing fish meal with composite protein on growth performance, diet digestibility, and gut health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). Five isonitrogenous and isolipidic diets were formulated by replacing 0, 20%, 40%, 60%, or 80% of fish meal in the basic diet with composite protein. Quadruplicate groups of 30 fish [initial body weight (5.80±0.07) g] were fed the test diets to apparent satiation twice daily (08:00 and 16:30), and the experiment continued for 70 days. During the feeding trial, water temperature, salinity, and dissolved oxygen values were maintained at (29.5±1.5)°C, 29±1, and ≥6.5 mg/L, respectively. Samples were collected for analysis after the feeding trial. The main indexes including the growth performance, diet digestibility, intestinal digestive enzymes activities, posterior intestine morphology structure, and expression of inflammation-related genes of the proximal intestine, mid-intestine, and posterior intestine were analyzed to investigate the appropriate replacement proportion of fish meal by composite protein. The results showed that substituting 20% of fish meal with composite protein did not significantly affect growth performance compared to that of the control group ($P>0.05$), while further increment of fish meal replacement levels resulted in significant reduction of weight gain, survival rate, feed efficiency, and protein efficiency ratio ($P<0.05$). Moreover, as the replacement level of fish meal with composite protein exceeded 20%, intestinal protease activity and apparent digestibility coefficients of feed dry matter, crude protein, and crude lipid also significantly decreased with increasing level of fish meal replacement by composite protein ($P<0.05$). Meanwhile, increasing replacement of fish meal with composite protein damaged posterior intestine morphology structure and up-regulated expression of gut inflammatory genes such as TNF- α and IL-1 β , while an opposite trend was observed for the expression of anti-inflammatory genes, IL-4 and IL-10. In conclusion, it was recommended that the replacement proportion of fish meal with composite protein should not exceed 20%.

Key words Composite protein; Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*); Growth performance; Digestibility; Gut morphology structure; Inflammatory genes

① Corresponding author: ZHANG Chunxiao, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180821001

http://www.yykxjz.cn/

王雅平, 李宝山, 王际英, 王成强, 王晓艳, 王丽丽, 王世信, 孙永智, 郝甜甜. 大菱鲆幼鱼对饲料中泛酸最适需求量的研究. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 66-75

Wang YP, Li BS, Wang JY, Wang CQ, Wang XY, Wang LL, Wang SX, Sun YZ, Hao TT. Study on the optimum dietary pantothenic requirement of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 66-75

大菱鲆幼鱼对饲料中泛酸最适需求量的研究*

王雅平^{1,2} 李宝山² 王际英^{2①} 王成强² 王晓艳²
王丽丽^{1,2} 王世信² 孙永智² 郝甜甜²



1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306;
2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 为研究大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼对泛酸的最适需求量,在基础配方中添加不同梯度的泛酸钙,制成 6 组泛酸含量分别为 6.24、10.64、15.02、23.81、41.40 和 76.57 mg/kg 等氮等能实验饲料,投喂初始体重为(24.73±0.10) g 的大菱鲆幼鱼 80 d。结果显示:1)泛酸对幼鱼成活率(SR)无显著影响($P>0.05$), 10.64~76.57 mg/kg 饲料组增重率(WGR)和特定生长率(SGR)显著提高($P<0.05$); 泛酸含量超过 23.81 mg/kg 时,肝体比(HSI)显著降低($P<0.05$); 2)随着饲料中泛酸含量的提高,全鱼粗蛋白、粗脂肪和肌肉粗蛋白均呈先升后降趋势,肝脏脂肪含量显著下降($P<0.05$); 3)肠道消化酶、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 和肝脏胆碱酯酶(ChE)活力随泛酸添加量的增加呈先上升后下降趋势, 10.64~76.57 mg/kg 饲料组肠道肌酸激酶(CK)活力显著提高($P<0.05$); 4)血清、肝脏中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活力均呈先升后降趋势; 6.24 mg/kg 饲料组血清丙二醛(MDA)含量显著高于其他 5 组($P<0.05$); 5)随泛酸含量的增加,肝脏脂肪合成酶(FAS)基因表达量先升后降,脂蛋白酯酶(LPL)基因表达量显著上升($P<0.05$)。研究表明,饲料中添加适宜的泛酸能显著增强大菱鲆幼鱼肠道消化、吸收能力和机体抗氧化能力,并可提高脂肪代谢相关基因的表达水平,从而提高其生长性能。以增重率为判据,经折线模型拟合得出,初体重为 24.73 g 的大菱鲆幼鱼对泛酸的需求量为 16.08 mg/kg 饲料。

关键词 大菱鲆; 泛酸; 生长性能; 需求

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0066-10

泛酸(Pantothenic acid)又称维生素 B₅,是生物体必需的一种水溶性维生素(杨延辉等, 2008)。泛酸在生物体内主要以辅酶 A(CoA)和酰基载体蛋白(Acyl carrierprotein, ACP) 2 种活性形式存在,其主要代谢功能包括脂肪酸、胆固醇和类固醇的合成,参与能量

代谢,合成抗体和乙酰化胆碱(Jobling, 2012; Zhu *et al*, 2004); 泛酸还具有抗脂质过氧化作用,当泛酸不足时,过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化受到抑制,从而增加机体氧化损伤(Chen *et al*, 2015); 除此之外,泛酸不足还会引起鱼体生长迟缓、厌食、棒状鳃、鳍条出血

* 山东省重点研发计划(2016GSF115005)和烟台市科技计划(2018ZHGY066)共同资助 [This work was supported by Shandong Key Research and Development Plan (2016GSF115005), and Science and Technology Development Project of Yantai (2018ZHGY066)]. 王雅平, E-mail: m15552437686@163.com

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

收稿日期: 2018-08-21, 收修改稿日期: 2018-09-21

等器官病变, 严重缺乏时还会导致鱼体死亡(Jobling, 2012)。目前, 国内外对鱼类泛酸需求的研究较多, 如黑带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*) (Lin *et al*, 2012) 的泛酸需求量为 11.0 mg/kg, 宝石鲈(*Scortum barcoo*) (宋理平, 2009) 为 12.40 mg/kg, 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* R) (张春晓, 2006) 为 11.20 mg/kg, 真鲷(*Pagrosomus major*) (Yano *et al*, 1988) 为 10 mg/kg, 杂交条纹狼鲈(*Moronechrysops* × *M. saxatilis*) (Raggi *et al*, 2016) 为 18.8 mg/kg。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) 属鲽形目(Pleuronectiformes), 鲆科(Bothidae), 菱鲆属, 俗称“多宝鱼”, 是名贵的低温经济鱼类。自 20 世纪 90 年代引种到我国以来, 已经在我国北方沿海地区大规模养殖(彭墨等, 2014; 陈慕雁等, 2005)。目前, 关于大菱鲆维生素的研究主要集中在脂溶性维生素(牛化欣等, 2014), 而在水溶性维生素方面研究较少(谢全森等, 2008)。泛酸是生物体必需的营养素, 但在大菱鲆中尚未见对泛酸需求量的相关报道。因此, 本研究以大菱鲆为研究对象, 通过研究饲料中添加不同梯度的泛酸对其生长、体组成、饲料利用、抗氧化性能、脂肪代谢的影响, 确定大菱鲆对饲料泛酸的最适需求量, 为泛酸在大菱鲆的饲料研究与应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验设计与饲料制作

以鱼粉、酪蛋白为主要蛋白源, 鱼油为主要脂肪源, 补充矿物质和维生素预混料(不含泛酸), 配制成 6 组等氮等能的基础饲料(表 1)。每千克基础饲料中分别添加 0、5、10、20、40 和 80 mg 的 D-泛酸钙(购自盛瑞源生物科技公司, 纯度>96%), 命名为 P1、P2、P3、P4、P5、P6 组, P1 为对照组。按实验配方将所需原料粉碎过 80 目筛, 按比例称重混匀, 加入鱼油及适量水再次混匀, 经螺旋挤压机加工成粒径为 3 mm 的饲料颗粒, 60℃烘干后放置-20℃冰箱备用。利用高效液相层析色谱(HPLC)测得实验饲料中泛酸的含量分别为 6.24、10.64、15.02、23.81、41.40 和 76.57 mg/kg。

1.2 实验用鱼和饲养管理

实验所用大菱鲆幼鱼购自蓬莱宗哲养殖有限公司。养殖实验于 2017 年 11 月 11 日~2018 年 2 月 4 日在山东省海洋资源与环境研究院室内循环水养殖系统进行。正式实验前挑选体质健壮的大菱鲆幼鱼暂养于圆形养殖桶(桶高 80 cm, 直径 70 cm, 水深 50 cm)

表 1 实验饲料基础配方及营养成分(干物质%)
Tab.1 Formulation and nutrient composition of the basal experimental diets (dry matter %)

原料 Ingredient	含量 Content
鱼粉 Fish meal	45.00
酪蛋白 Casein	16.00
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	8.00
α -淀粉 α -starch	12.00
鱼油 Fish oil	7.00
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.00
矿物质预混料 Mineral premix ^a	2.00
维生素预混料 Vitamin premix ^b	1.00
甜菜碱 Betaine	1.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.50
抗氧化物 Antioxidant	0.10
羧甲基纤维素钠 CMC	5.90
总计 Total	100.00
基本营养组成 Proximate composition (%)	
粗蛋白 Crude protein	51.17
粗脂肪 Crude lipid	11.12
粗灰分 Crude ash	13.06
能量 Energy (kJ/g)	26.14

注: a. 矿物质预混料配方参考王际英等(2014)。b. 维生素预混料(mg/kg 饲料): 硫胺素, 15 mg; 核黄素, 15 mg; 烟酸, 100 mg; 吡哆醇, 20 mg; 氰钴胺, 4 mg; 生物素, 1 mg; 肌醇, 200 mg; 叶酸, 5 mg; 氯化胆碱, 1000 mg; 抗坏血酸, 240 mg; 维生素 A, 20 mg; 维生素 D, 8 mg; 维生素 E, 150 mg; 维生素 K, 10 mg

Note: a. Same contents of mineral premix as reference Wang *et al* (2014). b. Vitamin mixture (mg/kg diet): Thiamin, 15 mg; Riboflavin, 15 mg; Niacin acid, 100 mg; Pyridoxine, 20 mg; Cyanocobalamin, 4 mg; Biotin, 1 mg; Inositol, 200 mg; Folic acid, 5 mg; Choline chloride, 1000 mg; Ascorbic acid, 240 mg; Retinol acetate, 20 mg; Cholecalciferol, 8 mg; Alpha-tocopherol, 150 mg; Vitamin K, 10 mg

中, 投喂 P1 组饲料驯化, 14 d 后挑选规格均匀的大菱鲆幼鱼[(24.73±0.10) g] 540 尾, 随机分配至 18 个养殖桶中, 每桶 30 尾鱼, 每种实验饲料随机投喂 3 个养殖桶的实验鱼。养殖实验进行 80 d, 每天投喂 2 次(08:00, 16:00), 初始日投喂量占体重的 1.5%左右, 并根据摄食情况及时调整投喂量。投喂 30 min 后排残饵, 数颗粒, 记录残饵数量。养殖期间, 确保水质

符合以下条件:水温(17.0±0.5)℃,盐度 28~32, pH 7.6~8.2, 溶氧>7.0 mg/L, 氨氮浓度和亚硝酸<0.1 mg/L。

1.3 样品采集

全鱼、背肌、肝脏、肠道及血清取样方法参考梅琳等(2015)。

同时,每桶中随机取 3 尾实验鱼,无菌条件下解剖,取肝尖置于 2 ml 无 RNase 离心管中并迅速于液氮中速冻, -80℃超低温冰箱中保存,用于组织中相关基因的荧光定量分析。

1.4 测定指标与分析方法

1.4.1 生长指标计算

增重率(Weight gain rate WGR, %)=(鱼体末重-鱼体初重)/鱼体初重×100;

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(ln 鱼体末重-ln 鱼体初重)/养殖周期×100;

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=摄食量/体增重×100;

摄食率 (Feed intake, FI, %/d)=摄食量/[(鱼体初重量+鱼体末重量)/2×养殖周期]×100

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER)=(鱼体末重-鱼体初重)/蛋白质总摄入量;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI)=内脏团湿重/鱼体末重×100;

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %)=肝脏湿重/鱼体末重×100;

肥满度(Condition factor, CF)=鱼体末重/体长³×100;

存活率(Survival rate, SR, %)=终末鱼尾数/初始鱼尾数×100。

1.4.2 体成分测定 实验饲料及体壁中水分用 105℃恒重法测定(GB/T6435-2006),粗蛋白用凯氏定氮法测定(GB/T6432-2006),粗脂肪用索氏抽提法测定(GB/T6433-2006),粗灰分用 550℃失重法测定(GB/T 6438-2007),能量用燃烧法测定(IKA, C6000, 德国)。

1.4.3 酶活测定 肠道淀粉酶(Amylase)、脂肪酶(Lipase)、胰蛋白酶(Trypsin)、Na⁺,K⁺-ATPase、肌酸

激酶(Creatine Kinase, CK)活性、肝脏中胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE),血清和肝脏中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活力及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。酶活力单位参照试剂盒说明书。

1.4.4 肝脏脂代谢相关基因差异表达分析 按照 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取肝脏总 RNA,通过电泳检测 RNA 的完整性,然后检测其纯度。最后,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒合成 cDNA,并置于 -20℃待用。

使用 Primer 5.0 设计引物,同时设计 β -actin 引物作为内参,所有引物均由生工生物技术(上海)股份有限公司合成,引物序列参见表 2。使用 TaKaRa 公司生产的 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行荧光定量 PCR,具体步骤参见说明书。PCR 程序为:95℃、30 s, 1 个循环;95℃、5 s, 57℃、30 s, 72℃、60 s 共 40 个循环;95℃熔解曲线检测反应特异性。在本实验中,FAS、LPL、 β -actin 的扩增效率分别是 0.986、0.980、0.991。每个复孔设置参照基因 β -actin,根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 算法进行相对定量后,分析肝脏中 FAS 和 LPL 的相对表达量。

1.5 数据统计分析

采用 SPSS18.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),差异显著($P<0.05$)时用 Duncan's 检验进行多重比较分析。统计数据以平均值±标准差(Mean±SD, $n=3$)的形式表示。采用折线模型拟合得出大菱鲂幼鱼对饲料中泛酸基于增重率的最适需求量。

2 结果

2.1 饲料泛酸含量对大菱鲂幼鱼生长性能、饲料利用及形体指标的影响

由表 3 可见,添加泛酸对大菱鲂幼鱼的存活率(SR)无显著影响($P>0.05$),均在 98%以上。随饲料泛酸含量的增加,大菱鲂幼鱼的增重率(WGR)和特定生长率(SGR)均呈先上升后下降趋势,P3、P4 组显著高于其

表 2 定量 PCR 引物序列

Tab.2 Nucleotide sequences of the primers used to assay gene expression by real-time PCR

基因名称 Gene name	正义链序列 Forward (5'~3')	反义链序列 Reverse (5'~3')
脂肪酸合成酶(FAS)	GGCAACAACACGGATGGATAC	CTCGCTTTGATTGACAGAACAC
脂蛋白酯酶(LPL)	GCGGACCTTGTTGATGTT	CTCCACGAACGCTCTAT
β -actin	AGAGGCATACAGGACAGCAC	TGAACCCCAAAGCCAACAGG

表 3 饲料泛酸含量对大菱鲂幼鱼生长性能、饲料利用及形体指标的影响
Tab.3 Effects of dietary pantothenic acid on growth performance, feed utilization and body indices of juvenile *S. maximus*

项目 Items	组别 Groups					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
初始体重 IBW (g)	24.67±0.03	24.75±0.08	24.74±0.04	24.68±0.07	24.73±0.01	24.73±0.03
终末体重 FBW (g)	83.37±0.57 ^a	86.94±0.83 ^b	88.53±0.18 ^c	88.98±0.32 ^c	87.22±0.51 ^b	86.44±0.51 ^b
增重率 WGR (%)	238.08±2.15 ^a	251.19±2.17 ^{bc}	257.79±1.16 ^d	260.57±1.55 ^d	253.58±1.35 ^c	249.50±1.59 ^b
特定生长率 SGR (%/d)	1.42±0.01 ^a	1.46±0.01 ^b	1.48±0.00 ^c	1.49±0.01 ^c	1.46±0.01 ^b	1.45±0.01 ^b
摄食率 FI	1.00±0.01 ^c	0.98±0.01 ^b	0.95±0.01 ^a	0.96±0.01 ^{ab}	0.96±0.00 ^{ab}	0.97±0.00 ^b
饲料系数 FCR	0.75±0.01 ^c	0.71±0.01 ^b	0.68±0.01 ^a	0.69±0.02 ^{ab}	0.69±0.01 ^{ab}	0.70±0.01 ^b
蛋白质效率 PER (%)	2.62±0.05 ^a	2.78±0.05 ^b	2.89±0.01 ^c	2.81±0.06 ^{bc}	2.81±0.03 ^{bc}	2.77±0.02 ^b
脏体比 VSI (%)	5.83±0.18	5.85±0.11	5.89±0.11	5.85±0.16	5.88±0.16	5.87±0.10
肝体比 HSI (%)	2.95±0.18 ^c	2.84±0.14 ^c	2.73±0.03 ^{bc}	2.21±0.04 ^a	2.19±0.16 ^a	2.55±0.12 ^b
肥满度 CF	3.51±0.04	3.59±0.05	3.58±0.02	3.63±0.06	3.56±0.11	3.61±0.14
存活率 SR (%)	98.89±1.92	98.89±1.92	100.00±0.00	98.89±1.92	100.00±0.00	100.00±0.00

注: 同一行肩标不同表示不同组间差异显著($P<0.05$), 下表同

Note: Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$). The same as the following

他组($P<0.05$), 各添加组均显著高于对照组($P<0.05$)。各添加组的饲料系数(FCR)和摄食率(FI)呈先降后升趋势, 且均显著低于对照组($P>0.05$)。添加组蛋白质效率(PER)显著上升($P<0.05$), 在 P3 组达到最大。添加泛酸对脏体比(VSI)和肥满度(CF)无显著影响($P>0.05$), 肝体比(HSI)呈先下降后上升趋势, P4 和 P5 组显著低于其他各组($P<0.05$)。

采用折线模型分析方法, 拟合增重率与饲料中泛酸含量的关系: 初始体重为(24.73±0.10) g 的大菱鲂幼鱼饲料中泛酸的最适含量为 16.08 mg/kg (图 1)。

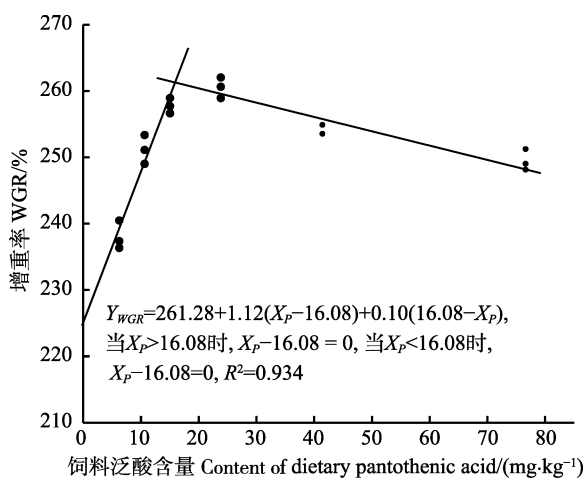


图 1 大菱鲂幼鱼增重率与饲料泛酸含量的折线回归分析

Fig.1 The broken-line regression analysis based on dietary pantothenic acid and WGR of juvenile *S. maximus*

2.2 饲料泛酸含量对大菱鲂幼鱼体组成的影响

饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼体组成的影响见表 4。由表 4 可知, 全鱼体组成中, 水分含量在 77.59%~79.51% 之间, 且各组之间无显著差异($P>0.05$); 粗脂肪含量先上升后下降, P3 组达到最大值; 随着泛酸含量的增加, 粗蛋白和粗灰分显著上升, 最终呈平稳趋势。肌肉体组成中, 水分含量无显著差异($P>0.05$); P3 和 P4 组粗蛋白含量显著高于其他组($P<0.05$); 粗脂肪及粗灰分含量差异不显著($P>0.05$); 肝脏粗脂肪含量随泛酸的增加显著下降($P<0.05$)。

2.3 饲料泛酸含量对大菱鲂幼鱼消化相关酶活的影响

随着饲料泛酸含量的增加, 大菱鲂幼鱼淀粉酶、脂肪酶和 Na^+, K^+ -ATPase 活力呈先上升后下降趋势, P4 组脂肪酶显著高于其他各组($P<0.05$), 淀粉酶和 Na^+, K^+ -ATPase 活力在 P5 组达到最大值。P5 组胰蛋白酶活力显著高于其他组($P<0.05$)。各添加组肌酸激酶(CK)和胆碱酯酶(ChE)活力显著高于对照组($P<0.05$) (表 5)。

2.4 饲料中泛酸含量对大菱鲂幼鱼肝脏和血清抗氧化能力的影响

随着饲料中泛酸含量的增加, 肝脏中过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活力均呈先上升后下降趋势, P3-P6 组丙二醛(MDA)含量显著低于对照组($P<0.05$)。血清中过氧化氢酶(CAT)活力随饲料泛酸含量的升高呈先升后降趋势, P4 组达到最高值($P<$

0.05)。P2~P4 组的超氧化物歧化酶(SOD)活力显著高于对照组($P<0.05$), 并在 P4 组达到最大值。血清中丙

二醛(MDA)含量随泛酸添加量的增加显著下降($P<0.05$), P6 组含量最低(表 6)。

表 4 饲料中泛酸水平对大菱鲂幼鱼常规成分的影响(%湿重)

Tab.4 Effects of dietary pantothenic acid levels on proximate composition of juvenile *S. maximus* (% wet weight)

指标 Indices	组别 Groups					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
全鱼 Wholebody						
水分 Moisture	79.51±3.83	77.59±2.28	76.62±1.77	76.71±1.32	77.71±1.10	77.96±1.08
粗蛋白 Crude protein	14.23±0.24 ^a	14.60±0.31 ^b	14.89±0.18 ^{bc}	14.92±0.08 ^{bc}	15.20±0.11 ^c	15.06±0.05 ^c
粗脂肪 Crude lipid	2.81±0.21 ^b	3.38±0.18 ^c	3.86±0.06 ^e	3.69±0.11 ^d	3.16±0.08 ^c	2.57±0.11 ^a
粗灰分 Crude ash	2.60±0.17 ^a	2.79±0.19 ^{ab}	2.92±0.14 ^b	3.03±0.01 ^b	2.97±0.13 ^b	3.03±0.08 ^b
肌肉 Muscle						
水分 Moisture	78.83±0.18	78.69±0.77	78.32±0.55	78.28±0.44	78.81±0.31	79.10±0.38
粗蛋白 Crude protein	18.31±0.09 ^a	18.18±0.11 ^a	18.64±0.22 ^b	18.62±0.14 ^b	18.35±0.04 ^a	18.21±0.06 ^a
粗脂肪 Crude lipid	0.68±0.01	0.71±0.05	0.72±0.04	0.71±0.01	0.74±0.10	0.75±0.04
粗灰分 Crude ash	1.21±0.02	1.23±0.03	1.26±0.00	1.27±0.02	1.23±0.03	1.23±0.03
肝脏 Liver						
粗脂肪 Crude lipid	11.24±0.45 ^c	10.17±0.63 ^b	9.99±0.09 ^{ab}	9.83±0.42 ^{ab}	9.32±0.04 ^a	9.22±0.49 ^a

表 5 泛酸对大菱鲂幼鱼肠道消化相关酶活的影响

Tab.5 Effects of pantothenic acid on the activities of intestinal digestive physiology and liver physiological enzymes of juvenile *S. maximus*

项目 Items	组别 Groups					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
脂肪酶 Lipase (U/g prot)	9.65±0.24 ^a	11.27±0.82 ^b	12.39±1.32 ^{bc}	15.08±0.1 ^d	13.29±0.62 ^c	13.20±1.19 ^c
淀粉酶 Amylase (U/g prot)	217.31±1.24 ^a	238.97±13.91 ^{ab}	254.23±23.43 ^b	269.03±14.40 ^b	269.16±15.22 ^b	239.50±17.74 ^{ab}
胰蛋白酶 Protease (U/mg prot)	5.33±0.43 ^{ab}	4.29±0.82 ^a	5.64±0.32 ^b	6.52±0.5 ^b	7.97±0.75 ^c	5.45±0.95 ^{ab}
肌酸激酶 CK (U/g prot)	144.00±5.29 ^a	165.60±5.92 ^b	171.63±9.55 ^b	176.30±3.25 ^b	257.67±11.83 ^c	265.20±10.70 ^c
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase (U/g prot)	90.67±4.00 ^a	93.67±4.70 ^a	103.00±4.35 ^b	103.56±3.90 ^b	112.94±3.40 ^c	110.35±4.00 ^{bc}
胆碱酯酶 ChE (U/g prot)	462.50±8.66 ^a	540.10±16.54 ^b	542.29±22.57 ^b	542.67±6.43 ^b	523.33±25.17 ^b	527.93±35.17 ^b

表 6 泛酸对大菱鲂幼鱼肝脏和血清抗氧化能力的影响

Tab.6 Effects of dietary pantothenic acid on liver and serum antioxidant capacity of juvenile *S. maximus*

项目 Items	组别 Groups					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
肝脏 Liver						
过氧化氢酶 CAT (U/mg prot)	12.64±0.20 ^a	16.68±0.42 ^b	17.13±0.59 ^b	20.80±0.96 ^c	16.27±0.83 ^b	12.23±0.58 ^a
超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	86.77±2.15 ^a	96.77±1.98 ^b	100.26±1.63 ^b	119.54±3.42 ^c	137.50±1.97 ^d	103.99±8.36 ^b
丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	1.01±0.15 ^b	0.97±0.13 ^b	0.65±0.14 ^a	0.54±0.07 ^a	0.43±0.06 ^a	0.47±0.11 ^a
血清 Serum						
过氧化氢酶 CAT (U/ml)	3.39±0.23 ^a	5.19±0.23 ^b	9.33±0.52 ^d	9.71±0.68 ^d	9.02±0.02 ^d	7.37±0.26 ^c
超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)	137.91±0.90 ^a	155.24±4.03 ^{bc}	155.67±2.39 ^{bc}	161.30±3.93 ^c	143.25±5.00 ^a	146.71±9.11 ^{ab}
丙二醛 MDA (nmol/ml)	25.18±0.15 ^e	20.58±0.22 ^d	18.76±0.15 ^c	18.69±0.08 ^c	17.81±0.22 ^b	16.79±0.37 ^a

2.5 饲料泛酸含量对大菱鲂幼鱼肝脏 FAS 和 LPL 相对表达量的影响

研究结果显示, 大菱鲂肝脏脂肪合成酶(FAS)mRNA 表达量随泛酸含量的增加呈先升后降趋势, P3、P4 组显著高于 P1、P6 组($P<0.05$) (图 2); 脂蛋白酯酶(LPL)mRNA 表达量随泛酸增加呈上升趋势, 且 P4 到 P6 组显著高于其他组($P<0.05$) (图 3)。

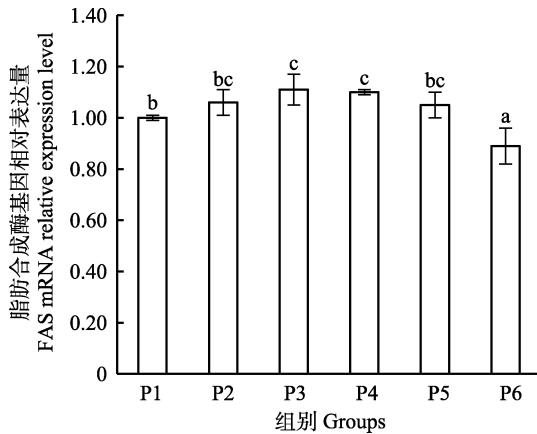


图 2 肝脏脂肪合成酶基因相对表达量

Fig.2 The relative expression level of the FAS mRNA in liver

标有相同上标字母的数值表示差异不显著($P>0.05$), 下同
Values with the same letters are not significantly different at $P>0.05$. The same as below

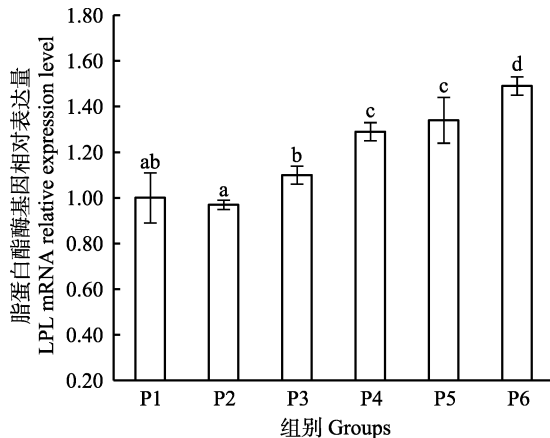


图 3 肝脏脂蛋白酯酶基因相对表达量

Fig.3 The relative expression level of the LPL mRNA in liver

3 讨论

3.1 饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼生长性能、饲料利用、形体指标的影响

本研究结果显示, 经过 80 d 的养殖, 当泛酸不足时(P1), 幼鱼 WGR、SGR 和 PER 显著降低, P2~P4 组 WGR 和 SGR 均显著升高, 此后随着泛酸水平的

进一步升高, WGR 和 SGR 出现下降趋势, FCR 和 FI 随泛酸含量的添加显著下降, 当泛酸含量超过一定量时, 又呈上升趋势。表明饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼生长是必要的, 饲料中泛酸不足或过高对其生长均产生抑制现象。这与在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (刘安龙等, 2007)、吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (黄凤等, 2014)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (刘凯, 2008)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) (Stowell *et al*, 1992)的研究结果相似。泛酸以 CoA 的活性形式参与蛋白质合成、转化, 提高脂肪代谢和脂肪酸彻底氧化供能, 进而提高鱼体增重率, 降低饲料系数(文泽平, 2008)。本研究中, HSI 在 P4 组显著下降, 这与宝石鲈的研究结果相类似(宋理平, 2009), 可能是泛酸的添加影响了鱼肝脏中脂肪代谢, 减少了肝中脂肪沉积, 从而降低了肝体比。以 WGR 为判据, 经折线模型拟合得出确定大菱鲂幼鱼对泛酸的最适需求量为 16.08 mg/kg, 这一结果高于黑带石斑鱼(11.0 mg/kg) (Lin *et al*, 2012)、大黄鱼(11.2 mg/kg) (张春晓, 2006), 低于建鲤(23.0 mg/kg) (文泽平, 2008)、翠鳢(32.8~36.4 mg/kg) (Zehra *et al*, 2018)的最适需求量。不同实验得到的养殖鱼类对泛酸的需求量不尽相同, 这可能与养殖对象的种类、生长阶段、生理状况、饲料配方、养殖环境等有关。

3.2 饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼体组成的影响

体蛋白, 体脂肪和体灰分沉积会造成水生动物的增重, 饲料中主要营养物质的利用效率对水生动物生长有重要影响(Mommsen, 2001)。饲料泛酸水平对不同鱼种的体组成影响存在差异。研究表明, 饲料泛酸显著影响翠鳢鱼体粗蛋白和粗灰分含量(Zehra *et al*, 2018), 湖鱮脂肪含量随着饲料泛酸水平增加而增加(Poston *et al*, 1982)。本研究中, 饲料中添加泛酸对全鱼和背肌水分无显著影响, 当泛酸含量从 6.24 mg/kg 增加到 41.40 mg/kg 时, 实验鱼体粗蛋白和粗脂肪积累增多, 泛酸含量继续增加时, 蛋白沉积受到抑制, 与在草鱼(刘安龙等, 2007)、吉富罗非鱼(黄凤等, 2014)的研究结果类似。其促进蛋白和脂肪沉积的原因是: 第一, 泛酸以辅酶 A 的形式在蛋白质的合成和转运中发挥重要作用(Wen *et al*, 2009); 第二, 泛酸作为酰基载体蛋白的组成之一, 调节脂肪的代谢(田娟等, 2009); 第三, 从本研究结果可知, 泛酸可显著提高肠消化和吸收酶的活性, 从而提高大菱鲂幼鱼对蛋白质、脂肪的消化吸收能力。P2~P5 组全鱼粗灰分含量与 P1 组差异显著, 这与吉富罗非鱼的研究结果一致(黄凤等, 2014), 可能是泛酸提高了肠道对钙磷的吸

收,促进了其在体内的蓄积(张璐等, 2016)。本研究结果显示,适宜的泛酸添加水平对大菱鲂背肌的粗脂肪和粗灰分的蓄积有一定的促进作用,但无显著差异。胆固醇和甘油三酯主要在肝脏内合成, P1 组肝脏脂肪含量显著增加,可能是因为泛酸不足影响到脂肪酸氧化,造成多余脂肪在肝脏中沉积(黄凤等, 2014)。该结果与石斑鱼的研究结果类似(Lin *et al.*, 2012)。

3.3 饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼肠道消化相关酶的影响

化学性消化是水生动物的主要消化方式,而消化酶在其中发挥重要作用。肠上皮营养物质消化是消化酶催化 ATP 结合的过程,其活力可直接揭示鱼类的消化能力(Qian *et al.*, 2015)。本研究中,摄食缺乏泛酸的饲料降低了蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活力,表明泛酸缺乏导致鱼体肠道消化功能受阻。随着泛酸含量从 6.24 mg/kg 增加到 41.40 mg/kg,肠道消化酶活力显著增加,表明泛酸是维持鱼类肠道消化功能的重要营养物质,这可能是因为肠道功能与组织 CoA 的含量成正比,泛酸作为 CoA 的组成成分,参与蛋白质和脂质的代谢和转运,提高消化酶活性,增强蛋白质等营养物质在体内的消化利用率(Qian *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2013)。Na⁺-K⁺泵主要由肠上皮刷状缘细胞表面存在的 ATP 酶构成,其活性可以间接反映肠黏膜的吸收功能(Almansa *et al.*, 2001)。肌酸激酶参与细胞内能量转运和 ATP 再生(Tang *et al.*, 2009)。本研究中,泛酸添加量超过 10.64 mg/kg 时,Na⁺,K⁺-ATP 酶和 CK 活力显著上升。说明适宜水平的泛酸可以通过提高肠道 Na⁺,K⁺-ATP 酶活性提高 ATP 水解能力,并使 CK 的活力增强,为氨基酸、葡萄糖等营养物质在肠内的转运提供能量,从而促进营养物质在肠道的消化和吸收。这与文泽平(2008)对建鲤的研究结果相一致。泛酸在乙酰胆碱的合成中承担重要作用,而胆碱酯酶能迅速破坏组织内的乙酰胆碱。添加组 ChE 活力显著高于 P1 组。可能是脂肪代谢的增加导致肝脏中酰基 CoA 增多,继而产生大量的乙酰胆碱,过多的底物诱导 ChE 活力增强(杜金梁等, 2017)。

3.4 饲料中添加泛酸对大菱鲂幼鱼肝脏和血清抗氧化酶的影响

体内抗氧化酶(SOD-CAT)系统可以清除体内自由基,对维持机体正常代谢和生理功能有重要作用。SOD-CAT 系统代表机体抵抗氧化应激和增加抗自由基酶活性的第一道防线(Liu *et al.*, 2007)。SOD-CAT 系统代表机体抵抗氧化应激与增加抗自由基酶活性的

第一道防线(Winston *et al.*, 1991),本研究结果显示,饲料中添加一定量的泛酸后,能显著提高肝脏和血清中的 CAT 活性,与对团头鲂的报道一致(Qian *et al.*, 2015)。本研究中,肝脏和血清 SOD 活性均在对照组中最低,当饲料泛酸添加量超过 23.81 mg/kg 时,二者表现出不同的变化趋势:血清中的 SOD 活性呈下降趋势,肝脏中的 SOD 活力继续上升。说明饲料中过多的泛酸降低了血清的抗氧化能力。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (袁野等, 2016)、团头鲂(Qian *et al.*, 2015)的研究中也有类似报道。脂质过氧化产生的 MDA 含量可以反映机体受自由基攻击程度,MDA 从膜上产生的位置释放后,可与蛋白质、核酸反应,进而抑制蛋白质的合成(李涌泉等, 2008)。本研究结果显示,添加量超过 10.64 mg/kg 时,肝脏 MDA 含量显著下降,而泛酸水平超过 6.24 mg/kg 时,血清中 MDA 含量显著下降。这一结果与在凡纳滨对虾(袁野等, 2016)、鲤鱼(Li *et al.*, 2015)上的研究一致。Ayyat 等(2011)的研究发现,CoA 通过增强脂肪酸的代谢来清除脂质过氧化物。表明适宜水平的泛酸可以抵抗脂质过氧化和保护组织。

3.5 饲料中泛酸含量对肝脏 FAS 和 LPL 相对表达量的影响

鱼体脂肪沉积主要是受体内脂肪合成、降解和转运共同调控的结果。因此,测定鱼类肝脏中脂肪代谢相关基因的表达量,可以有效地反映鱼体脂肪沉积情况(徐超等, 2016)。FAS 是脂肪酸从头合成的限速酶,对体内脂肪从头合成发挥主导作用(Guo *et al.*, 2007)。本研究中,随着泛酸含量的增加,FAS 表达量呈先升后降趋势,这表明适量泛酸能够提高肝脏中 FAS 的表达水平;这也暗示适量的泛酸可能促进机体脂肪的合成水平,类似的结果在团头鲂中也有报道(Qian *et al.*, 2015)。LPL 促进组织对脂肪酸的摄取,进而增强对肝脏脂肪酸的 β -氧化能力(朱定贵等, 2011)。本研究结果显示,相比对照组, P4~P6 组的 LPL 表达量显著升高,同时,鱼体肝脏粗脂肪含量减少,产生这一结果的原因可能是由于 LPL 表达量的增加,提高了脂肪的氧化代谢速率,同时 FAS 表达量显著降低,使得肝脏脂肪合成量下降。这一研究结果与瓦氏黄颡鱼(*Peltobagrus vacheili*)的研究结果一致(覃川杰等, 2015)。

4 结论

综上所述,泛酸是大菱鲂幼鱼维持正常生长和生

理所必需的维生素。饲料中适宜水平的泛酸可以增强机体消化吸收和清除自由基的能力,并能影响肝脏中脂肪代谢相关基因的表达水平。以增重率为评价指标,24.73 g 大菱鲂幼鱼最适泛酸需求量为 16.08 mg/kg 饲料。

参 考 文 献

- Almansa E, Sanchez J, Cozzi S, *et al.* Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na⁺,K⁺-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 2001, 171(7): 557
- Ayyat MS, El-Maraky HI, Sharaf S. Effect of dietary protein level, stocking density, and dietary pantothenic acid supplementation rate on performance and blood components of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 2011, 23(2): 122–135
- Chen MY, Zhang XM, Lian JH. Development of some digestive enzymes and alkaline phosphatase activities in turbot *Scophthalmus maximus* larvae and juveniles. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2005, 35(3): 483–486 [陈慕雁, 张秀梅, 连建华. 大菱鲂仔稚鱼期消化酶及碱性磷酸酶活性的变化. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2005, 35(3): 483–486]
- Chen YQ, Zhao SP, Zhao YH. Efficacy and tolerability of coenzyme A vs pantothenic acid for the treatment of patients with hyperlipidemia: A randomized, double-blind, multicenter study. *Journal of Clinical Lipidology*, 2015, 9(5): 692–697
- Du JL, Cao LP, Jia R, *et al.* Effects of rhizoma *Alismatis* extract on biochemical index and CYP1A protein expression of hepatocyte steatosis injury induced by oleic acid in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(1): 226–232 [杜金梁, 曹丽萍, 贾睿, 等. 泽泻提取物对油酸诱导建鲤脂肪肝细胞损伤中生化指标及 CYP1A 蛋白表达的影响. *西南农业学报*, 2017, 30(1): 226–232]
- Feng L, Peng Y, Wu P, *et al.* Threonine affects intestinal function, protein synthesis and gene expression of TOR in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *PLoS One*, 2013, 8(7): e69974
- Guo F, Cavener DR. The GCN2 eIF2 α Lpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metabolism*, 2007, 5(2): 103–114
- Huang F, Jiang M, Wen H, *et al.* Dietary pantothenic acid requirement of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1530–1537 [黄凤, 蒋明, 文华, 等. 吉富罗非鱼对饲料中泛酸的需要量. *水产学报*, 2014, 38(9): 1530–1537]
- Jobling M. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp. *Aquaculture International*, 2012, 20(3): 601–602
- Liu AL, Wen H, Jiang M, *et al.* Dietary Pantothenic Acid Requirement of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Fingerlings. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 263–266 [刘安龙, 文华, 蒋明, 等. 草鱼幼鱼对饲料中泛酸需要量的研究. *水产科学*, 2007, 26(5): 263–266]
- Liu Y, Wang WN, Wang AL, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 2007, 265(1–4): 351–358
- Li L, Feng L, Jiang WD, *et al.* Dietary pantothenic acid deficiency and excess depress the growth, intestinal mucosal immune and physical functions by regulating NF- κ B, TOR, Nrf2 and MLCK signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 399–413
- Li YQ, Wang L, Liu N, *et al.* Effects of cadmium on enzyme activity and lipid peroxidation in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 373–379 [李涌泉, 王兰, 刘娜, 等. 镉对长江华溪蟹酶活性及脂质过氧化的影响. *水生生物学报*, 2008, 32(3): 373–379]
- Liu K. Studies on nutritional physiology of pyridoxine, myo-inositol and Pantothenic acid for cobia *Rachycentron canadum*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 [刘凯. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)吡哆醇、肌醇和泛酸营养生理的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Lin Y, Lin H, Shiau S, *et al.* Estimation of dietary pantothenic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus* according to physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 2012(324–325): 92–96
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 85–92]
- Mommsen TP. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001, 129(2–3): 207–219
- Niu HX, Lei JL, Chang J, *et al.* Effect of a vitamin E-supplemented high-fat diet on the growth, lipid metabolism and antioxidant function of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 291–299 [牛化欣, 雷霖霖, 常杰, 等. 维生素 E 对高脂饲料养殖大菱鲂生长、脂类代谢和抗氧化性能的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 291–299]
- Poston HA, Page JW. Gross and histological signs of dietary deficiencies of biotin and pantothenic acid in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cornell Veterinarian*, 1982, 72(3): 242
- Peng M, Xu W, Mai KS, *et al.* Growth performance, fatty acids composition and lipid deposition in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) fed diets with various fish oil substitution levels by linseed oil. *Journal of Fisheries of China*,

- 2014, 38(8): 1131–1139 [彭墨, 徐玮, 麦康森, 等. 亚麻籽油替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长、脂肪酸组成及脂肪沉积的影响. 水产学报, 2014, 38(8): 1131–1139]
- Qian Y, Li XF, Zhang DD, *et al.* Effects of dietary pantothenic acid on growth, intestinal function, anti-oxidative status and fatty acids synthesis of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. PLoS One, 2015, 10(3): e0119518
- Raggi T, Buentello A, Gatlin DM, *et al.* Characterization of pantothenic acid deficiency and the dietary requirement of juvenile hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. Aquaculture, 2016: 326–329
- Stowell SL, Iii DMG. Effects of dietary pantethine and lipid levels on growth and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 1992, 108(1–2): 177–188
- Song LP. Study of nutritional requirement of jade perch *Scortum barcoo*. Doctoral dissertation of Shandong Normal University, 2009 [宋理平. 宝石鲈营养需求的研究. 山东师范大学博士研究生学位论文, 2009]
- Tan CJ, Shao T, Yang JP, *et al.* The effect of starvation on lipid metabolism of darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli*, Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 58–65 [覃川杰, 邵婷, 杨洁萍, 等. 饥饿胁迫对瓦氏黄颡鱼脂肪代谢的影响. 水生生物学报, 2015, 39(1): 58–65]
- Tian J, Leng XJ, Li XQ, *et al.* Effect of dietary carnitine on growth performance, body composition and lipid metabolism enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(2): 295–302 [田娟, 冷向军, 李小勤, 等. 肉碱对草鱼生长性能、体成分和脂肪代谢酶活性的影响. 水产学报, 2009, 33(2): 295–302]
- Tang L, Wang GX, Jiang J, *et al.* Effect of methionine on intestinal enzymes activities, microflora and humoral immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture Nutrition, 2009, 15(5): 477–483
- Wen ZP, Zhou XQ, Feng L, *et al.* Effect of dietary pantothenic acid supplement on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*, var. Jian). Aquaculture Nutrition, 2009, 15(5): 470–476
- Winston GW, Giulio RTD. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology, 1991, 19(2): 137–161
- Wen ZP. Effect of pantothenic acid on functions of digestion, absorption and immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*, var. Jian). Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2008 [文泽平. 泛酸对幼建鲤消化吸收功能和免疫功能的影响. 四川农业大学硕士学位论文研究生论文, 2008]
- Xu C, Li XF, Tian HY, *et al.* Effects of feeding rates on plasma lipid profiles and the mRNA expressions of genes related to lipid metabolism in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Journal of Fisheries of China, 2016, 40(11): 1732–1741 [徐超, 李向飞, 田红艳, 等. 不同投饵率对团头鲂幼鱼血脂水平及脂肪代谢相关基因表达的影响. 水产学报, 2016, 40(11): 1732–1741]
- Xie QS, Li JW, Yang ZC. Japanese flounder fish vitamins and trace elements in the nutritional needs of progress. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(12): 5–7 [谢全森, 李俊伟, 杨振才. 鲆鲽鱼类维生素及微量元素营养需求研究进展. 现代农业科学, 2008(12): 5–7]
- Yano T, Nakao M, Furuichi M, *et al.* Effects of dietary choline, pantothenic acid and vitamin C on the serum complement activity of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988, 54(1): 141–144
- Yuan Y, Huang XL, Lu Y, *et al.* Effects of different dietary pantothenic acid levels on growth performance, feed utilization and serum indices of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(9): 1349–1358 [袁野, 黄晓玲, 陆游, 等. 饲料中不同泛酸水平对凡纳滨对虾生长性能、饲料利用及血清指标的影响. 水产学报, 2016, 40(9): 1349–1358]
- Yang YH, Xiao CL. The functions and biosynthesis of pantothenate. Chemistry of Life, 2008, 28(4): 448–452 [杨延辉, 肖春玲. 泛酸的功能和生物合成. 生命的化学, 2008, 28(4): 448–452]
- Zehra S, Khan MA. Dietary pantothenic acid requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, feed conversion, liver pantothenic acid concentration and carcass composition. Aquaculture Nutrition, 2018, 1–8
- Zhu W, Mai KS, Tan BP, *et al.* Dietary pantothenic acid requirement of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino// International Symposium on Abalone Biology, Fisheries and Culture. 2004: 1045–1049
- Zhu DG, Chen T, Xie RT, *et al.* Fatty acid composition in juveniles and female broodstock of yellow catfish *Pelteobagrus vachelli* in spawning season. Fisheries Science, 2011, 30(8): 482–484 [朱定贵, 陈涛, 谢瑞涛. 瓦氏黄颡鱼稚鱼和生殖季节雌鱼的脂肪酸组成研究. 水产科学, 2011, 30(8): 482–484]
- Zhang CX. Studies on nutritional physiology of major B vitamins and mineral-phosphorus for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. and Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Doctoral dissertation of Ocean University of China, 2006 [张春晓. 大黄鱼、鲈鱼主要B族维生素和矿物质-磷的营养生理研究. 中国海洋大学博士学位研究生论文, 2006]
- Zhang L, Jing LI, Mai K, *et al.* Effects of different dietary vitamin D contents on growth performance, calcium and phosphorus metabolism of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(5): 1402–1411 [张璐, 李静, 麦康森, 等. 饲料中不同维生素D含量对鲈鱼幼鱼生长性能和钙磷代谢的影响. 动物营养学报, 2016, 28(5): 1402–1411]

Study on the Optimum Dietary Pantothenic Requirement of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

WANG Yaping^{1,2}, LI Baoshan², WANG Jiying^①, WANG Chengqiang², WANG Xiaoyan²,
WANG Lili^{1,2}, WANG Shixin², SUN Yongzhi², HAO Tiantian²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

Abstract An 80-day feeding trial was conducted to investigate the pantothenic acid dietary requirements of juvenile turbot. Six isoenergetic and isonitrogenous diets were formulated using fish meal and casein as a protein source. The basal diet was supplemented with calcium D-pantothenic acid at 6.24, 10.64, 15.02, 23.81, 41.40, or 76.57 mg/kg and fed to juveniles weighing (24.73±0.10) g. The results were as follows: 1) No significant differences in juvenile turbot survival rate (SR) were found between the dietary treatments ($P>0.05$) and the weight growth rate (WGR) and specific growth rate (SGR) increased as pantothenic acid levels increased from 10.64 to 76.57 mg/kg ($P<0.05$). For dietary pantothenic acid content greater than 23.81 mg/kg, the hepatosomatic index decreased significantly ($P<0.05$). 2) The crude protein and lipid levels of the whole body and crude protein levels of the muscle initially increased and then decreased with increasing dietary pantothenic acid levels, whereas the crude lipid content of the liver decreased ($P<0.05$). 3) The activities of the intestinal digestive enzymes Na⁺, K⁺-ATPase and hepatic cholinesterase (ChE) initially increased and then decreased with increasing dietary pantothenic acid levels, whereas intestinal creatine kinase (CK) activity increased significantly from 10.64 to 76.57 mg/kg ($P<0.05$). 4) Hepatic and serum catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were significantly lower in the control group than in the groups with calcium pantothenic acid-enriched diets ($P<0.05$). Turbot fed a 6.24 mg/kg pantothenic acid diet had a higher serum malondialdehyde content than those fed other diets ($P<0.05$). 5) Fatty acid synthetase (FAS) expression increased and then decreased with increasing levels of pantothenic acid. Lipoprotein lipase (LPL) expression was significantly up-regulated in the liver with increasing levels of pantothenic acid ($P<0.05$). In conclusion, appropriate levels of dietary pantothenic acid significantly improved intestinal digestion and absorption capacity, thus, improving nonspecific immunity and the expression of fat-related genes, and consequently, the growth and body composition of juvenile turbot. Based on broken-line regression analysis of WGR, the optimum dietary pantothenic acid requirement of juvenile turbot with a body weight of 24.73 g was 16.08 mg/kg.

Key words Juvenile turbot; Pantothenic acid; Growth performance; Requirement

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180918001

http://www.yykxjz.cn/

王坛, 赵金鑫, 刘东来, 孔纯, 华雪铭, 吴钊, 王刚, 冯悦, 杨景丰, 刘韬. 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼消化道组织结构和营养物质消化吸收的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 76-87
Wang T, Zhao JX, Liu DL, Kong C, Hua XM, Wu Z, Wang G, Feng Y, Yang JF, Liu T. Effects of dietary lysozyme on the digestive tract structure and nutrient digestibility of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 76-87

饲用溶菌酶对吉富罗非鱼消化道组织结构和营养物质消化吸收的影响*



王 坛^{1,4} 赵金鑫⁴ 刘东来⁵ 孔 纯¹ 华雪铭^{1,2,3①} 吴 钊¹
王 刚¹ 冯 悦^{1,2,3} 杨景丰^{1,2,3} 刘 韬^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 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. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 4. 广东海大集团股份有限公司 广州 511400;
5. 安徽省巢湖市中旱镇农业综合服务中心水产站 巢湖 238054)

摘要 为了解饲用溶菌酶对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)消化道组织结构发育和营养物质利用的影响,本研究设计 5 种饲料溶菌酶添加水平: 18 mg/kg (L18)、36 mg/kg (L36)、54 mg/kg (L54)、72 mg/kg (L72)和 90 mg/kg (L90),以不添加溶菌酶的饲料(L0)为对照,进行为期 60 d 的饲养。结果显示,饲料中添加溶菌酶对吉富罗非鱼肝脏和胃肠道消化酶活性产生了不同程度的影响。L36、L54 和 L72 组的胃、前肠和中肠蛋白酶活性显著高于对照组($P<0.05$),肝脏、前肠脂肪酶活性在 L54 和 L72 组均显著高于对照组($P<0.05$),淀粉酶活性在除前肠、中肠外的 L72 和 L90 组显著高于对照组($P<0.05$)。L36、L54 和 L72 组鱼的肠道不同部位肠绒毛密度、高度和宽度较对照组显著提高,在肌层厚度上,溶菌酶添加组在前肠和后肠部位有下降趋势,L18、L36 和 L90 组显著低于对照组($P<0.05$),而在中肠部位,肌层厚度随添加水平升高而呈先升后降的变化趋势,L36、L54 和 L72 组在数值上高于对照组,但无显著性差异($P>0.05$);杯状细胞数量在 L54 和 L72 组均显著高于对照组($P<0.05$)。肝脏切片图显示,L36 和 L54 组肝细胞排列整齐、形状饱满,相较于对照组更致密,但高剂量添加组的肝脏健康程度有下降趋势。消化吸收率方面,在饲养 I 期和 II 期,L36 和 L54 组对粗蛋白的表观消化率显著高于对照组,到饲养 III 期和 IV 期,L36~L90 组对干物质、粗蛋白和粗脂肪的消化吸收率均有显著提高($P<0.05$)。研究表明,在本实验条件下,36、54 mg/kg 溶菌酶添加水平具有最稳定的作用效果,吉富罗非鱼通过肝肠发育和消化酶活性的提高来促进对饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的消化吸收。

关键词 吉富罗非鱼; 溶菌酶; 消化吸收率; 消化酶; 肝肠组织形态

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0076-12

近年来,随着水产养殖业的迅速发展,由细菌、病毒引起的水产动物病害也日益凸显,持续制约着养

* 广东省教育厅产学研结合项目(2012B091100372)资助 [This work was supported by the Department of Education of Guangdong Province University-Industry Cooperation Project (2012B091100372)]. 王 坛, E-mail: wangtan0818@163.com

① 通讯作者: 华雪铭, 教授, E-mail: xmhua@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-09-18, 收修改稿日期: 2018-10-21

殖动物的生产和产业效益的提高。抗生素虽是解决这一问题的有效方法,但药物残留、机体耐药性、环境污染等弊端以及对人类健康构成的潜在威胁,显然已不能在养殖生产实际中首选使用。溶菌酶是一类具有天然抗菌活性的蛋白多肽类物质,对包括细菌、真菌等在内的病原微生物具有广谱抑菌作用,已作为一种新型绿色的饲用酶制剂而应用于动物生产中。在畜禽动物上的研究发现(王军等, 2013; 张世卿等, 2008; 顾维智等, 2008; 王晓可等, 2008),日粮中添加溶菌酶对家畜家禽有不同程度的促生长以及提高饲料利用率和自身抗病力的作用,可以完全或部分替代抗生素,但由于水产动物特殊的生活环境和生理生化特点,加之溶菌酶活性易受水产饲料加工等因素的影响,饲用溶菌酶在水产动物中的应用研究还较少,且作用效果仍存在一定程度的差异(邢思华等, 2013; Chen *et al.*, 2014)。研究表明,溶菌酶不仅是一种有活性的免疫调节因子,同时又是一种主要的消化酶,与动物的消化系统密切相关(Nilsen *et al.*, 1999)。此外,饲料中外源性酶制剂的添加能改变鱼类内源消化酶的活性,进而对其消化能力产生影响(张璐等, 2007; 黎军胜等, 2006; 叶元土等, 1993)。虽然鱼的不同种类、不同食性和消化道结构及不同生长期和养殖环境均与机体的消化功能存在一定关系,但对于溶菌酶是否与其他酶制剂一样影响养殖鱼类营养物质消化利用和消化机能,尚未见报道。

吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是经遗传性状改良后的尼罗罗非鱼。该品系罗非鱼因其生长速度快、出肉率高、肌肉必需氨基酸种类齐全且含量丰富,是一种经济价值和营养价值均较高的鱼类,在我国南方有广泛的养殖。然而,在实际生产过程中发现,该鱼摄食量大而杂,尤其在集约化养殖模式中,更易聚积过多残饵和粪便,对鱼的消化机能和组织健康造成威胁。为此,本研究在吉富罗非鱼基础饲料中添加不同水平的溶菌酶制品,通过比较各组鱼对营养物质的消化能力、消化酶活性及消化道器官发育和健康程度三方面来综合评估饲用溶菌酶对吉富罗非鱼营养物质消化和消化道组织健康的影响,以期在溶菌酶在以罗非鱼为代表的杂食性有胃鱼类健康养殖中的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计与饲料

根据吉富罗非鱼的营养需求(NRC, 2011),以鱼粉、豆粕、花生粕和菜籽粕为主要蛋白源,以鱼油和豆油为主要脂肪源,配制成粗蛋白、粗脂肪和总能水平分别为 35.41%、5.77%和 22.87 kJ/g 的基础饲料,在此基

础上,分别添加 18、36、54、72 和 90 mg/kg,即 9×10^4 、 1.8×10^5 、 2.7×10^5 、 3.6×10^5 和 4.5×10^5 U/kg 的溶菌酶制品(上海沈李科工贸公司;初始酶活性 5×10^3 U/mg),分别记为 L0(对照组)、L18、L36、L54、L72 和 L90。饲料原料粉碎过 40 目筛,微量成分采用逐级扩大的方法添加,与大宗原料混合均匀后用制粒机(SLP-45,中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所)制成粒径为 2.0 mm 的硬颗粒饲料,制粒温度控制在 $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。自然风干后于 -20°C 冰箱冷藏备用。实验饲料组成及营养水平见表 1。

表 1 吉富罗非鱼基础饲料组成及营养水平(% , 风干基础)
Tab.1 Composition and nutrient levels of the basal diet for GIFT tilapia (% , air-dry basis)

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
鱼粉 Fish meal	5.0
豆粕 Soybean meal	30.0
花生粕 Peanut meal	15.0
菜籽粕 Rapeseed meal	15.0
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	2.0
次粉 Wheat midding	25.0
豆油 Soybean oil	3.0
鱼油 Fish oil	2.0
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5
氯化胆碱 Choline chloride	0.3
维生素预混料 Vitamin premix ¹⁾	0.2
矿物质预混料 Mineral premix ²⁾	0.5
三氧化二铬 Chromic oxide	0.5
合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels	
干物质 Dry matter	89.36
粗蛋白质 Crude protein	35.41
粗脂肪 Crude lipid	5.77
粗灰分 Crude ash	7.63
总能 Gross energy (kJ/g)	22.87
蛋能比 P/E (g prot/MJ GE)	15.48

注: 1) 维生素预混料为每千克饲料提供 Vitamin premix provided the following per kg of the diet: 硫胺素 thiamine 20.00 mg, 核黄素 riboflavin 20.00 mg, 吡哆醛 pyridoxine 10.00 mg, 尼克酸 nicotinic acid 10.00 mg, 泛酸钙 calcium pantothenate 50.00 mg, 生物素 biotin 1.0 mg, 叶酸 folic acid 5.0 mg, 肌醇 inositol 500 mg, V_C 100 mg, V_E 50 mg, V_A 2 mg, V_{B12} 0.02 mg, V_{K3} 10 mg, V_{D3} 0.05 mg

2) 矿物质预混料为每千克饲料提供 Mineral premix provided the following per kg of the diet: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 525.5 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 49.2 mg, KI 5.23 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 238.8 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.62 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 11.8 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, Na_2SeO_4 0.66 mg, KCl 600 mg, NaCl 107.1 mg

1.2 实验用鱼与饲养管理

饲养实验在上海海洋大学滨海养殖基地进行。选用规格一致、平均体重为(11.35±0.08)g的吉富罗非鱼960尾,随机分配于24个等大尼龙网箱中(分为6组,每组4个重复),每网箱40尾。对照组饲喂基础饲料,5个实验组分别对应饲喂L18~L90组的实验饲料。实验用鱼饲养于室外水泥池中的24口等大尼龙网箱(1.2 m×1.8 m×1.2 m)中,水源为天然河水。用基础饲料驯化7 d,待其摄食正常后开始正式实验。日投喂采取定量投喂方式,每天定点投喂3次(08:00、12:00和17:00),日投饵率为鱼体重的3%~8%,根据生长阶段、天气、摄食状况调整投喂量。实验期间24 h充气,定期换水,水温为26~34℃,溶氧>5 mg/L,氨氮含量<0.3 mg/L,养殖周期为60 d。

1.3 消化实验

实验期间,按照基础饲料配方以0.5%的Cr₂O₃作为指示剂进行不同时期的消化率实验,实验前预饲7 d。每天08:00投料30 min后收集粪便,取具包膜、结构完整者风干后65℃恒温烘干,保存于干燥器中,连续收集4次(1~15 d/I期;16~30 d/II期;31~45 d/III期;46~60 d/IV期)。每网箱每一阶段的鱼粪混合均匀后称重,作为分析样品。测定实验饲料和粪便样品中的干物质、粗蛋白、粗脂肪和Cr₂O₃含量,以计算饲料常规营养成分的表观消化率(Apparent digestibility coefficients, ADCs)。其中,水分含量采用105℃烘箱干燥恒重法测定;粗蛋白含量采用凯氏定氮法(总氮×6.25)测定;粗脂肪含量采用氯仿-甲醇提取法测定;Cr₂O₃用高氯酸-硝酸湿式灰化后进行定量测定。

饲料营养物质(干物质、粗蛋白和粗脂肪)ADCs的计算方法如下所述:

$$\text{ADC}(\%)=100\times[1-(F\times D_{\text{cr}})/(D\times F_{\text{cr}})];$$

式中, F 为粪便中的营养物质含量; D 为饲料中营养物质含量; D_{cr} 为饲料中Cr₂O₃的含量; F_{cr} 为粪便中Cr₂O₃的含量。

1.4 肝脏和胃肠道消化酶测定

饲养实验结束后,禁食24 h,用丁香酚溶液麻醉,解剖取样。每网箱取6尾鱼的肝脏和胃肠道组织,并根据Cataldi等(1987)和Garcia等(2001)的方法分离出前、中、后肠,各部分组织用0.86%的预冷鱼用生理盐水洗去内容物,装袋保存于-20℃冰箱。检测前,将肝脏或胃肠道组织在4℃冰箱解冻,按照质量:体积=1:9的比例用上述生理盐水匀浆,然后4℃、4000 r/min离心10 min,取上清液并稀释不同倍数后进行消化酶

比活力的测定,并于24 h内测完。其中,蛋白酶和淀粉酶比活力测定部位是肝脏、胃和前、中、后肠,脂肪酶仅测定其生理性发生和存量最多的肝脏和前肠部位。蛋白酶活力采用福林酚法测定,酶活力定义:每毫克蛋白40℃下每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸,定义为1个蛋白酶活力单位(U/mg prot)(施兆鸿等,2016)。其中,胃蛋白酶在pH=2.4的酸性介质条件下测定,肠道和肝脏蛋白酶在pH=7.5中性介质条件下测定(刘爱君等,2009)。淀粉酶(AMS)活力采用碘-淀粉比色法测定,酶活力定义(施兆鸿等,2016):每毫克蛋白在37℃与底物作用30 min,水解10 mg淀粉定义为1个淀粉酶活力单位(U/mg prot)。

脂肪酶(LPS)活力使用南京建成生物工程研究所试剂盒测定,酶活力定义:37℃条件下,每克组织蛋白在本反应体系中与底物反应1 min,每消耗1 μmol的底物为1个酶活力单位(U/g prot)(施兆鸿等,2016),以下检测结果中统一转化为(U/mg prot)。

组织样本中总蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法。

上述组织淀粉酶、脂肪酶和总蛋白含量均使用南京建成生物工程研究所提供的专业试剂盒进行测定,检测方法和酶活力定义均按照说明书进行。

1.5 肝脏和肠道组织切片观察

饲养实验结束时,每网箱随机取2尾鱼,取约1 cm³肝脏和2~3 cm的前、中、后肠组织块(根据1.4方法划分肠道,并在各肠段和肝脏的中间处取材),用0.86%鱼用生理盐水轻轻冲洗,滤干水分后,用Bouin氏液固定,24 h后,转移至70%酒精中用于石蜡切片的制作。切片制作过程中,组织样本经过常规系列梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(5 μm)和H&E染色后,在普通光学显微镜下观察、拍摄并测量肠绒毛高度(HF)、宽度(HW)、密度(HD)和肌层厚度(tML),统计杯状细胞数量(dGC),每个样本取5张染色结果较好的切片进行拍照。其中,HF和HW均选取一个肠道横截面中的5根最高绒毛为测量对象;HD是以一个肠道横截面的全部绒毛数量为测量值;dGC为横切面上5根最高肠绒毛上皮层中的杯状细胞数目;tML为横切面上表征整个肠壁肌肉层的最大厚度(李志刚等,2007;黄玉章等,2010;于朝磊等,2014)。

1.6 数据分析

实验数据均以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用SPSS 17.0分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),若影响显著,则采用Duncan氏

法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 饲用溶菌酶对不同饲养时期吉富罗非鱼饲料营养成分表观消化率的影响

经过 60 d 的饲养, 各添加组鱼在不同生长期对饲料营养成分的表观消化率见表 2。在饲养 I 期, 各组鱼对干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率分别为 60.48%~69.03%、82.38%~87.62%和 70.71%~76.20%, 其中, L36 和 L54 组鱼对干物质和粗蛋白的表观消化率显著高于对照组($P < 0.05$), 在 L54 组达到最大值。各溶菌酶添加组鱼对粗脂肪的表观消化率均显著低于对照组($P < 0.05$), L72 组最低; 在饲养 II 期, 各组鱼对干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率分别为 69.24%~74.30%、88.04%~92.00%和 80.82%~88.24%, 随溶菌酶添加量的增加, 实验鱼对粗蛋白的表观消化率整体呈现先升后降的变化趋势, L54~L90 组显著高于对照组, 此时 3 组鱼对干物质、粗脂肪的表观消化率存在显著下降($P < 0.05$); 在饲养 III 期, 各组鱼对干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率为 63.32%~71.67%、84.32%~88.79%和 81.44%~88.58%, L36~L90 组的干物质、粗蛋白表观消化率均显著高于对照组, 且 L90 组显著高于其他各组($P < 0.05$), 同时, 粗脂肪表观消化率在组间也整体呈现上升趋势, 显著高于对照组($P < 0.05$); 在饲养 IV 期, 各组鱼对饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率分别为 59.25%~

66.06%、79.63%~87.46%和 64.78%~75.09%, 除 L54 组外, 其他各溶菌酶添加组鱼对饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率均显著高于对照组($P < 0.05$), 在 L90 组呈现最大值。

2.2 饲用溶菌酶对消化酶活力的影响

由表 3 可见, 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼肝脏和胃肠道消化酶活力产生了不同程度的影响。与对照组相比, 溶菌酶的添加对罗非鱼胃、前肠和中肠蛋白酶活力具有显著促进作用, 在 L36、L54 和 L72 组呈现最大值($P < 0.05$), 后肠蛋白酶活力在组间无显著性差异($P > 0.05$); 淀粉酶方面, 在高剂量添加剂组(L72 和 L90)的肝脏、胃和后肠部位显著高于对照组($P < 0.05$), 前肠中 L54 组显著高于对照组, 但在 L72 和 L90 组显著低于对照组($P < 0.05$), 中肠部位在除 L72 组外的其余添加组均显著高于对照组($P < 0.05$); 脂肪酶方面, L54 和 L72 组在肝脏和前肠部位的酶活力显著高于对照组和其他各添加组($P < 0.05$)。

2.3 肝脏组织结构变化

经过 60 d 养殖实验后, 各组鱼肝脏组织切片结果见图 1A~F。对照组和 L18 组鱼出现较多的肝细胞核偏移和个别细胞核消失现象(图 1 箭头所示); L36 和 L54 组鱼肝细胞排列整齐, 形状饱满, 相较于 L0 和 L18 组更致密, 大小均一; 高剂量添加组(L72 和 L90)鱼肝细胞排列相对稀疏, 出现较多的核消失、移和浓缩现象, L90 组伴有纤维化趋势(图 1 箭头所示)。

表 2 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼不同饲养时期营养物质表观消化率的影响(%)
Tab.2 Effects of dietary lysozyme supplementation on apparent digestibility coefficients (ADCs) of GIFT tilapia at different feeding stages (%)

饲养时期 Feeding stage	项目 Items	溶菌酶添加水平 Lysozyme level (mg/kg)					
		0	18	36	54	72	90
II 期 (1~15 d)	干物质 Dry matter	60.48±0.87 ^c	60.96±0.21 ^c	66.27±0.25 ^b	69.03±0.06 ^a	60.52±0.74 ^c	61.23±0.28 ^c
	粗蛋白 Crude protein	84.01±0.67 ^{bc}	86.49±0.97 ^a	87.62±0.56 ^a	87.61±1.61 ^a	82.38±1.45 ^c	84.29±0.81 ^b
	粗脂肪 Crude lipid	76.20±1.59 ^a	73.64±0.92 ^b	73.16±0.71 ^b	72.43±0.80 ^{bc}	70.71±0.71 ^c	73.87±1.71 ^c
II 期 (16~30 d)	干物质 Dry matter	73.08±1.36 ^a	70.81±1.97 ^{bc}	74.30±1.23 ^a	69.24±1.75 ^c	70.30±1.08 ^c	72.84±0.99 ^{ab}
	粗蛋白 Crude protein	88.04±0.80 ^c	89.29±0.94 ^{bc}	88.86±0.46 ^{bc}	92.00±0.90 ^a	89.48±0.90 ^b	89.81±0.47 ^b
	粗脂肪 Crude lipid	85.49±1.32 ^{ab}	84.60±2.43 ^b	88.24±0.48 ^a	83.58±2.07 ^{bc}	83.80±2.84 ^{bc}	80.82±2.63 ^c
III 期 (31~45 d)	干物质 Dry matter	63.32±1.70 ^c	64.84±1.14 ^c	69.38±0.53 ^b	67.57±1.37 ^b	67.82±1.02 ^b	71.67±1.31 ^a
	粗蛋白 Crude protein	84.32±0.97 ^c	85.35±1.08 ^{bc}	86.60±1.19 ^b	86.13±1.08 ^b	86.24±0.88 ^b	88.79±0.43 ^a
	粗脂肪 Crude lipid	81.44±0.94 ^c	86.66±1.29 ^{ab}	87.62±1.38 ^{ab}	85.83±1.57 ^b	87.03±0.99 ^{ab}	88.58±1.30 ^a
IV 期 (46~60 d)	干物质 Dry matter	59.25±0.59 ^c	62.26±2.91 ^b	65.39±1.66 ^a	61.45±1.24 ^{bc}	63.62±0.90 ^{ab}	66.06±2.64 ^a
	粗蛋白 Crude protein	79.63±0.60 ^c	81.96±1.35 ^b	82.84±1.34 ^b	79.78±0.54 ^c	82.38±1.35 ^b	87.46±0.82 ^a
	粗脂肪 Crude lipid	64.78±1.81 ^c	71.01±1.92 ^b	73.48±1.63 ^{ab}	67.31±1.42 ^c	71.57±1.09 ^b	75.09±1.86 ^a

注: 不同上标字母表示显著性差异。下同

Note: Different superscript letters represent significant difference. The same as below

表3 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼肝脏和胃肠道消化酶活力的影响(U/mg prot)
Tab.3 Effects of dietary lysozyme supplementation on digestive enzyme activities of GIFT tilapia in the liver and gastrointestinal (U/mg prot)

部位 Organ	项目 Items	溶菌酶添加水平 Lysozyme level (mg/kg)					
		0	18	36	54	72	90
肝脏 Liver	蛋白酶 Protease	113.99±5.38 ^{abc}	111.66±2.42 ^{bc}	115.90±4.27 ^{ab}	119.23±4.92 ^a	108.94±2.64 ^c	115.12±4.83 ^{abc}
	淀粉酶 Amylase	11.71±0.63 ^{bc}	12.53±0.44 ^b	10.90±0.89 ^{bc}	10.45±0.89 ^c	11.58±1.01 ^{bc}	19.95±1.33 ^a
	脂肪酶 Lipase	272.03±7.05 ^c	274.73±7.11 ^c	286.05±8.13 ^c	376.77±14.49 ^a	350.27±14.25 ^b	284.45±10.78 ^c
胃 Stomach	蛋白酶 Protease	183.64±10.65 ^c	196.48±5.27 ^{ab}	200.63±3.59 ^a	205.42±14.92 ^a	189.10±9.66 ^{ab}	199.04±12.01 ^{ab}
	淀粉酶 Amylase	4.45±0.76 ^c	5.08±0.73 ^c	5.27±0.91 ^{bc}	5.06±0.85 ^c	6.15±0.84 ^b	7.52±0.88 ^a
前肠 Anterior intestine	蛋白酶 Protease	417.39±15.21 ^c	440.22±16.14 ^c	515.95±14.66 ^{bc}	699.12±20.15 ^a	595.06±11.20 ^{ab}	574.81±10.52 ^b
	淀粉酶 Amylase	7.24±0.16 ^b	7.42±0.28 ^b	7.23±0.21 ^b	8.14±0.47 ^a	6.20±0.13 ^c	6.42±0.22 ^c
	脂肪酶 Lipase	149.35±10.71 ^b	138.83±10.32 ^b	130.35±9.14 ^b	237.48±20.34 ^a	147.24±10.54 ^b	124.30±10.10 ^b
中肠 Middle intestine	蛋白酶 Protease	47.07±2.86 ^b	47.44±2.52 ^b	51.01±3.15 ^{ab}	53.22±2.66 ^a	50.03±3.15 ^{ab}	51.21±1.41 ^{ab}
	淀粉酶 Amylase	0.57±0.05 ^b	0.75±0.06 ^a	0.78±0.02 ^a	0.82±0.09 ^a	0.65±0.01 ^b	0.81±0.04 ^a
后肠 Distal intestine	蛋白酶 Protease	34.81±3.22	38.41±2.15	38.63±2.17	37.54±3.05	39.32±3.22	37.27±1.89
	淀粉酶 Amylase	0.47±0.04 ^b	0.48±0.03 ^b	0.45±0.05 ^b	0.43±0.02 ^b	0.49±0.04 ^b	0.59±0.06 ^a

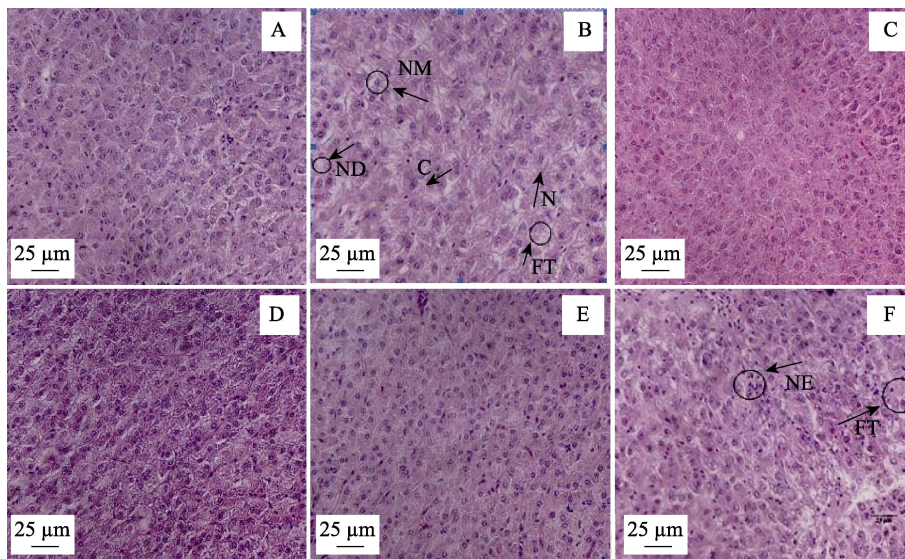


图1 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼肝脏形态、结构的影响(×400)

Fig.1 Effects of dietary lysozyme on liver morphology and structure of GIFT tilapia (×400)

A: L0组; B: L18组; C: L36组; D: L54组; E: L72组; F: L90组

C: 细胞质; N: 细胞核; NM: 核偏移; ND: 核消失; NE: 核浓缩; FT: 纤维化

A: L0 group; B: L18 group; C: L36 group; D: L54 group; E: L72 group; F: L90 group

C: Cytoplasm, N: Cell nucleus, NM: Nuclear migration, ND: Nuclear disappear, NE: Nuclear enrichment; FT: Fibrillation

2.4 肠道组织形态结构

2.4.1 形态学指标 由表4可见, 经过60 d的饲养, 不同溶菌酶添加水平对吉富罗非鱼的肠道各部位形态学指标也产生了不同程度的影响。绒毛密度上, 溶菌酶添加组较对照组要明显增多(L18组除外, $P < 0.05$), 但高剂量添加下(L90)存在显著或数值上的下降趋势。绒毛高度和宽度方面, L54和L72组在前肠

和中肠部位均显著高于对照组, 后肠绒毛高度在L54和L90组较高, 且各溶菌酶添加组的后肠绒毛宽度较对照组均显著增加($P < 0.05$); 在肌层厚度上, 溶菌酶添加组在前肠和后肠部位有下降趋势, L18、L36和L90显著低于对照组($P < 0.05$), 而在中肠部位, 肌层厚度随添加水平升高而呈现先升后降的变化趋势, L36~L72组在数值上高于对照组, 但无显著性差异($P > 0.05$)。

表 4 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼肠道形态学指标的影响(μm)
Tab.4 Effects of dietary lysozyme supplementation on intestinal morphology of GIFT tilapia (μm)

部位 Organ	项目 Items	溶菌酶添加水平 Lysozyme level (mg/kg)					
		0	18	36	54	72	90
前肠 Anterior intestine	绒毛密度 Villus density	38.00±2.00 ^c	45.00±1.73 ^b	44.40±1.14 ^b	48.67±2.52 ^a	48.75±1.71 ^a	43.67±1.53 ^b
	绒毛高度 Villus height	331.06±42.98 ^b	362.89±17.51 ^b	345.93 ±44.19 ^b	413.04±53.03 ^a	405.65±31.93 ^a	343.04 ±26.02 ^b
	绒毛宽度 Villus width	117.39±14.65 ^b	111.55±17.53 ^b	143.30±10.07 ^a	154.75±22.36 ^a	139.79±19.52 ^a	115.06±14.97 ^b
	肌层厚度 Muscular thickness	32.44±1.74 ^a	32.21±3.94 ^{ab}	28.76±2.22 ^b	31.81±2.23 ^{ab}	31.35±2.59 ^{ab}	29.08±1.88 ^{ab}
中肠 Middle intestine	绒毛密度 Villus density	27.75±2.22 ^b	33.67±2.31 ^a	33.00±1.83 ^a	35.50±1.91 ^a	35.00±2.16 ^a	33.33±1.53 ^a
	绒毛高度 Villus height	123.05±10.22 ^c	136.18±13.56 ^{bc}	151.65±21.75 ^{ab}	163.75±20.65 ^a	157.80±17.18 ^{ab}	140.42±15.17 ^{abc}
	绒毛宽度 Villus width	131.50±11.33 ^b	124.96±21.48 ^b	126.32±19.37 ^b	178.86±9.72 ^a	162.31±21.10 ^a	125.67±16.55 ^b
	肌层厚度 Muscular thickness	22.83±1.24 ^{ab}	22.72±1.52 ^{ab}	23.63±1.95 ^a	23.85±1.55 ^a	23.15±1.59 ^a	21.46±1.19 ^b
后肠 Distal intestine	绒毛密度 Villus density	21.00±1.41 ^c	19.80±1.48 ^c	23.13±1.31 ^b	27.00±1.15 ^a	27.75±1.50 ^a	21.75±0.96 ^{bc}
	绒毛高度 Villus height	103.93±5.85 ^b	111.60±8.44 ^b	109.55±8.40 ^b	128.75±16.55 ^a	109.21±6.44 ^b	123.55±4.08 ^a
	绒毛宽度 Villus width	80.11±8.53 ^c	132.42±10.35 ^b	127.57±10.61 ^b	136.96±13.63 ^b	135.39±11.49 ^b	152.69±7.84 ^a
	肌层厚度 Muscular thickness	35.75±1.75 ^a	25.19±1.67 ^c	32.76±1.72 ^b	34.46±2.27 ^{ab}	26.07±2.22 ^c	32.55±1.98 ^b

2.4.2 肠道不同部位形态结构的显微观察 图 2~图 4 显示了养殖 60 d 各组吉富罗非鱼肠道不同部位的石蜡切片结构。在显微镜下观察, 各组罗非鱼肠黏膜形态结构都较为完整、层次分明, 肠黏膜上皮细胞密集且排列规则, 高倍镜下轮廓清晰, 染色鲜明。但从发育程度上看, 溶菌酶添加组鱼的肠道各段较对照组有明显优势。如图 2 所示, 对照组的前肠绒毛相对稀疏, 质地松软, 且绒毛高度较短, 而 L54~L90 组鱼的前肠绒毛明显变得紧实高壮, 与表 4 的测量结果相吻合。如图 3 所示, 与对照组相比, L36~L72 组鱼的中肠绒毛密度、高度和宽度有所增加, 且绒毛排列整齐, 但高剂量添加水平下(L90)的中肠绒毛发育出现下降趋势, 表现为绒毛变短、稀疏松弛, 且肌层厚度变薄。如图 4 所示, 对照组的后肠绒毛有脱落现象, 但肌层厚度仍较大, L36~L72 组鱼后肠绒毛密度有所增加, L54 和 L90 组后肠绒毛高度也有增加趋势。此外, 添加溶菌酶也明显提高了后肠绒毛宽度, 这些均与表 4 的测量结果基本吻合。

2.5 肠黏膜杯状细胞的变化情况

从表 5 可以看出, L54 和 L72 组鱼前肠肠黏膜上皮杯状细胞数量显著高于其他各组($P<0.05$); 且与对照组相比, L36~L72 组鱼的中肠和后肠肠黏膜上皮杯状细胞数量也有显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼肝肠组织结构发育的影响

早在 Marshall(1998)提出的“肠-肝轴”理论中就已认为, 肠道和肝脏并不是 2 个完全独立的器官, 它们在功能上存在着广泛的联系。鱼体生理性的“肠-肝轴”中, 胆汁酸的“肠-肝循环”是其重要物质基础之一, 构造了二者之间天然的功能联系(Cortes *et al*, 2013)。在水生动物上常用肠道绒毛高度、绒毛密度以及杯状细胞的数量等组织形态学指标来反映鱼类

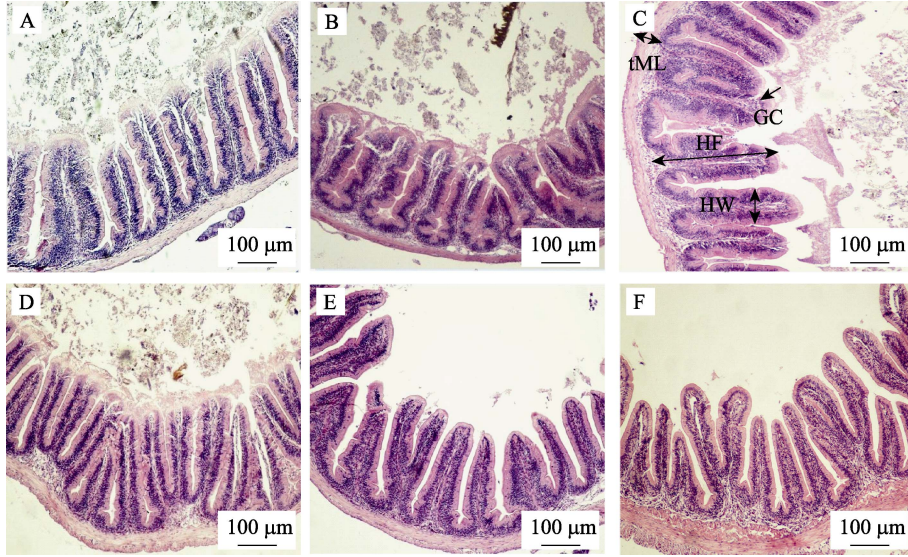


图 2 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼前肠形态、结构的影响($\times 100$)

Fig.2 Effects of dietary lysozyme on anterior intestine morphology and structure of GIFT tilapia ($\times 100$)

A: L0 组; B: L18 组; C: L36 组; D: L54 组; E: L72 组; F: L90 组

HF: 绒毛高度; HW: 绒毛宽度; tML: 肌层厚度; GC: 杯状细胞

A: L0 group; B: L18 group; C: L36 group; D: L54 group; E: L72 group; F: L90 group

HF: Height of fold; HW: Width of fold; tML: Thickness of muscular layer; GC: Goblet cells

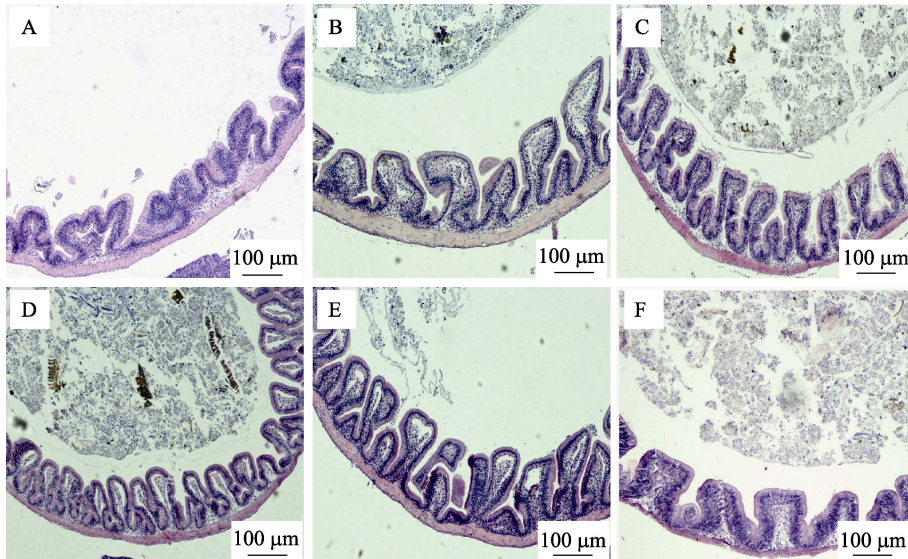


图 3 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼中肠形态、结构的影响($\times 100$)

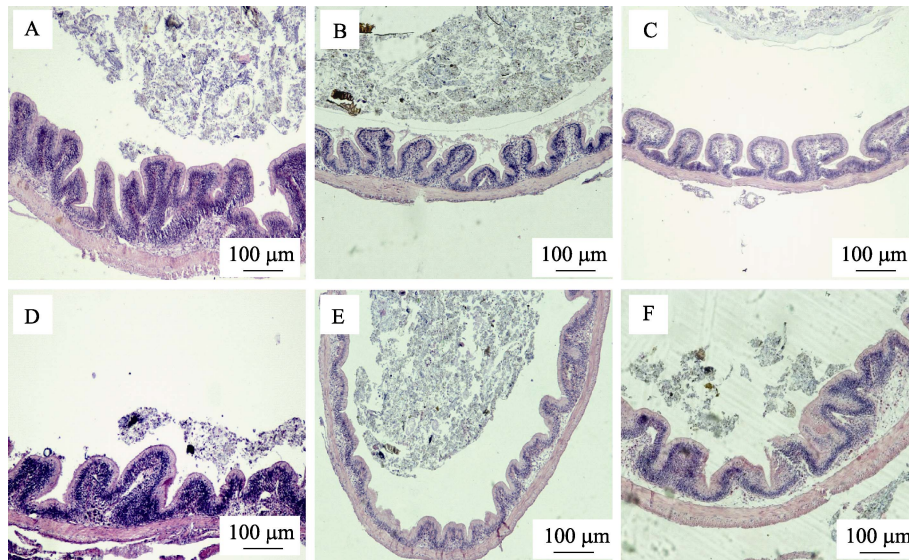
Fig.3 Effects of dietary lysozyme on middle intestine morphology and structure of GIFT tilapia ($\times 100$)

A: L0 组; B: L18 组; C: L36 组; D: L54 组; E: L72 组; F: L90 组

A: L0 group; B: L18 group; C: L36 group; D: L54 group; E: L72 group; F: L90 group

肠道的发育和健康程度, 并以此评估鱼类肠道的消化吸收能力(聂国兴等, 2007; Farhangi *et al*, 2001)。同时, 肝脏的结构形态和健康程度对于其本身消化功能和整个“肠-肝轴”系的正常运转也起到不可忽视的作用。本研究结果显示, L36、L54 和 L72 组鱼在摄食

含有溶菌酶饲料 60 d 后的肠道不同部位肠绒毛密度、高度和宽度长势较对照组显著提高, 说明适量溶菌酶的添加可以促进吉富罗非鱼肠道的生长发育, 这可能与溶菌酶进入鱼体后发挥的调控肠道菌群结构平衡有关。对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的研究表

图 4 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼后肠形态、结构的影响($\times 100$)Fig.4 Effects of dietary lysozyme on distal intestine morphology and structure of GIFT tilapia ($\times 100$)

A: L0 组; B: L18 组; C: L36 组; D: L54 组; E: L72 组; F: L90 组

A: L0 group; B: L18 group; C: L36 group; D: L54 group; E: L72 group; F: L90 group

表 5 各组鱼肠粘膜杯状细胞的数量变化(个)

Tab.5 Quantity changes of intestine goblet cells of GIFT tilapia in different groups (ind.)

部位 Organ	溶菌酶添加水平 Lysozyme level (mg/kg)					
	0	18	36	54	72	90
前肠 Anterior intestine	12.67 \pm 1.15 ^c	12.79 \pm 0.81 ^c	12.38 \pm 0.48 ^c	14.43 \pm 0.79 ^b	16.38 \pm 1.25 ^a	11.50 \pm 1.91 ^c
中肠 Middle intestine	7.50 \pm 1.32 ^b	9.25 \pm 1.50 ^b	11.50 \pm 1.12 ^a	13.40 \pm 1.14 ^a	12.80 \pm 1.79 ^a	9.50 \pm 1.12 ^b
后肠 Distal intestine	4.13 \pm 0.85 ^b	4.30 \pm 0.45 ^b	5.79 \pm 0.81 ^a	6.00 \pm 0.71 ^a	5.88 \pm 0.85 ^a	4.50 \pm 0.50 ^b

明, 适量添加溶菌酶能够促进有益菌的增殖, 同时, 对诸如葡萄球菌科等有害菌群有抑制作用, 这种对微生物结构的正面调节作用能够降低肠道维持, 从而促进肠绒毛发育(Chen *et al*, 2014)。然而, 本研究结果发现, 添加溶菌酶并没有提高吉富罗非鱼前肠、后肠的肌层厚度, 甚至有下降趋势, 这可能与机体在确保肠道健康的前提下, 减少肠道维持需求、促进动物生长有关。此外, 溶菌酶的过量添加则可能破坏肠道微生物菌落结构, 使得机体肠绒毛发育减弱, 此结论也在本研究有所体现。

本研究结果还显示, L36、L54 和 L72 组鱼肠黏膜上皮层中的杯状细胞数量也有显著提高, 这进一步促进了吉富罗非鱼肠道健康水平, 相似结论在异育银鲫(Chen *et al*, 2014)、断奶仔猪(Cooper *et al*, 2011)中已有报道, 同时与溶菌酶具有类似功能的抗菌肽在无茵鸡(Wang *et al*, 2009)日粮中作用效果一致。其内在机制可能在于溶菌酶的添加有利于鱼肠上皮杯状细胞发生, 从而更多产生黏蛋白, 于肠上皮形成致密粘液层, 更好地保护肠上皮组织抵御外来有害微生物的

侵犯, 降低肠道疾病发生。关于溶菌酶能够促进肠上皮细胞增殖分化和加快组织修复的功能已在小鼠(林成招等, 2005; 刘晋峰, 2007)和兔(梁彦, 2012)等畜禽动物上有过报道, 而和溶菌酶具有类似功能的抗菌肽也在断奶仔猪肠道损伤修复方面起到了相似的作用(Tang *et al*, 2013)。

结合肝脏组织形态学观察, 本研究发现, L36 和 L54 组鱼的肝脏组织细胞更加饱满, 较对照组和 L18 组, 细胞核偏移和浓缩的现象减少, 从而能在总体水平上提高肝脏的健康程度; 然而, 高剂量添加水平组并没有显示出这种优势, 这种和肠道相似的变化结果很可能与“肠-肝轴”系的连带运转机制有关, 关于溶菌酶在此方面的研究机制需要进一步论证。

3.2 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼消化酶活力的影响

一般来说, 进入肠道的食物会受到肠道运动带来的机械性消化作用, 同时, 也会接触消化酶而进行化学性消化。消化酶活性的高低是评价养殖鱼类对营养物质消化能力的重要指标(刘襄河等, 2013)。邢思华

等(2013)研究表明,在一定范围内添加溶菌酶能够显著提高草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝胰脏的蛋白酶活性,但对肠道蛋白酶和淀粉酶活性没有影响。本研究发现,随饲料溶菌酶添加水平的提高,吉富罗非鱼胃、前肠和中肠蛋白酶活性呈现先升高后降低的变化趋势,在 L36、L54 和 L72 组呈现最大值,对后肠蛋白酶活性无显著影响,同时, L54 和 L72 组的肝脏和前肠的脂肪酶活性也有显著提高,而对于淀粉酶,则在高剂量添加组(L72 和 L90 组)表现出较高的酶活性(前肠和中肠不明显),这说明饲用溶菌酶能够在一定程度上刺激吉富罗非鱼肝脏和胃肠道消化酶的分泌,但存在添加剂量与所激发的消化酶种类不同的差异性变化。推测原因可能与溶菌酶作为蛋白酶类物质进入鱼体后的排异反应、鱼体不同部位的适应机制、消化酶自身特性等均有关系(Yokooji *et al.*, 2013),其内在机制有待进一步研究。另一方面,溶菌酶对鱼体消化道微生态的积极调控,使得机体内环境处于一个最佳生理状态,更有利于消化酶活性的发挥。

涂永锋等(2004)研究表明,鱼类肠黏膜柱状上皮层中散落的杯状细胞不仅是一类黏液细胞,又是一种典型的分泌型细胞,是储存和分泌消化酶的重要场所,因而,杯状细胞数目的提高会增加鱼体消化酶的分泌量。本研究发现, L36、L54 和 L72 组鱼肠黏膜上皮层中的杯状细胞数量明显高于其他组,这可能是这几组鱼消化酶分泌量提高的又一重要原因。

3.3 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼营养物质消化吸收的影响

目前,关于溶菌酶对营养物质消化吸收率的研究多见于畜禽动物(张世卿等, 2008; 程时军等, 2009; 丁亦男, 2012),而在鱼类上仅见于异育银鲫(Chen *et al.*, 2014)。这些研究表明,在饲料中添加适量的溶菌酶能在一定程度上提高养殖动物对营养物质的消化吸收率,但作用不显著。本研究通过跟踪不同养殖周期内吉富罗非鱼对饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率,发现在饲养 I 期和 II 期, L36 和 L54 组鱼对粗蛋白的表观消化率显著高于对照组,而高剂量添加水平下会存在显著降低趋势。随着饲养时间的增长,到达饲养 III 期和 IV 期,高剂量添加组鱼对干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率也呈现明显上升趋势,甚至在 L90 组出现最大值,推测原因可能在饲养前期阶段,鱼体对中剂量添加水平下的溶菌酶饲料具有更快的适应反应,高剂量水平下反而存在较大排异行为,因此,在饲养前期,这 2 组鱼先满足生长发育所需的蛋白质营养,而到养殖中后期,鱼体对高剂量添加水

平的溶菌酶饲料逐渐适应,且随水温降低,对饲料干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率均有显著提升,这与鱼体的自我适应机制、摄食水平、生长发育和环境变化均有很大关系。

Nilsen 等(1999)研究表明,溶菌酶作为一种蛋白多肽类物质,其在机体内也可以一种潜在“蛋白酶”的形式存在,从而发挥类似消化酶的作用。在养殖 I 期和 II 期, L36 和 L54 组鱼的生理机能最优,一方面通过刺激机体内源性蛋白酶的分泌,另一方面在保证健康前提下,促使溶菌酶发挥抗菌、消化的双重功能,使鱼体消化机能进一步提升(张娟娟等, 2012)。关于消化酶活力的增强和分泌量的增加对鱼类消化吸收过程的促进作用已有大量报道(Das *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2012),并在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Lara-Flores *et al.*, 2003)、金头鲷(*Sparus aurata*) (Suzer *et al.*, 2008)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Sørensen *et al.*, 2011)等鱼类上得到证实。另一方面,在该溶菌酶添加水平下,吉富罗非鱼肝肠结构的健康发育也促进了鱼体对营养物质的消化吸收率,相似结论已在肉鸡、仔鸡、断奶仔猪等畜禽动物有过报道(程时军等, 2009; Humphrey *et al.*, 2002; Nyachoti *et al.*, 2012)。

4 小结

本实验条件下,添加 36、54 mg/kg 的饲用溶菌酶可以促进吉富罗非鱼肝脏和肠道健康发育;添加水平在 36~72 mg/kg 范围能够激发吉富罗非鱼胃、前肠、中肠蛋白酶及肝脏、前肠脂肪酶的分泌和活性提高;对于营养物质消化吸收方面,在饲养前期(I 期和 II 期), 36、54 mg/kg 添加水平主要促进了鱼体对粗蛋白的消化吸收率;中后期(III 期和 IV 期), 36~90 mg/kg 添加水平下,干物质、粗蛋白和粗脂肪的消化吸收率均有显著提高。总体而言, 36、54 mg/kg 添加水平具有最稳定的作用效果,其内在机制与调节内环境微生态平衡、促进鱼体肝肠结构发育和消化酶的分泌以及内、外源性酶之间的互作机制均有关系。

参 考 文 献

- Cataldi E, Cataudella S, Monaco G, *et al.* A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Fish Biology*, 1987, 30: 135-145
- Chen Y, Zhu X, Yang Y, *et al.* Effect of dietary lysozyme on growth, immune response, intestine microbiota, intestine morphology and resistance to *Aeromonas hydrophilia* in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition*,

- 2014, 20(3): 229–241
- Cheng SJ, Ma LB, Zhang W. Effect of dietary lysozyme on growth performance, nutrient apparent digestibility in broilers. *Feed China*, 2009(19): 32–34 [程时军, 马立保, 张伟. 溶菌酶对肉鸡生长性能与营养物质表观消化率的影响. *饲料广角*, 2009(19): 32–34]
- Cooper CA, Brundige DR, Reh WA, *et al.* Lysozyme transgenic goats' milk positively impacts intestinal cytokine expression and morphology. *Transgenic Research*, 2011, 20: 1235–1243
- Cortes VA, Busso D, Mardones P, *et al.* Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biological Reviews*, 2013, 88(4): 825–843
- Das P, Mandal S, Khan A, *et al.* Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish Journal of Zoology*, 2014, 38: 79–88
- Ding YN. Effects of recombinant lysozyme on growth performance and carcass traits in broilers. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(34): 16623–16626 [丁亦男. 人重组溶菌酶对肉鸡营养消化及肠道组织结构的影响. *安徽农业科学*, 2012, 40(34): 16623–16626]
- Farhangi M, Carter CG, Hardy RW, *et al.* Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research*, 2001, 32(1): 329–340
- Garcia HMP, Lozano MT, Elbano MT, *et al.* Development of the digestive tract of sea bass. Light and electron microscopic studies. *Anatomy and Embryology*, 2001, 204(1): 39–57
- Gu WZ, Zhang GJ. Effects of lysozyme on growth performance and immune organ index of meat duck. *Feed Industry Magazine*, 2008, 29(24): 46–48 [顾维智, 张国基. 溶菌酶对肉鸭生长性能和免疫器官指数的影响. *饲料工业*, 2008, 29(24): 46–48]
- Huang YZ, Lin X, Wang QX, *et al.* Effects of astragalus polysaccharide on structure of intestinal villus and intestinal immunocyte of tilapia. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 108–116 [黄玉章, 林旋, 王全溪, 等. 黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态结构及肠道免疫细胞的影响. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 108–116]
- Humphrey BD, Huang N, Klasing KC. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. *Nutrition*, 2002, 132: 1214–1218
- Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA, Guzman-Mendez BE, *et al.* Use of the bacteria, *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2003, 216: 193–201
- Li JS, Li JL, Wu TT. Effect of exogenous enzyme and citric acid on activities of endogenous digestive enzyme of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O.aureus*). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2006, 28(3): 97–101 [黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 外源酶和柠檬酸对奥尼罗非鱼内源消化酶活性的影响. *南京农业大学学报*, 2006, 28(3): 97–101]
- Li ZG, Qi BM, Wang QX, *et al.* Effect of cysteamine hydrochloride on intestinal histological structure of tilapia. *Feed Research*, 2007(9): 25–28 [李志刚, 祁保民, 王全溪, 等. 半胱胺对尼罗罗非鱼肠道黏膜结构的影响. *饲料研究*, 2007(9): 25–28]
- Liang Y. The experimental study of repairing rabbit radial bone defects with hydroxyapatite/chitosan-lysozyme biological materials. Master's Thesis of Tianjin Medical University, 2012 [梁彦. 羟基磷灰石壳聚糖载溶菌酶生物材料修复兔桡骨缺损的实验研究. *天津医科大学硕士研究生学位论文*, 2012]
- Lin CZ, Ma HT, Zou SX, *et al.* Effects of soybean isoflavone on the growth of the rat epithelial cell and absorption of glucose and amino acids of small intestine. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2005, 28(1): 71–75 [林成招, 马海田, 邹思湘, 等. 大豆异黄酮对大鼠小肠上皮细胞生长及葡萄糖和氨基酸吸收的影响. *南京农业大学学报*, 2005, 28(1): 71–75]
- Liu AJ, Leng XJ, Li XQ, *et al.* Effects of azomite on growth, intestinal structure and non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O.aureus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2009, 21(6): 1006–1011 [刘爱君, 冷向军, 李小勤, 等. 艾佐迈对奥尼罗非鱼生长、肠道结构和非特异性免疫的影响. *动物营养学报*, 2009, 21(6): 1006–1011]
- Liu JF. Experimental research on between the expression of β -catenin, Tcf-4, LZM and proliferation and differentiation of intestinal stem cell in intestinal mucosa during severe abdominal infection. Master's Thesis of First Military Medical University, 2007 [刘晋峰. 严重腹腔感染时肠黏膜 β 连环蛋白、T 细胞因子 4、溶菌酶与肠上皮干细胞增殖分化机制关系的实验研究. *第一军医大学硕士研究生学位论文*, 2007]
- Liu XH, Ye CX, Zheng LM, *et al.* Effect of dietary dextrin levels on growth, activities of digestive enzyme and blood biochemical indices of juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1359–1368 [刘襄河, 叶超霞, 郑丽勉, 等. 饲料糊精水平对暗纹东方鲀幼鱼生长、消化酶活性和血液生化指标的影响. *水产学报*, 2013, 37(9): 1359–1368]
- Marshall JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1998, 76(5): 479–484
- Nie GX, Wang JL, Zhu MW, *et al.* The influences of xylanase added in wheat basal diet on intestine chyme viscosity and the development of villi and microvilli of *Tilapia nilotica*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 54–61 [聂国兴, 王俊丽, 朱命炜, 等. 小麦基础饲料添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道食糜粘度和绒毛、微绒毛发育的影响. *水产学报*, 2007, 31(1): 54–61]

- Nilsen IW, Overbo K, Sandsdalen E, *et al.* Protein purification and gene isolation of chlamyisin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Letters*, 1999, 464(3): 153–158
- Nyachoti C, Kiarie E, Bhandari S, *et al.* Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement. *Animal Science*, 2012, 90: 252–260
- Ray AK, Ghosh K, Ringø E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18: 465–492
- Shi ZH, Xie MM, Peng SM, *et al.* Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30–37 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30–37]
- Sørensen M, Penn M, El-Mowafi A, *et al.* Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 145–152
- Suzer C, Coban D, Kamaci HO, *et al.* *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 2008, 280(1–4): 140–145
- Tang ZR, Deng H, Zhang XL, *et al.* Effects of orally administering the antimicrobial peptide buforin II on small intestinal mucosal membrane integrity, the expression of tight junction proteins and protective factors in weaned piglets challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 186(3–4): 177–185
- Tu YF, Song DJ. Fish gut tissue structure and its functional adaptability. *Jiangxi Feed*, 2004(4): 16–19 [涂永锋, 宋代军. 鱼类肠道组织结构及其功能适应性. *江西饲料*, 2004, (4): 16–19]
- Wang D, Ma W, She R, *et al.* Effects of swine gut antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in specific-pathogen-free chickens. *Poultry Science*, 2009, 88: 967–974
- Wang J, Bi X, Tian YM. Effects of special lysozyme on growth performance and development of immune organs of broilers. *Cereal and Feed Industry*, 2013(11): 51–54 [王军, 毕雪, 田玉民. 一种专用溶菌酶对肉仔鸡生长性能和免疫器官发育的影响. *粮食与饲料工业*, 2013(11): 51–54]
- Wang XK, Wang XS, Wang GY, *et al.* Effect of lysozyme on growth performance of weaned piglets. *Feed Industry Magazine*, 2008, 29(22): 31–33 [王晓可, 王晓硕, 王根彦, 等. 溶菌酶对断奶仔猪生长性能的影响. *饲料工业*, 2008, 29(22): 31–33]
- Xing SH, Hua XM, Zhu ZY, *et al.* Effect of dietary lysozyme levels on growth and anti-infection ability of *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 31(6): 731–736 [邢思华, 华雪铭, 朱站英, 等. 饲料中添加溶菌酶对草鱼生长性能和抗感染能力的影响. *华中农业大学学报*, 2013, 31(6): 731–736]
- Ye YT, Zhang Y, Zhang Y, *et al.* The effect of multi-enzyme premixes EA-II and aspergillus BA-I on activities of protease and diastase in intestine and hepatopancreas of carp. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1993, 8(1): 79–82 [叶元土, 张勇, 张宇, 等. 酶制剂EA-II和生物制剂BA-I对鲤肠道、肝胰脏的蛋白酶和淀粉酶活力的影响. *大连海洋大学学报*, 1993, 8(1): 79–82]
- Yokooji T, Hamura K, Matsuo H. Intestinal absorption of lysozyme, an egg-white allergen, in rats: Kinetics and effect of NSAIDs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 438(1): 61–65
- Yu CL, Chang Q, Lü YY. Effects of mannan oligosaccharide on the growth, intestinal development and non-specific immunity of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) postlarvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 53–59 [于朝磊, 常青, 吕云云. 甘露寡糖对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)稚鱼生长、肠道发育和非特异性免疫水平的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 53–59]
- Zhang JJ, Li XQ, Leng XJ, *et al.* Effects of supplemental protease on growth and intestinal tissue structure in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(6): 534–538 [张娟娟, 李小勤, 冷向军, 等. 外源蛋白酶对虹鳟生长和肠道组织结构的影响. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 534–538]
- Zhang L, Mai KS, Ai QH, *et al.* Effects of phytase and non-starch polysaccharide enzyme supplementation in diets on growth and digestive enzyme activity in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2007, 36(6): 923–928 [张璐, 麦康森, 艾庆辉, 等. 饲料中添加植酸酶和非淀粉多糖酶对大黄鱼生长和消化酶活性的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2007, 36(6): 923–928]
- Zhang SQ, Zhu ZK, Wang MC, *et al.* Effects of lysozyme on growth performance, metabolism and immune indices of broilers fed with corn-soybean basal diets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(4): 463–468 [张世卿, 朱忠珂, 王明成, 等. 玉米-豆粕日粮添加溶菌酶对肉仔鸡生长性能、代谢及免疫指标的影响. *动物营养学报*, 2008, 20(4): 463–468]

Effects of Dietary Lysozyme on the Digestive Tract Structure and Nutrient Digestibility of GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WANG Tan^{1,4}, ZHAO Jinxin⁴, LIU Donglai⁵, KONG Chun¹, HUA Xueming^{1,2,3}①,
WU Zhao¹, WANG Gang¹, FENG Yue^{1,2,3}, YANG Jingfeng^{1,2,3}, LIU Tao^{1,2,3}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;
4. Guangdong Haid Group Co., Ltd, Guangzhou 511400;
5. Zhonghan Town Fishery Station of Agricultural Comprehensive Service Center of Chaohu Anhui Province, Chaohu 238054)

Abstract To investigate the effects of lysozyme as a green feed additive on the development of the digestive tract and digestive utilization of nutrients in GIFT tilapia, a 60-day feeding trial was conducted with graded levels of dietary lysozyme (0, 18, 36, 54, 72, and 90 mg/kg, marked as L0, L18, L36, L54, L72, and L90 respectively). The results were as follows: The fish had a different feedback response on the digestive enzyme activity in the liver and the gastrointestinal tract among groups; the protease activity in the stomach, and the anterior and middle intestine of L36~L72 groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$); the lipase activity in the liver and the anterior intestine of the L54 and L72 groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$); and the amylase activity in the digestive tracts (anterior and middle intestine excluded) of the L72 and L90 groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). The intestinal morphology showed that the values of villus density, villus height, and villus width of different intestinal parts in L36~L72 groups were higher than those of the control group, while the muscular thickness of the anterior and distal intestine was reduced in dietary lysozyme groups. The thickness of the middle intestines of the L18, L36, and L90 groups was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$), and there was a firstly increased and then decrease tendency. The thickness of the middle intestines of L36~L72 groups were all higher than the control group with no significant difference ($P>0.05$). The goblet cell numbers were more in the L54 and L72 groups than in the control group ($P<0.05$). The liver morphology showed that the liver cells were more voluptuous and denser in the L36 and L54 groups than in the control group, while worse health condition was found in the L90 group. With regards to apparent nutrient digestibility, the crude protein digestibility was significantly higher in the L36 and L540 groups than in the control group in periods I and II ($P<0.05$), and in periods III and IV. The digestibility of dry matter, crude protein, and crude lipid were significantly higher in L36~L90 groups than in the control group ($P<0.05$). The results above indicated that 36 and 54 mg/kg dietary lysozyme had the most stable efficacy, which could improve GIFT tilapia dry matter, crude protein, and crude lipid digestibility by promoting liver and intestine development and digestive enzyme activity.

Key words GIFT tilapia; Lysozyme; Nutrient digestibility; Digestive enzyme; Digestive tract morphology

① Corresponding author: HUA Xueming, E-mail: xmhua@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180606001

http://www.yykxjz.cn/

迟潇, 夏斌, 朱琳, 陈碧鹃, 孙雪梅, 赵信国, 唐学玺, 曲克明. BDE-47、BDE-99、BDE-153和BDE-209对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲂的急性毒性效应. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 88-97

Chi X, Xia B, Zhu L, Chen BJ, Sun XM, Zhao XG, Tang XX, Qu KM. Acute toxicity of four polybrominated diphenyl ether congeners to marine organisms: *Chlorella pyrenoidosa*, *Daphnia magna*, and *Scophthalmus maximus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 88-97

BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲂的急性毒性效应*

迟 潇^{1,2} 夏 斌^{2,3} 朱 琳^{2,3} 陈碧鹃^{2,3①}
孙雪梅^{2,3} 赵信国² 唐学玺¹ 曲克明²



(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业资源可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237)

摘要 本研究选取 4 种多溴联苯醚(PBDEs)同系物(BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209)对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、大型溞(*Daphnia magna*)和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)进行急性毒性实验。结果显示, 4 种 PBDE 同系物对蛋白核小球藻的 96 h EC₅₀ 为 1.39 (BDE-47)、1.76 (BDE-99)、3.23 (BDE-153)和 378.62 μg/L (BDE-209), 安全浓度为 0.10 (BDE-47)、0.18(BDE-99)、0.27 (BDE-153)和 8.68 μg/L (BDE-209); 对大型溞的 96 h LC₅₀ 为 0.24 (BDE-47)、1.42 (BDE-99)、1.49(BDE-153)和 63.93 μg/L (BDE-209), 安全浓度为 0.03 (BDE-47)、0.82 (BDE-99)、0.94 (BDE-153)和 BDE-209 (5.09 μg/L); 对大菱鲂的 96 h LC₅₀ 为 5.46(BDE-47)、6.07 (BDE-99)、7.35(BDE-153)和 118.78 μg/L (BDE-209), 安全浓度为 2.02 (BDE-47)、2.01 (BDE-99)、2.17 (BDE-153)和 58.62 μg/L (BDE-209)。多溴联苯醚同系物毒性随着溴原子取代数的增加而减小(BDE-47>BDE-99>BDE-153>BDE-209)。虽然目前海水中 PBDEs 处于安全浓度, 但由于 PBDEs 的结构稳定性和环境持久性, 其对环境的影响不容忽视。

关键词 多溴联苯醚; 蛋白核小球藻; 大型溞; 大菱鲂; 急性毒性

中图分类号 X826 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0088-10

多溴联苯醚 (Polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 是一大类常用的溴代阻燃剂 (Brominated flame retardants, BFRs), 曾在全世界大量生产和使用, 被广泛用于电脑、电视机等家用电器以及纺织品等产

品中 (Hooper *et al*, 2000)。根据溴原子在苯环上的个数和位置不同, PBDEs 的同系物共有 209 种同系物 (刘汉霞等, 2005)。由于 PBDEs 代谢物的结构与多氯联苯、二氯二苯、三氯乙烷和甲状腺素等相似, 它与

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZD0202)和国家自然科学基金委-山东省联合基金项目(U1606404)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0202), and the NSFC-Shandong Joint Fund for Marine Ecology and Environmental Sciences (U1606404)]. 迟 潇, E-mail: ouctuddy@163.com

① 通讯作者: 陈碧鹃, 研究员, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-06-06, 收修改稿日期: 2018-07-13

多氯联苯可能有相似的毒性效应(Wang *et al.*, 2015)。PBDEs 并不是共价结合的高分子聚合物, 因此, 在各种产品使用、废弃、填埋、老化和降解等过程中, 容易从产品表面挥发脱离, 释放到环境中(Wang *et al.*, 2007; Hooper *et al.*, 2000), 并随着食物链(网)在生物体内累积(She *et al.*, 2007)。虽然许多国家已经禁止使用多溴联苯醚, 但近年来的研究结果显示, PBDEs 及其衍生物在世界各地的各类环境样品或生物体中均有检出, 且浓度呈逐年增长趋势(Huang *et al.*, 2013)。PBDEs 在生物体中可发生生物累积, 会对食物链中的高营养级产生一定的毒性效应(姜爽, 2011)。目前, 了解 PBDEs 的生物毒性主要包括免疫毒性、内分泌干扰作用、生殖和神经发育毒性以及致癌性等(Darnerud *et al.*, 2005)。近几年, PBDEs 作为一种新型的全球性环境污染物, 越来越受到国内外的关注(周明莹等, 2014)。

海洋微藻是海洋生物食物链(网)的基础, 进入微藻细胞内的PBDEs可以通过海洋食物链向高营养级生物体内转移, 最终进入人体产生危害。同时, PBDEs的毒性效应对藻细胞的生长繁殖产生影响, 导致食物链中高等生物的营养不足, 破坏海洋生态系统的平衡(李卓娜等, 2009), 且微藻本身具有易培养、繁殖快、毒性特征明显等特点, 能在短时间内得到污染物对其种群及世代的毒性响应的相关数据(张丽, 2015)。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)是1种广泛分布的单细胞藻类, 具有易培养、繁殖快、毒性特征明显等特点, 是实验室常用的藻类。大型溞(*Daphnia magna*)作为一种重要的水生浮游生物, 以藻类为食, 同时是鱼类的饵料之一, 是水生生态系统中物质循环和能量流动的重要环节(彭颖等, 2012), 污染物对大型溞的毒性能够反映其对水生态系统影响的程度, 且大型溞具有生活周期短、生长快、生殖量高、易培养和对水环境胁迫敏感等特点, 是进行水生毒理学的理想生物。近年来, 在大量水生物种体内检测到PBDEs及其衍生物残留, 其中包括海洋和淡水鱼类、鸟类及白鲸、环斑海豹、北极熊等海洋哺乳类生物(McKinney *et al.*, 2006; Routti *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010)。其中, 鱼类是海洋生态系统的重要传递者, 是PBDEs通过食物链进入人类的主要途径之一(Voorspoels *et al.*, 2007), 且研究发现, 近年来PBDEs在鱼类组织中的含量呈现增长趋势, 因此, 对鱼类体内PBDEs检测应引起广泛重视(赵静, 2015)。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)作为重要的海洋经济鱼类, 在我国北方沿海省市大面积养殖, 且其仔稚鱼具有对环境胁迫敏感、活动量小、耗氧低的特点(玮乔等, 2014)。因此, 本研究选择蛋

白核小球藻、大型溞和大菱鲂仔稚鱼作为PBDEs急性毒性的实验生物。

本文研究了 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)、2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99)、2,2',4,4',5,5'-六溴联苯醚(BDE-153)、2,2',3,3',4,4',5,5',6,6-十溴联苯醚(BDE-209)对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲂仔稚鱼的急性毒性效应, 获得 4 种 PBDEs 对蛋白核小球藻的半效应浓度(EC₅₀)和安全浓度(SC)以及 4 种 PBDEs 对大型溞和大菱鲂仔稚鱼半致死浓度(LC₅₀)和安全浓度, 比较不同溴代数 PBDEs 同系物对生物的毒性效应, 为 PBDEs 的海洋环境风险评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验生物及培养 蛋白核小球藻: 由中国水产科学研究院黄海水产研究所藻种室提供。培养方法: 海水取自青岛沿海, 黑暗沉淀后经 0.45 μm 滤膜过滤, 煮沸消毒, 冷却后用于配制 f/2 培养液(陈明耀, 1995), 温度为(20±0.2)°C, 光强为 4500 lx, 光暗比为 12 h : 12 h, 每天定时人工摇动 3 次, 并且随机调换三角瓶的位置使实验藻液光照均匀。

大型溞: 实验所选用大型溞为实验室培养的健康孤雌生殖 3 代以上的幼溞, 在实验前 24 h 选取怀卵的健康母溞放入实验液进行培养, 实验前 6 h 将母溞挑出, 在繁殖的幼溞中挑选健康的个体用于实验。培养方法: 温度为(23±1)°C, 光强为 3500 lx, 光暗比为 16 h : 8 h。喂食小球藻, 并定期更换培养液。

大菱鲂: 购于莱州市金益源水产公司, 体长为(3.0±0.5) cm, 体重为(0.4±0.1) g。驯养方法: 实验前在体积为 48 m³的鱼缸内暂养 3~5 d, 密度为 4 尾/m³, 采用流水式换水。每天换水 1 次。每天早上适量投喂饲料 1 次。

1.1.2 试剂 PBDEs: BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 均购于 AccuStandard 公司(纯度 GC/MS)。由于 PBDEs 微溶于水, 以二甲基亚砜(DMSO, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)为溶剂, 配制每种 PBDEs 的母液, 4°C 下保存备用。蛋白核小球藻毒性实验前, 用 f/2 培养基依次稀释成所需浓度的实验溶液, 各溶液实验浓度见表 1。

1.1.3 仪器 OLYMPUS BX51 正置荧光显微镜、智能二氧化碳光照培养箱(GZP-450)、M-50 抽滤器抽滤(滤膜直径为 5 cm, 孔径为 0.45 μm)、自动电热压力蒸汽灭菌锅(Zealway G154D)、电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9146A)。

1.2 实验方法

PBDEs 对小球藻的急性毒性实验方法：取 18 只 500 ml 的具塞三角瓶，分成 6 组，每组 3 个平行，各加入含有不同浓度 BDE-47 的 f/2 培养液 150 ml。分别根据 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对小球藻的毒性预实验得出浓度范围，在此范围内按照等对数间距设置 6 个浓度组。其中，零浓度处理中只含有 0.01 $\mu\text{g/ml}$ DMSO 的培养液，预实验结果证明，该浓度的 DMSO 对海洋微藻生长无抑制效应，具体浓度梯度见表 1。将初始浓度为 2×10^6 个/ml 且处于指数生长期的蛋白核小球藻接种到三角瓶的培养液中。每天定时人工摇动，并且随机调换三角瓶的位置，使实验藻液受光均匀。分别在 24、48、72 和 96 h 采集藻液，在显微镜下用血球计数板计数，计算藻细胞密度(个/ml)。

PBDEs 对大型溞的急性毒性实验方法：实验容器为 100 ml 的烧杯，根据 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大型溞的毒性预实验得出浓度范围，

在此范围内按照等对数间距设置 6 个浓度组，每组 3 个平行，其具体浓度梯度见表 1。挑选规格均匀的大型溞作为实验对象，每组放入幼溞 10 只。实验期间不喂食。实验开始后，于 24、48、72 和 96 h 记录其死亡数，并清除死亡个体。死亡判定：在解剖镜下观察，以心脏停止跳动确定为死亡。

PBDEs 对大菱鲂的急性毒性实验方法：实验容器为 1 L 的烧杯，根据 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大菱鲂的毒性预实验得出浓度范围，在此范围内按照等对数间距设置 6 个浓度组，每组 3 个平行，具体浓度梯度见表 1。挑选规格均匀的大菱鲂作为实验对象，每组放入实验动物 10 尾。实验期间不投饵，24 h 不间断微量充气。采用半静水式换水补药方法，每隔 24 h 换水 1 次，重新投药。实验开始后，于 24、48、72 和 96 h 记录其死亡数并清除死亡个体。死亡判定：死亡的大菱鲂鱼体弯曲，体色变淡，鳃盖张开(曲克明等, 2007)。

表 1 急性毒性实验中 4 种 PBDEs 同系物的浓度梯度

Tab.1 Concentration gradients of four PBDEs congeners in the acute toxicity test

PBDE 同系物 PBDE congeners	实验生物 Experimental organisms	浓度 Concentration ($\mu\text{g/L}$)				
BDE-47	小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	0.5	1	2	4	8
	大型溞 <i>D. magna</i>	0.25	0.5	1	2	4
	大菱鲂 <i>S. maximus</i>	2	4	8	16	32
BDE-99	小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	0.5	1	2	4	8
	大型溞 <i>D. magna</i>	0.25	0.5	1	2	4
	大菱鲂 <i>S. maximus</i>	2	4	8	16	32
BDE-153	小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	0.5	1	2	4	8
	大型溞 <i>D. magna</i>	0.25	0.5	1	2	4
	大菱鲂 <i>S. maximus</i>	2	4	8	16	32
BDE-209	小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	50	100	200	400	800
	大型溞 <i>D. magna</i>	20	40	80	160	320
	大菱鲂 <i>S. maximus</i>	60	120	240	480	960

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 软件对数据进行处理，计算各实验均值及标准偏差。采用概率单位法，利用 SPSS 19.0 得出受试生物死亡百分率的概率单位与实验浓度对数的回归方程及半数抑制浓度(EC_{50})和半致死浓度(LC_{50})及 95%置信区间。

安全浓度(SC)采用特伦堡(Turubell)的安全浓度计算公式(陈宇锋, 2016):

$$\text{SC} = 48 \text{ h LC}_{50} \times 0.3 / (24 \text{ h LC}_{50} / 48 \text{ h LC}_{50})^2$$

2 结果与讨论

2.1 多溴联苯醚对蛋白核小球藻的急性毒性

如图 1 所示，在多溴联苯醚对蛋白核小球藻的急性毒性实验中，随着浓度的提高，各实验组蛋白核小球藻的死亡率上升，二者呈正相关关系。在相同浓度下，蛋白核小球藻的抑制率随时间的增加而增加。在 BDE-47 高浓度组(4~8 $\mu\text{g/L}$)、BDE-99 高浓度组(4~8 $\mu\text{g/L}$)、BDE-153 高浓度组(8 $\mu\text{g/L}$)和 BDE-209

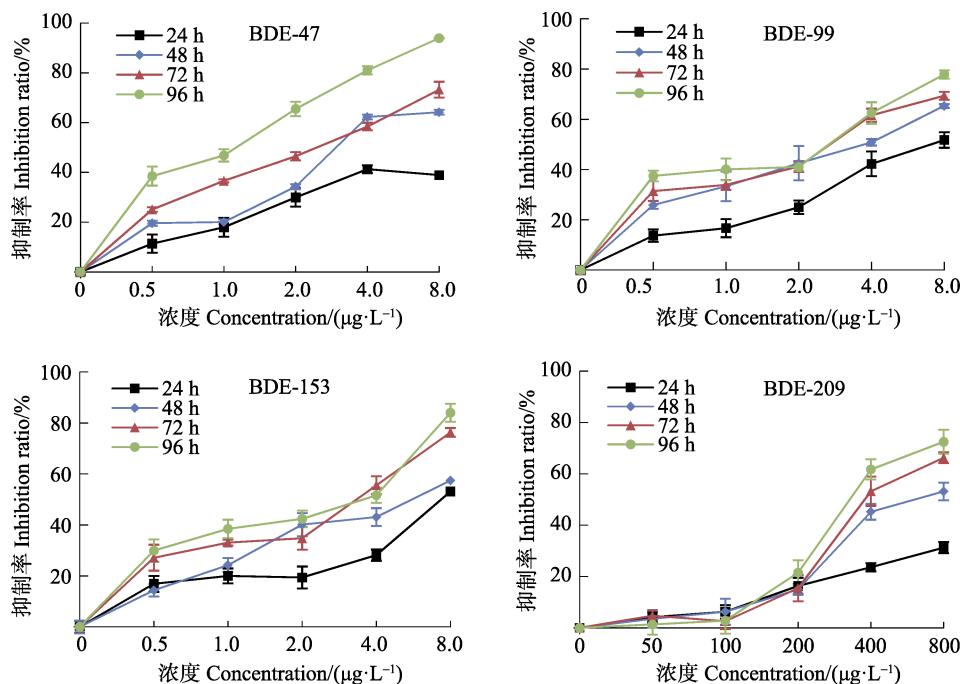


图 1 不同浓度的 BDE-47、BDE-99、BDE-153、BDE-209 对蛋白核小球藻的抑制率

Fig.1 Inhibition of *C. pyrenoidesa* with different concentrations of BDE-47, BDE-99, BDE-153 and BDE-209

高浓度组(800 $\mu\text{g}/\text{L}$), 短时间内(24 h)对小球藻的抑制率达到 40%以上; 在 BDE-47 低浓度组(0.5~2 $\mu\text{g}/\text{L}$)、BDE-99 低浓度组(0.5~2 $\mu\text{g}/\text{L}$)、BDE-153 低浓度组(0.5~2 $\mu\text{g}/\text{L}$)和 BDE-209 低浓度组(50~200 $\mu\text{g}/\text{L}$), 对小球藻的抑制率随时间的增加逐渐增大, 96 h 内抑制率分别达 60%、40%、40%和 20%, 且暴露时间越长, 抑制率越高, 二者呈正相关。

表 2 为不同溴联苯醚对蛋白核小球藻的 96 h 抑制率概率单位的回归方程, 在此基础上进行了回归方程的相关系数 R 和回归系数的显著性检验, 计算出 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 依次为 1.39、1.76、3.23 和 378.62 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。根据 Turubell 的安全浓度计算公式, 计算出 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻的安全浓度分别为 0.10、0.18、0.27 和 8.68 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

4 种同系物对蛋白核小球藻的毒性强度依次为 BDE-47>BDE-99>BDE-153>BDE-209。结果显示, 随着 Br 原子取代数量的增加, 毒性逐渐减小。Connell 等(1988)研究表明, 污染物对蛋白核小球藻的急性毒性效应取决于此类化学物质进入藻细胞的难易程度(或生物可利用性), 且 PBDEs 的辛醇水分配系数(Octanol-water partition coefficient, $\log K_{ow}$)与疏水性化学物质的生物富集因子(BAF)之间存在抛物线关系, 当 $\log K_{ow}>6.5$ 时, 生物对化学物质的吸收程度因超疏水化合物的空间位阻而降低。本研究所选用的

BDE-47、BDE-99 和 BDE-153 的 $\log K_{ow}$ 值分别为 6.81、7.32 和 7.90, 而 BDE-209 的 $\log K_{ow}$ 值(9.98)高于前 3 种同系物, 相应的空间位阻最大, 较大的空间位阻阻碍了 PBDEs 的摄入、富集、代谢和传递, 造成毒性下降(Haraguchi *et al*, 2009; Burreau *et al*, 1997; Boon *et al*, 2002)。堵锡华(2007)研究证明, 与 PBDEs 性质相似的多氯联苯(PCBs)空间位阻也随着分子中 Cl 原子的取代数增加而逐渐加大。本研究中, BDE-209 的 EC_{50} 比其他 3 种同系物要高出 2~3 个数量级, 对应的生物毒性也较小, 可能是由于 Br 原子取代数量较多, 空间位阻较大, 进而造成毒性较低。

根据《新化学物质危害评估准则(HJ/T154-2004)》中的评判标准(极高毒性物质: $\text{EC}_{50}<1 \text{ mg}/\text{L}$; 高毒性物质: $1 \text{ mg}/\text{L}<\text{EC}_{50}<10 \text{ mg}/\text{L}$; 中毒性物质: $10 \text{ mg}/\text{L}<\text{EC}_{50}<100 \text{ mg}/\text{L}$), 分析 4 种多溴联苯醚对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 分别为 1.39、1.76、3.23 和 378.62 $\mu\text{g}/\text{L}$, 可以判断 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 均是对蛋白核小球藻具有极高毒性的物质($\text{EC}_{50}<1 \text{ mg}/\text{L}$)。

综合其他相关研究成果可知, 海洋微藻对环境中的 PBDEs 相当敏感。Kallqvist 等(2006)通过研究发现, BDE-47 对中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)的 48 h EC_{50} 为 70 $\mu\text{g}/\text{L}$, 表明 BDE-47 对其有明显的抑制作用。李卓娜等(2009)通过 BDE-47 对 4 种微藻的急性毒性实验, 得出 BDE-47 对小球藻、牟氏角毛藻

表2 多溴联苯醚对蛋白核小球藻的96 h急性毒性实验结果
Tab.2 Acute toxicity test results of PBDEs on *C. pyrenoidosa* for 96 h

多溴联苯醚 PBDE	回归方程 Regression equation	相关系数 R	半效应浓度 96 h EC ₅₀ (μg/L)	95%置信区间 Confidence-interval (μg/L)
BDE-47	$Y=0.917X-0.131$	0.993	1.39	1.11-1.70
BDE-99	$Y=0.898X-0.219$	0.919	1.76	0.37-5.58
BDE-153	$Y=0.657X-0.334$	0.991	3.23	2.54-4.34
BDE-209	$Y=0.003X-1.709$	0.899	378.62	325.43-915.70

(*Chaetocerosmuelleri*)、中肋骨条藻、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)的96 h EC₅₀分别为0.79、1.52、1.99和2.25 μg/L,根据《新化学物质危害评估准则(HJ/T154-2004)》中的评判标准,判断其对2种微藻的毒性属于极高毒性。胡恒等(2015)研究了BDE-47对亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)的96 h EC₅₀为113.66 μg/L,对盐氏杜生藻(*Dunaliella salina*)的96 h EC₅₀为119.93 μg/L,根据《新化学物质危害评估准则(HJ/T154-2004)》中的评判标准,判断其对4种微藻的毒性属极高毒性。姜爽(2011)研究了2种PBDEs同系物BDE-47、BDE-209对4种微藻的毒性效应,BDE-47对青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi* Hansen)、赤潮异弯藻、金藻(*Chrysophyta*)的96 h EC₅₀为2、0.25、0.046、0.016 mg/L, BDE-209对4种微藻的96 h EC₅₀为30.29、18.1、1.8、0.79 mg/L,发现4种微藻对2种PBDEs同系物的胁迫存在较为明显的

差异。通过以上研究发现,PBDEs同系物对不同种类微藻的毒性效应不同,说明不同藻类的不同形态如细胞壁及细胞外胶被等(姜爽,2011),以及不同的生物特性都可能对多溴联苯醚的毒性效应产生影响。如不同于小球藻裸露的细胞体,青岛大扁藻的原生质体外有细胞壁保护,因此有较强的抗逆性。因此,需广泛研究多溴联苯醚对浮游类生物的毒性作用。

2.2 多溴联苯醚对大型溞的急性毒性

如图2所示,在多溴联苯醚对大型溞的毒性实验中,随着浓度的升高,各实验组大型溞的死亡率随之上升,二者呈正相关。由图2可知,BDE-47对大型溞的影响尤为明显,在BDE-47浓度组,短时间内(24 h)大型溞的抑制率达到40%左右。

表3为不同溴联苯醚对大型溞的96 h致死率概率单位的回归方程,在此基础上进行了回归方程的相关系数R和回归系数的显著性检验,据此计算出

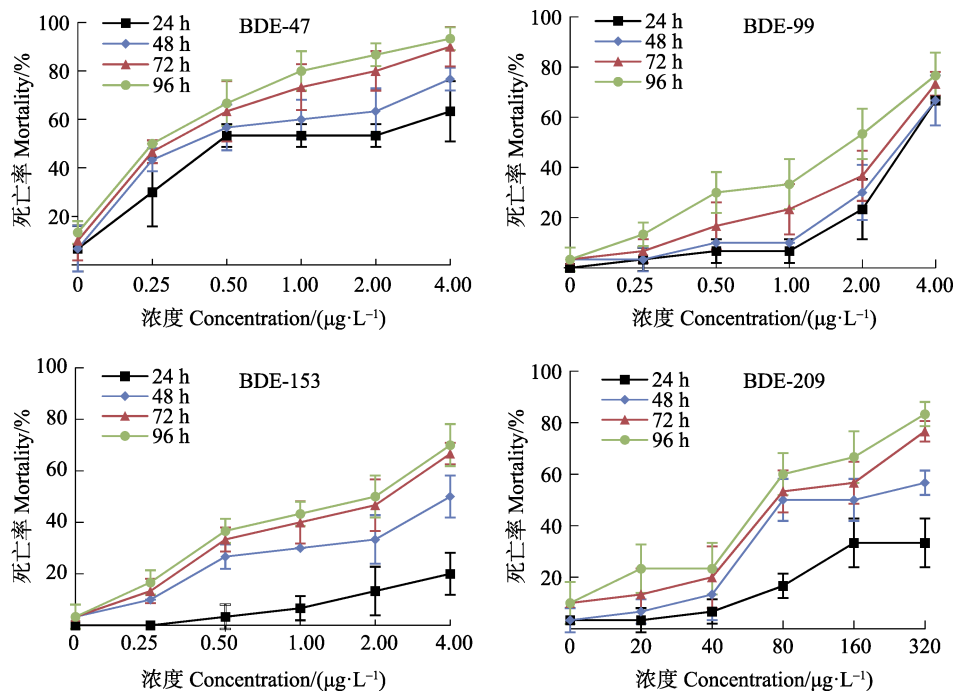


图2 不同浓度的BDE-47、BDE-99、BDE-153、BDE-209对大型溞的致死率

Fig.2 Mortality of *D. magna* treated with different concentrations of BDE-47, BDE-99, BDE-153 and BDE-209

表 3 多溴联苯醚对大型溞的 96 h 急性毒性实验结果
Tab.3 Acute toxicity test results of PBDEs on *D. magna* for 96 h

多溴联苯醚 PBDE	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>R</i>	半致死浓度 96 h LC ₅₀ (μg/L)	95%置信区间 Confidence-interval (μg/L)
BDE-47	$Y=2.150X+1.320$	0.998	0.24	0.01–0.52
BDE-99	$Y=2.313X-0.351$	0.987	1.42	0.61–4.65
BDE-153	$Y=1.747X-0.304$	0.967	1.49	0.57–17.23
BDE-209	$Y=2.221X-4.011$	0.990	63.93	11.68–143.73

BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大型溞的 96 h LC₅₀ 依次为 0.24、1.42、1.49 和 63.93 μg/L。并根据 Turubell 的安全浓度计算公式, 计算出 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大型溞的安全浓度分别为 0.03、0.82、0.94 和 5.07 μg/L。

4 种同系物对大型溞的毒性强度依次为 BDE-47>BDE-99>BDE-153>BDE-209。根据《新化学物质危害评估准则(HJ/T154-2004)》中的评判标准, 提出的评判标准, 分析 4 种多溴联苯醚对大型溞的 96 h EC₅₀ 分别 0.24、1.42、1.49 和 63.93 μg/L, 可以判断 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大型溞均属于极高毒性物质(EC₅₀<1 mg/L)。

综合其他相关研究的成果, 浮游动物对环境中的 PBDEs 也较为敏感。Breithlitz 等(2003)测得 BDE-47 对美丽猛水蚤(*Pietschmanni*)的 96 h LC₅₀ 为 72 μg/L; 徐风风(2013)通过研究 BDE-47 对太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)和日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus*)的

96 h LC₅₀ 为 47.85 μg/L; 张璟(2013)测得 BDE-47 对褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)的 24 h LC₅₀ 为 7.92 mg/L, 而 BDE-209 对其的 24 h LC₅₀ 则没有被检测出。通过以上相关研究结果结合本研究结果, 说明不同种类水生浮游生物(例如不同桡足类)对同种 PBDEs 同系物的敏感性差异较大; 同种水生浮游生物对不同种 PBDEs 同系物的敏感度也不同。但不同 PBDEs 同系物对水生浮游生物的急性毒性实验也较为缺乏。因此, 需广泛研究多溴联苯醚对浮游类生物的毒性作用。

2.3 多溴联苯醚对大菱鲃的急性毒性

如图 3 所示, 在多溴联苯醚对大菱鲃的毒性实验中, 随着浓度的提高, 各实验组大菱鲃的死亡率随之上升, 二者呈正相关。在 BDE-47 的高浓度组(16~32 μg/L)、BDE-99 的高浓度组(16~32 μg/L)和 BDE-153 的高浓度组(16~32 μg/L), 短时间内(24 h)

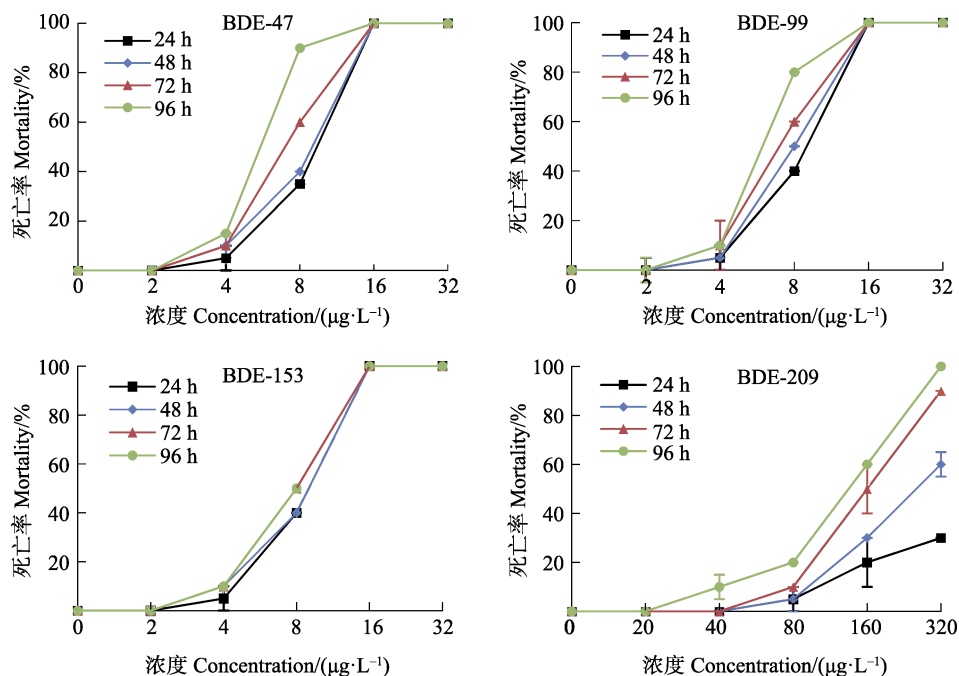


图 3 不同浓度的 BDE-47、BDE-99、BDE-153、BDE-209 对大菱鲃的致死率

Fig.3 Mortality of *S. maximus* treated with different concentrations of BDE-47, BDE-99, BDE-153, and BDE-209

大菱鲆的死亡率均达到 100%；在 BDE-47、BDE-99 和 BDE-153 中，低浓度组 2 $\mu\text{g/L}$ 以下时死亡率不变，2~4 $\mu\text{g/L}$ 死亡缓慢，中浓度组 4~16 $\mu\text{g/L}$ 死亡率急剧上升，高浓度组 16 $\mu\text{g/L}$ 及其以上全部死亡。在 BDE-47 低浓度组(2~4 $\mu\text{g/L}$)、BDE-99 低浓度组(2~4 $\mu\text{g/L}$)、BDE-153 低浓度组(2~4 $\mu\text{g/L}$)、BDE-209 低浓度组(60~240 $\mu\text{g/L}$)，大菱鲆的死亡率逐渐升高，96 h 内死亡率均达到 20%左右，且暴露时间越长，死亡率越高，二者呈正相关。

表 4 为不同多溴联苯醚对大菱鲆的抑制率概率单位的回归方程，在此基础上进行了回归方程的相关系数 R 和回归系数的显著性检验，据此计算出 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大菱鲆的 96 h EC_{50} 依次为 5.46、6.07、7.35 和 118.78 $\mu\text{g/L}$ 。并根据 Turubell 的安全浓度计算公式，计算出 BDE-47、

BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对大菱鲆的安全浓度分别为 2.02、2.01、2.17 和 58.62 $\mu\text{g/L}$ 。

4 种同系物对大菱鲆的毒性强度依次为 BDE-47>BDE-99>BDE-153>BDE-209。结果表明，高溴代同系物(BDE-209)比低溴代同系物(BDE-47、BDE-99 和 BDE-153)的 EC_{50} 要高出 2~3 个数量级，说明其中也存在辛醇水分配系数与不良效应之间的正相关关系。Kallqvist 等(2006)研究显示，PBDEs 的 $\log K_{ow}$ 与斑马鱼胚胎对其的吸收存在负相关，即生物可利用性越高的同系物的发育毒性也越强。

根据《新化学物质危害评估准则(HJ/T154-2004)》中的评判标准，分析 4 种多溴联苯醚对大菱鲆的 96 h EC_{50} 分别为 5.46、6.07、7.35 和 118.78 $\mu\text{g/L}$ ，可以判断 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 都属于极高毒性物质($\text{EC}_{50}<1 \text{ mg/L}$)。

表 4 多溴联苯醚对大菱鲆的 96 h 急性毒性实验结果
Tab.4 Acute toxicity test results of PBDEs on *S. maximus* for 96 h

多溴联苯醚 PBDE	回归方程 Regression equation	相关系数 R	半致死浓度 96 h LC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	95%置信区间 Confidence-interval ($\mu\text{g/L}$)
BDE-47	$Y=7.750X-5.710$	0.986	5.46	4.22~7.09
BDE-99	$Y=7.177X-5.621$	0.999	6.07	4.63~7.94
BDE-153	$Y=5.683X-4.924$	0.989	7.35	5.55~10.02
BDE-209	$Y=3.647X-7.556$	0.971	118.78	82.30~172.89

综合其他相关研究成果，鱼类对环境中的 PBDEs 也较为敏感。范灿鹏等(2011)研究了 BDE-47 对剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)的 96 h EC_{50} 为 2.75 mg/L ，根据国家环保局《水生生物监测手册》中的评判标准，BDE-47 对剑尾鱼具有高毒性；张雨鸣(2014)通过研究 BDE-47 对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的急性毒性，测得 BDE-47 对其的 24、48、96 h EC_{50} 分别为 70.01、18.83、9.44 mg/L ，根据国家环保局《水生生物监测手册》中的评判标准，BDE-47 对红鳍东方鲀具有高毒性。通过以上相关研究结果结合本研究结果，说明不同种类水生生物(例如鱼类)对同种 PBDEs 同系物的敏感性差异较大，且不同 PBDEs 同系物对水生生物的急性毒性实验也较为缺乏。因此，应进行更为广泛的 PBDEs 对鱼类的毒性效应。

2.4 多溴联苯醚的海洋环境风险评估

PBDEs 作为一种新型阻燃剂，并不是共价结合的高分子聚合物，没有化学键的束缚，因此容易发生挥发脱离，释放到环境中，其在水体、大气、底泥和生物体中都存在(Ueno *et al.*, 2004)。由于人类活动释放大气中的 PBDEs，以及含有 PBDEs 的污水，都

通过大气沉降和地表径流汇集到水体中。通过调查，不同地区水体中的 PBDEs 含量不同。例如，胶州湾养殖区水体中 PBDEs 含量范围为 ND~630.8 pg/L ，其中，低溴代 PBDEs(BDE-47 等)为主要污染物(周明莹等, 2010)；香港附近海域水体中 PBDEs 的含量约为 311~1187 pg/L (Breitholtz *et al.*, 2003)。北美安大略湖表面水体发现 PBDEs 的含量约为 4~13 pg/L ，其中，BDE-47 和 BDE-99 共占了总量的 90%以上；荷兰近海岸水体中的 BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 含量分别为 1、0.5、0.1 和 0.1~4 pg/L (姜爽, 2011)。由以上调查结果可知，目前，海水中 PBDEs 的环境浓度大约为 5 pg/L (Stapleton *et al.*, 2003)。4 种同系物对蛋白核小球藻、大型溞、大菱鲆的 96 h EC_{50} (LC_{50}) 处于 $\mu\text{g/L}$ 的级别，远高于实际海洋环境中 PBDEs 的含量。因此，实际海洋环境中 PBDEs 的含量不会对小球藻、大型溞和大菱鲆等海洋生物产生急性致死效应。数据显示，目前使用率较高的 PBDEs 是高溴代的 BDE-209，结合实验数据来看，其对 3 种生物的 EC_{50} (LC_{50}) 比其他 3 种同系物小 2~3 个数量级，虽然其危害较小，但高溴代的 BDE-209 释放到环境介质中，会通过化学降解、光降解、生物降解等方式脱溴

成为低溴联苯醚 BDE-47、BDE-99 等,会增加对环境的危害(Sun *et al.*, 2008)。且就 PBDEs 的化学特性而言,由于随着 PBDEs 中溴原子数量的增加,其蒸气压会呈线性下降,因此,低溴代同系物多处于气相当中,有较强的远距离迁移能力。综上所述,虽然使用率较高的高溴代同系物如 BDE-209 等毒性较小,但其产生的长久影响不容忽视。

3 结论

综上所述,随着 PBDEs 同系物的浓度升高, PBDEs 对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲂的急性毒性效应均逐渐增大,且毒性效应随 Br 原子取代数的增加而减小。4 种同系物对生物的急性毒性强度由高及低依次为 BDE-47>BDE-99>BDE-153>BDE-209。由于 PBDEs 具有一定的结构稳定性和环境持久性,其在水环境中积累并可能通过食物链(网)向高营养级传递,进而造成生物放大和更大毒害效应。因此, PBDEs 的环境与健康风险不容忽视,需要继续开展环境浓度 PBDEs 长期暴露对海洋生物的毒性效应及其在海洋食物链上的营养传递研究。

参 考 文 献

- Boon JP, Lewis WE, Tjoen-A-Choy MR, *et al.* Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(19): 4025–4032
- Breitholtz M, Wollenberger L. Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, 2003, 64(1): 85–96
- Bureau S, Axelman J, Broman D, *et al.* Dietary uptake in pike (*Esox lucius*) of some polychlorinated biphenyls, polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers administered in natural diet. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16(12): 2508–2513
- Chen MY. Biological food culture (specialized for marine aquaculture). Beijing: China Agriculture Press, 1995 [陈明耀. 生物饵料培养(海水养殖专用). 北京: 中国农业出版社, 1995]
- Chen YF. Acute toxicity of fenvalerate and ethofenprox on *Penaeus japonicus*. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(2): 126–131 [陈宇锋. 氰戊菊酯、醚菊酯对日本囊对虾的急性毒性. 渔业研究, 2016, 38(2): 126–131]
- Connell DW, Hawker DW. Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1988, 16(3): 242–257
- Darnerud PO, Wong J, Bergman A, *et al.* Common viral infection affects pentabrominated diphenyl ether (PBDE) distribution and metabolic and hormonal activities in mice. *Toxicology*, 2005, 210(2): 159–167
- Du XH. QSPR research of thermodynamic properties of polychlorinated biphenyl. *Journal of Chemical Industry and Engineering(China)*, 2007, 58(10): 2432–2436 [堵锡华. 多氯联苯热力学性质的构效关系. 化工学报, 2007, 58(10): 2432–2436]
- Fan CP, Wang Q, Liu XY, *et al.* Toxicity and effect of tetrabromodiphenyl ether upon the antioxidant defense system of swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(3): 642–648 [范灿鹏, 王奇, 刘昕宇, 等. 四溴联苯醚对剑尾鱼毒性及其抗氧化系统的影响. 环境科学学报, 2011, 31(3): 642–648]
- Haraguchi K, Hisamichi Y, Endo T. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogens in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(8): 2853–2859
- Hooper K, McDonald TA. The PBDEs: An emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(5): 387–392
- Hu H, Yu T, Meng FP. Acute toxicity of five brominated diphenyl ether congeners to marine bait-algae species: *Platymonas subcordiformis* and *Dunaliella salina*. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(5): 654–660 [胡恒, 于腾, 孟范平, 等. 5 种多溴联苯醚同系物对海洋饵料藻(亚心型扁藻和盐生杜氏藻)的急性毒性. 海洋环境科学, 2015, 34(5): 654–660]
- Huang K, Lin K, Guo J, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers in birds from Chongming Island, Yangtze Estuary, China: Insight into migratory behavior. *Chemosphere*, 2013, 91(10): 1416–1425
- Jiang S. The toxic effects of two kinds of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on four species of marine microalgae. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [姜爽. 两种多溴联苯醚对四种海洋微藻的毒性效应研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Kallqvist T, Grung M, Tollefsen KE. Chronic toxicity of 2,4,2',4'-tetrabromodiphenyl ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(6): 1657–1662
- Li ZN, Meng FP, Zhao SS, *et al.* Acute toxic effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on four marine microalgae. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(3): 435–439 [李卓娜, 孟范平, 赵顺顺, 等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)对 4 种海洋微藻的急性毒性. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 435–439]
- Liu HX, Zhang QH, Jiang GB, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers and its related environmental problems. *Progress in*

- Chemistry, 2005, 17(3): 554–562 [刘汉霞, 张庆华, 江桂斌, 等. 多溴联苯醚及其环境问题. 化学进展, 2005, 17(3): 554–562]
- McKinney MA, De Guise S, Martineau D, *et al.* Organohalogen contaminants and metabolites in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) liver from two Canadian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(5): 1246–1257
- Peng Y, Fan CP, Liao W, *et al.* Toxic effects of 2,2', 4,4'-tetrabrominated diphenyl ether on *Daphnia magna*. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(1): 79–86 [彭颖, 范灿鹏, 廖伟, 等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚对大型溞的毒性效应. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 79–86]
- Qu KM, Xu Y, Ma SS, *et al.* Acute toxic effects of nitrite and non-ion ammonia on turbot (*Scophthalmus maximus*) at different DO levels. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(4): 83–88 [曲克明, 徐勇, 马绍赛, 等. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 83–88]
- Routti H, Letcher RJ, Chu S, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated analogues in ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(10): 3494–3499
- She J, Holden A, Sharp M, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from the Pacific Northwest. *Chemosphere*, 2007, 67(9): S307–S317
- Stapleton HM, Baker JE. Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 45(2): 227–234
- Sun C, Zhao D, Chen C, *et al.* TiO₂-mediated photocatalytic debromination of decabromodiphenyl ether: Kinetics and intermediates. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(1): 157–162
- Ueno D, Kajiwara N, Tanaka H. Global pollution monitoring of polybrominated diphenyl ethers using skipjack tuna as a bioindicator. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(8): 2312–2316
- Voorspoels S, Covaci A, Neels H, *et al.* Dietary PBDE intake: A market-basket study in Belgium. *Environment International*, 2007, 33(1): 93–97
- Wang H, Tang X, Sha J, *et al.* The reproductive toxicity on the rotifer *Brachionus plicatilis* induced by BDE-47 and studies on the effective mechanism based on antioxidant defense system changes. *Chemosphere*, 2015, 135(3): 129–137
- Wang Y, Jiang G, Lam PK, *et al.* Polybrominated diphenyl ether in the East Asian environment: A critical review. *Environment International*, 2007, 33(7): 963–973
- Wei Q, Song XF, Gao CR, *et al.* Effects of stocking density on the growth and physiology of adult turbot and changes in water quality. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 76–82 [玮乔, 宋协法, 高淳仁, 等. 养殖密度对循环水系统中大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)生长的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 76–82]
- Xu FF. Toxic effects of BDE-47 on two marine Copepods. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [徐凤凤. 四溴联苯醚(BDE-47)对两种海洋桡足类的毒性影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Zhang J. The reproductive and developmental toxicity and mechanism of polybrominated diphenyl ethers in rotifer *Branchionus plicatilis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [张璟. 两种多溴联苯醚对褶皱臂尾轮虫生殖与发育毒性效应及其作用机制的初步研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Zhang K, Wan Y, Giesy JP, *et al.* Tissue concentrations of polybrominated compounds in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*): Origin, hepatic sequestration, and maternal transfer. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(15): 5781–5786
- Zhang L. The toxic effects of BDE-47 on two species of marine microalgae. Master's Thesis of First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, People's Republic of China, 2015 [张丽. 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)对两种海洋微藻的毒性效应研究. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2015]
- Zhang YM. Toxicity and effect on anti-oxidant enzymes activity of tetra-bromodiphenyl ether (BDE-47) in marine teleosts. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [张雨鸣. 四溴联苯醚(BDE-47)对海洋鱼类毒性和抗氧化酶活性的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Zhao J. Research progress on the investigation of toxic effects of polybrominated diphenyl ethers on fish. *Journal of Shanghai Second Polytechnic University*, 2015, 32(3): 177–184 [赵静. 多溴联苯醚对鱼类毒性效应的研究进展. 上海第二工业大学学报, 2015, 32(3): 177–184]
- Zhou MY, Qu KM, Leng KL, *et al.* Rapid determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 124–128 [周明莹, 曲克明, 冷凯良, 等. 沉积物中多溴联苯醚快速测定技术. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 124–128]
- Zhou MY, Zhang HZ, Xia B, *et al.* Residue levels and distribution character of PBDEs in aquaculture zone of Jiaozhou Bay. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(6): 884–888 [周明莹, 张惠珍, 夏斌, 等. 多溴联苯醚在胶州湾养殖水域含量水平与分布. 海洋环境科学, 2010, 29(6): 884–888]

Acute Toxicity of Four Polybrominated Diphenyl Ether Congeners to Marine Organisms: *Chlorella pyrenoidosa*, *Daphnia magna*, and *Scophthalmus maximus*

CHI Xiao^{1,2}, XIA Bin^{2,3}, ZHU Lin^{2,3}, CHEN Bijuan^{2,3}^①, SUN Xuemei^{2,3},
ZHAO Xinguo², TANG Xuexi¹, QU Keming²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fishery Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment in Shandong Province, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237)

Abstract In this study, we examined the biological toxicity of polybrominated diphenyl ethers, new persistent organic pollutants that can accumulate in organisms and have toxic effects in higher nutritional levels of the food chain. We performed acute toxicity tests using four polybrominated diphenyl ethers (PBDE) congeners, BDE-47, BDE-99, BDE-153, and BDE-209, on three species of marine organism, *Chlorella pyrenoidosa*, *Daphnia magna*, and *Scophthalmus maximus*. The 96 h concentrations for 50% maximal effect (96 h EC₅₀) and 50% lethality (96 h LC₅₀) were calculated for each species. The 96 h LC₅₀ and safe concentrations of the four PBDE homologs on *C. pyrenoidosa* were as follows: BDE-47, 1.39 and 0.10 μg/L; BDE-99, 1.76 and 0.18 μg/L; BDE-153, 3.23 and 0.27 μg/L; and BDE-209, 378.62 and 8.68 μg/L, respectively. The 96 h LC₅₀ and safe concentrations of the four PBDE homologs on *D. magna* were as follows: BDE-47, 0.24 and 0.03 μg/L; BDE-99, 1.42 and 0.82 μg/L; BDE-153, 1.49 and 0.94 μg/L; and BDE-209, 63.93 and 5.09 μg/L, respectively. The 96 h LC₅₀ and safe concentrations of the four PBDE homologs on *S. maximus* were as follows: BDE-47, 5.46 and 2.02 μg/L; BDE-99, 6.07 and 2.01 μg/L; BDE-153, 7.35 and 2.17 μg/L; and BDE-209, 118.78 and 58.62 μg/L, respectively. BDE-47 was shown to be particularly toxic to marine organisms, with toxicity decreasing according to the number of Br atoms in the congener molecule in the following order: BDE-47, BDE-99, BDE-153, and BDE-209. The PBDE content of global seawater is currently at the pg/L level, whereas the 96 h EC₅₀ and 96 h LC₅₀ of the four homologs was at the μg/L level, much higher than the PBDE content of the marine environment. However, owing to the structural stability and environmental persistence of PBDEs, their effects on environmental health cannot be ignored, and further studies will be conducted on their toxicity.

Key words Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs); *Chlorella pyrenoidosa*; *Daphnia magna*; *Scophthalmus maximus*; Acute toxicity

① Corresponding author: CHEN Bijuan, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180910001

http://www.yykxjz.cn/

李炎璐, 陈超, 陈建国, 翟介明. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 98–104

Li YL, Chen C, Chen JG, Zhai JM. DNA methylation analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and their F₁ hybrid. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 98–104

云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析*



李炎璐¹ 陈超^{1①} 陈建国¹ 翟介明²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

摘要 为探讨石斑鱼杂种优势形成过程中基因组 DNA 甲基化水平的变化, 本研究采用甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术检测云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 3 个群体的基因组 DNA 甲基化水平, 分析杂交 F₁ 与亲本基因组 DNA 甲基化水平的差异。结果显示, 云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼的基因组 DNA 属于甲基化程度较高的类群; 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率分别为 60.62%、59.38%和 55.78%, DNA 全甲基化率分别为 31.37%、30.67%和 29.27%, DNA 半甲基化率分别为 29.25%、28.71%和 26.51%; 杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率、全甲基化率和半甲基化率均低于双亲, 并存在极显著差异($P < 0.01$), 3 个群体的全甲基化率均大于半甲基化率。研究表明, 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ DNA 甲基化水平与杂种优势呈负相关, 杂交 F₁ DNA 甲基化水平的降低可能是形成快速生长等杂种优势的原因之一。

关键词 云纹石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 杂交 F₁; DNA 甲基化

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0098-07

杂种优势是不同基因型的亲本杂交产生的杂交子代在生长、成活、抗逆性和品质等方面均优于双亲的现象。表观遗传学是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体空间结构的调控和非编码 RNA 调控等。其中, DNA 甲基化是最重要的基因表观修饰方式之一, 尤其是胞嘧啶甲基化, 能够保持整个基因组 DNA

的稳定, 并调控特定组织基因的表达(Cheng *et al.*, 2008)。Cedar(1988)研究表明, 基因组 DNA 的甲基化水平及分布与基因表达率显著相关。

用于分析 DNA 甲基化的方法很多, 包括甲基化胞嘧啶分离分析技术、甲基化生物亲和检测技术、甲基化特异性扩增技术、甲基化测序检测分析技术、甲基化基因芯片及图谱检测技术和甲基化传感器检

* 山东省自然科学基金(ZR2015PC015)、中华人民共和国农业农村部农业国际合作交流项目-热带国家水产养殖科技创新合作(2130114181309)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项(20603022018023)共同资助 [This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong (ZR2015PC015), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, MARA, PRC·Science, Technology and Innovation in Aquaculture with Tropical Countries (2130114181309), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022018023)]. 李炎璐, E-mail: ysfriilianlu@126.com

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

收稿日期: 2018-09-10, 收修改稿日期: 2018-10-17

测分析技术等。其中, 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术因简便、高效、可靠等特点而得到广泛应用, 可在全基因组水平检测 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化程度, 能够准确分析不同基因组 DNA 甲基化差异。目前, 该技术已应用于水稻(*Oryza sativa*) (Xiong *et al.*, 1999)、猪(*Sus domesticus*) (蒋曹德, 2004)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (曹哲明等, 2007)、湿地松(*Pinus elliottii*, ♀)×加勒比松(*Pinus caribaea*, ♂)杂交 F₁ (李义良等, 2018)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, ♀)×虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*, ♂)杂交 F₁ (于涛等, 2010)、橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*, ♀)×荷那龙罗非鱼(*Oreochromis hornorum*, ♂)杂交 F₁ (尚慧文等, 2017)等多种生物以及杂交 F₁ 与亲本间的基因组 DNA 甲基化研究中。

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)和鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)均为暖温性礁栖鱼类, 云纹石斑鱼主要分布于日本、韩国以及我国的东海和南海, 具有个体大、生长快、肉质鲜美的特性(郭明兰等, 2008; 宋振鑫等, 2012); 鞍带石斑鱼主要分布于东南亚、大洋洲海域, 在我国主要分布于南海诸岛, 数量较少, 是石斑鱼类中体型最大的种类, 具有生长速度快、抗病性强、营养价值高等优点(Heemstra *et al.*, 1993; Sadovy *et al.*, 2000)。前期研究表明, 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ (张梦淇等, 2016)在生长、抗逆性(邵彦翔等, 2017)、营养成分(王林娜等, 2018)等方面均具有明显的杂种优势, 是值得开发的优良新品种。本研究运用 MSAP 技术检测云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 3 个群体的基因组 DNA 甲基化水平, 分析杂交 F₁ 与亲本基因组 DNA 甲基化水平的差异, 从而研究基因组 DNA 甲基化水平的变化与杂种优势的关系,

为从表观遗传学方面揭示石斑鱼杂种优势的形成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料均取自山东莱州明波水产有限公司, 选取云纹石斑鱼自交子代幼鱼群体、鞍带石斑鱼自交子代幼鱼群体以及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 幼鱼群体为样本, 每个群体分别随机选取 30 尾, 取尾鳍于无水乙醇中, -20℃ 保存备用。

1.2 DNA 提取

DNA 的提取采用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 参照试剂盒说明书进行操作。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量与浓度。

1.3 甲基化扩增敏感多态性(MSAP)分析

MSAP 分析参照 Xiong 等(1999)的方法, 并对实验条件进行优化。

1.3.1 双酶切及连接反应 对各基因组 DNA 分别用 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 进行双酶切反应。反应体系包括 200 ng 基因组 DNA、2 U *Hpa* II / *Msp* I、2 U *EcoR* I、2.5 μl 10×Buffer Tango, 加 ddH₂O 至 20 μl, 37℃ 水浴酶切 6 h, 再 65℃ 酶切变性 10 min。连接体系包括 5 μl 酶切产物、1 μl HM 接头、1 μl E 接头、5 U T₄ DNA 连接酶、4 μl 5×T₄ DNA 连接酶缓冲液, 加 ddH₂O 至 20 μl, 16℃ 连接过夜, 产物稀释 10 倍用于预扩增。实验所用接头与引物组合序列如表 1 所示。

表 1 所用接头和引物序列
Tab.1 Sequence of adapters and primers used for the MSAP analysis

项目 Items	<i>EcoR</i> I (5'~3')	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (5'~3')
接头 Adapters	EA ₁ : CTCGTAGACTGCGTACC EA ₂ : AATTGGTACGCAGTC	HMA ₁ : GATCATGAGTCCTGCT HMA ₂ : CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物 Pre-amplification primers	E ₀ : GACTGCGTACCAATTCA	HM ₀ : ATCATGAGTCCTGCTCGG
选扩增引物 Selective amplification primers	E ₁ : GACTGCGTACCAATTCAAC E ₂ : GACTGCGTACCAATTCAAG E ₃ : GACTGCGTACCAATTCACA E ₄ : GACTGCGTACCAATTCAC E ₅ : GACTGCGTACCAATTCACG E ₆ : GACTGCGTACCAATTCAGC E ₇ : GACTGCGTACCAATTCATC	HM ₁ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCG HM ₂ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGTA HM ₃ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA HM ₄ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT HM ₅ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC HM ₆ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC HM ₇ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT HM ₈ : ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC

1.3.2 预扩增反应 预扩增体系包括 2 μl 稀释连接产物、1 μl E_0 和 HM_0 预扩引物、0.5 μl *Taq* DNA Polymerase、2.5 μl 10 \times *Taq* Buffer、0.5 μl dNTPs, 加 ddH₂O 至 25 μl 。预扩增程序设置为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s, 共进行 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。产物稀释 20 倍用于选择性扩增反应。

1.3.3 选择性扩增反应 选择扩增体系包括 2 μl 稀释预扩增产物、1 μl HM_n 和 En 选扩引物、0.5 μl *Taq* DNA Polymerase、2.5 μl 10 \times *Taq* Buffer、0.5 μl dNTPs, 加 ddH₂O 至 25 μl 。选择性扩增反应设置为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 第 1 轮扩增参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 之后每轮循环, 温度递减 0.7 $^{\circ}\text{C}$, 共进行 12 个循环; 第 2 轮扩增参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 共进行 23 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4 产物检测 用 ABI Prism 377 型测序仪电泳检测片段大小, 通过 GENESCAN 软件进行数据收集和分析, 输出凝胶电泳图谱。

1.3.5 数据统计与分析 对同一样品 DNA 分别用 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 识别并切割 CCGG 序列, 扩增出的每条片段代表 1 个 CCGG 识别位点, 在 MSAP 图谱上, 每个样品分别对应有 H 和 M 两个泳道, 同一位点上有条带出现计为“1”, 无条带计为“0”, 根据扩增产物在 2 个泳道内有无的情况, 将甲基化模式分为 4 种类型。I 型, 2 个泳道均有带, 即“H、M”带型为“1、1”, 为去甲基化位点; II 型, H 泳道有带, M 泳道无带, 即带型为“1、0”, 为单链外甲基化, 代表半甲基化位点; III 型, H 泳道无带, M 泳道有带, 即带型为“0、1”, 为双链内甲基化, 为全甲基化位点; IV 型, H 和 M 泳道均没有带“0、0”, 为双链外甲基化的位点, IV 型位点不进行统计。统计 50~500 bp 的条带, 计算各群体的半甲基化率、全甲基化率和总甲基化率, 并利用 SPSS 19.0 进行方差分析。计算方法为: 半甲基化率(%)=半甲基化条带数(II)/总扩增条带数(I+II+III) \times 100%, 全甲基化率(%)=全甲基化条带数(III)/总扩增条带数(I+II+III) \times 100%, 总甲基化率(MSAP)(%)=甲基化总条带数(II+III)/总扩增条带数(I+II+III) \times 100%。

2 结果

2.1 引物组合

云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼(♀) \times 鞍带石斑鱼(♂)杂交 F_1 的基因组 DNA 经酶切、连接和预

扩增后, 由 7 个 E 和 8 个 HM 引物组成的引物组合进行选择扩增, 根据所有扩增结果, 筛选 8 对具有多态性好、重复性好、条带清晰的选扩引物组合(E_1HM_6 、 E_3HM_5 、 E_3HM_6 、 E_4HM_7 、 E_4HM_8 、 E_5HM_4 、 E_5HM_7 和 E_5HM_8)进行基因组 DNA 的 MSAP 分析。MSAP 扩增片段长度大多在 50~1000 bp, 主要集中在 50~500 bp, 大于 500 bp 条带很少, 因此, 本研究统计的数据为 50~500 bp 的条带。

2.2 3 个石斑鱼群体基因组 DNA 甲基化 MSAP 图谱

3 个石斑鱼群体基因组 DNA 的选扩产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 得到的扩增结果 MSAP 图谱如图 1 所示。结果显示, DNA 甲基化 MSAP 图谱形成了 3 种不同类型的条带, 包括“H、M”条带为“1、1”的 I 型、“H、M”条带为“1、0”的 II 型和“H、M”条带为“0、1”的 III 型 3 种甲基化类型。

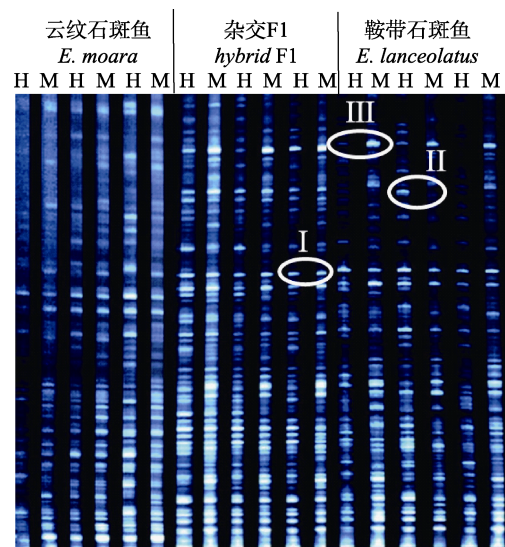


图 1 3 个石斑鱼群体基因组 DNA 甲基化 MSAP 图谱(E_4HM_7)

Fig.1 Genomic DNA methylation MSAP profiles of *E.moara*, *E.lanceolatus* and the hybrid F_1 (E_4HM_7)

H: *EcoR* I / *Hpa* II 双酶切; M: *EcoR* I / *Msp* I 双酶切;
I: 去甲基化位点; II: 半甲基化位点; III: 全甲基化位点
H: *EcoR* I / *Hpa* II double digestion;
M: *EcoR* I / *Msp* I double digestion;
I: Unmethylated sites; II: Hemi-methylated sites;
III: Fully methylated sites

2.3 3 个石斑鱼群体间 DNA 甲基化水平差异分析

8 对引物对 3 个石斑鱼群体的扩增结果如表 2 所示。云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交 F_1 3 个群体扩增的总位点数分别为 5840、5781 和 6246, 其中, 总甲

甲基化位点分别为 3540、3433 和 3484。云纹石斑鱼群体的总甲基化率为 60.62%，其中，全甲基化率为 31.37%，半甲基化率为 29.25%；鞍带石斑鱼群体的总甲基化率为 59.38%，其中，全甲基化率为 30.67%，半甲基化率为 28.71%；杂交 F₁ 群体的总甲基化率为 55.78%，其中，全甲基化率为 29.27%，半甲基化率为 26.51%。结果显示，杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率、全甲基化率和半甲基化率均低于亲本，杂交 F₁ 与双亲之间的 DNA 甲基化水平均存在极显著差异 ($P < 0.01$)，3 个群体的全甲基化率均大于半甲基化率。

3 讨论

3.1 DNA 甲基化水平的差异性

不同物种间甲基化水平存在一定的差异，可能是由于在真核生物的不同物种中，DNA 甲基化的调控作用所占的重要性不同而造成的，同时，不同物种相同组织以及同一物种不同组织的甲基化水平均存在差异。近年来，随着 MSAP 技术的不断发展，MSAP 在动植物研究中得到了广泛应用。研究表明，棉花

(*Gossypium* spp.) 的总甲基化水平为 20%~27.1% (赵云雷, 2007)；哺乳动物如猪不同组织的总甲基化水平为 40.6% 和 44.8%，羊 (*Caprinae*) 为 45.7% (唐韶青等, 2006)；禽类如鸡 (*Gallus domesticus*) 不同组织的总甲基化水平为 44.6% 和 47.9%，鸭为 40.7% (唐韶青等, 2006)；在水产动物中，总甲基化水平大多集中在 20%~50% 之间，如栉孔扇贝为 32.79%、虾夷扇贝为 24.13% (于涛等, 2010)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 为 26% (Jiang *et al.*, 2013)、刺参 (*Apostichopus japonicus*) 为 23.36%~56.52% (郭婷婷等, 2013; Zhao *et al.*, 2015; 左之良等, 2016)、背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 为 35.5%~56% (曹哲明等, 2009)、文蛤 (*Meretrix meretrix*) 为 26.7%~30.0% (朱东丽, 2011)、尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 为 23.74% (朱华平等, 2013)。在周莹等 (2017) 的报道中，棕点石斑鱼 (*E. fuscoguttatus*) 和鞍带石斑鱼的总甲基化率分别为 57.18% 和 63.16%。在本研究中，云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼总甲基化率分别为 60.62% 和 59.38%，与周莹等 (2017) 的研究结果较为接近，由此推测，石斑鱼群体基因组 DNA 属于甲基化程度较高的类群。

表 2 3 个石斑鱼群体间 DNA 甲基化水平比较

Tab.2 Comparison of DNA methylation levels of *E.moara*, *E.lanceolatus* and the hybrid F₁

石斑鱼 Grouper	总位点 Total sites	非甲基化位点数 及百分率 Non-methylation sites and percentages	甲基化位点 Methylated sites		
			总甲基化位点及百分率 Total methylation sites and percentages	全甲基化位点及百分率 Full methylation sites and percentages	半甲基化位点及百分率 Hemi-methylation sites and percentages
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	5840	2300(39.38%)	3540(60.62%)	1832(31.37%)	1708(29.25%)
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	5781	2348(40.62%)	3433(59.38%)	1773(30.67%)	1660(28.71%)
杂交 F ₁ Hybrid F ₁	6246	2762(44.22%)	3484(55.78%)	1828(29.27%)	1656(26.51%)

3.2 DNA 甲基化水平差异与杂种优势的相关性分析

研究表明，DNA 甲基化可以调控基因的表达 (Cedar, 1988)，在杂交组合中，亲本基因组 DNA 甲基化模式经过复杂的调整，将大部分模式稳定遗传给后代外，基因组 DNA 的甲基化和去甲基化水平均发生了改变。

近年来，学者多倾向于从基因组 DNA 甲基化的角度分析杂交后代与亲本的差异，以及这种差异与杂种优势的关系。洪舟等 (2009) 研究发现，杉木杂交 F₁ 的甲基化水平呈显著减少的趋势，并且与树高、胸径和材积性状的杂种优势均呈显著负相关；重庆山地黄牛 (*Bos taurus*) 杂交 F₁ 群体的总甲基化水平、全甲基

化水平和半甲基化水平均低于双亲，并且甲基化水平与胸围、体重等杂种优势率存在显著负相关 (万亚琴, 2008)；栉孔扇贝 (♀) × 虾夷扇贝 (♂) 杂交 F₁ 的总甲基化率降低，显示 DNA 甲基化率与生长相关的性状呈负相关 (吴彪等, 2012)；橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼以及杂交 F₁ 莫荷罗非鱼“广福 1 号”的总甲基化率分别为 32.21%、38.03% 和 29.77%，杂交 F₁ 的甲基化水平低于双亲，杂交 F₁ 幼鱼在生长速度、耐盐胁迫方面具有明显的杂种优势 (刘玉姣, 2014; 李茜茜, 2016)，研究推测，杂交 F₁ 基因组 DNA 甲基化水平的降低和甲基化模式的重调可能与耐盐胁迫的杂种优势有关 (尚慧文等, 2017)；棕点石斑鱼 (♀) × 鞍带石斑鱼 (♂) 杂交 F₁ 是具有抗病力强、生长速度快等较强杂

种优势的杂交后代,棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率分别为 57.18%、63.16%和 54.76%,杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率低于双亲,推测甲基化水平的降低有利于杂种优势的形成(周莹等, 2017)。

本研究中,云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 的 DNA 总甲基化率(55.78%)低于云纹石斑鱼(60.62%)和鞍带石斑鱼(59.38%),杂交 F₁ 的 DNA 全甲基化率和半甲基化率也均显著低于双亲,这与上述研究发现的杂交 F₁ 的甲基化水平降低的结果相一致。3 个石斑鱼群体基因组 DNA 的全甲基化位点数均多于半甲基化位点数,与哺乳动物基因组全甲基化位点较多、半甲基化位点较少的研究结果相一致(唐韶青等, 2006)。杂交 F₁ (张梦淇等, 2016)在生长、抗逆性(邵彦翔等, 2017)、营养成分(王林娜等, 2018)等方面均具有明显的杂种优势,结合本研究,杂交 F₁ 的 DNA 甲基化水平与杂种优势呈负相关,推测杂交 F₁ 基因组 DNA 甲基化水平的降低、甲基化模式的改变和重新调整可能是形成快速生长等杂种优势的诸多原因之一。

上述动植物 DNA 甲基化水平与杂种优势均呈负相关关系,研究证明了杂种优势的形成与杂交 F₁ 基因组 DNA 总甲基化水平的降低有关。一般来说, DNA 甲基化与基因表达呈负相关关系,杂交后代基因组 DNA 甲基化水平降低,激活了许多沉默基因,基因的表达活性增强(Tsaftaris *et al.*, 1997),使杂交后代表现出杂种优势。关于特异基因的甲基化水平与杂种优势之间的关系,以及这些 DNA 甲基化位点的遗传方式、对基因结构及功能的作用和调控机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Cao ZM, Ding WD, Yu JH, *et al.* Differences in methylated loci among different grass carp individuals from one pair of parents. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(6): 1083–1088 [曹哲明, 丁炜东, 俞菊华, 等. 草鱼全同胞鱼苗不同个体甲基化位点的差异. *动物学报*, 2007, 53(6): 1083–1088]
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Science*, 2009, 18(6): 2011–2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011–2016]
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 1988, 53(1): 3–4
- Cheng XD, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective. *Structure*, 2008, 16(3): 341–350
- Guo ML, Su YQ, Chen XF, *et al.* Comparative studies on morphology of *Epinephelus moara* and *E. Bruneus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(6): 106–114 [郭明兰, 苏永全, 陈晓峰, 等. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼形态比较研究. *海洋学报*, 2008, 30(6): 106–114]
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome and methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 77–82 [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. *海洋与湖泊*, 2013, 44(1): 77–82]
- Heemstra PC, Randall JE. Groupers of the world. *FAO Fisheries Synopsis*, 1993, 16 (125): 130–132
- Hong Z, Shi JS, Zheng RH, *et al.* Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation in Chinese fir(*Cunninghamia lanceolata*) intraspecific hybrids. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(3): 591–598 [洪舟, 施季森, 郑仁华, 等. 杉木亲本自交系及其杂交种 DNA 甲基化和表观遗传变异. *分子植物育种*, 2009, 7(3): 591–598]
- Jiang CD. Relationship between DNA methylation and hybrid performances and pig genetic diversity analysis. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2004 [蒋曹德. 猪 DNA 甲基化与杂种表现的关系及遗传多样性分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2004]
- Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al.* Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes and Genomics*, 2013, 35(5): 641–647
- Li QQ. Cloning and expression characterization analysis of *AQP1* and *mTOR* genes related to salt-alkaline tolerance in tilapia. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [李茜茜. 罗非鱼耐盐碱相关基因 *AQP1*、*mTOR* 克隆和表达特征分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Li YL, Zhao FC, Zhong SY, *et al.* Epigenetic analysis and DNA methylation in *Pinus elliottii*×*Pinus caribaea* and their parents. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(1): 76–81 [李义良, 赵奋成, 钟岁英, 等. 湿加松及亲本 DNA 甲基化和表观遗传分析. *分子植物育种*, 2018, 16(1): 76–81]
- Liu YJ. A study on salt tolerance related genes of *Oreochromis mossambicus*, *O. hornorum* and their hybrids. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [刘玉姣. 橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其正反交子代耐盐相关基因的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Sadovy Y, Cornish AS. Reef fishes of Hong Kong. Hong Kong: Hong Kong University Press, 2000
- Shang HW, Liu ZG, Zhu HP, *et al.* Analysis of DNA methylation difference between “Mohe” hybrid tilapia and its parents. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1699–1709 [尚慧文, 刘志刚, 朱华平, 等. 莫荷罗非鱼“广福 1 号”与其亲本间 DNA 甲基化的差异分析. *水产学报*, 2017, 41(11): 1699–1709]
- 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]
- Song ZX, Chen C, Zhai JM, *et al.* Embryonic development and morphological characteristics of larval, juvenile and young kelp bass, *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 26–34 [宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼胚胎发育及仔、稚、幼鱼形态观察. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 26–34]
- Sun Q, Wu L, Ni Z, *et al.* Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Science*, 2004, 166: 651–657 Tang SQ, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(4): 507–510 [唐韶青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 507–510]
- Tsaftaris AS, Kafka M, Polidoros A, *et al.* Epigenetic changes in maize DNA and heterosis. *Cimmyt*, 1997, 112
- Wan YQ. Study on the relationship between DNA methylation and heterosis in beef cattle. Master's Thesis of Southwest University, 2008 [万亚琴. DNA 甲基化与肉牛杂种优势关系的初步研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Wang LN, Tian YS, Tang J, *et al.* Analysis and quality evaluation of nutritional components in the muscle of *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus* and hybrid “Yunlong grouper”. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1085–1093 [王林娜, 田永胜, 唐江, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及杂交“云龙斑”肌肉营养成分分析及品质评价. *水产学报*, 2018, 42(7): 1085–1093]
- Wu B, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Comparison of early growth and DNA methylation between hybridized families and self-fertilize families of two scallops. *Marine Sciences*, 2012, 36(2): 1–6 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种扇贝杂交和自交家系早期生长及甲基化的比较分析. *海洋科学*, 2012, 36(2): 1–6]
- Xiong LZ, Xu CC, Sanghai MA, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(3): 439–446
- Yu T, Yang AG, Wu B, *et al.* Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1335–1342 [于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析. *水产学报*, 2010, 34(9): 1335–1342]
- Zhang MQ, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of salinity on the hatching of the fertilized eggs of *Epinephelus moara*(♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) and the observation of the morphological development of larvae, juvenile and young fish. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 82–89 [张梦淇, 陈超, 李炎璐, 等. 盐度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂)受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 82–89]
- Zhao Y, Chen MY, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 26–32
- Zhao YL. Analysis of DNA methylation and differential gene expression between cotton hybrids and their parents. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2007 [赵云雷. 棉花杂交种与亲本间 DNA 胞嘧啶甲基化及其基因差异表达分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2007]
- Zhou Y, Han YL, Luo J, *et al.* Methylation-sensitive amplification polymorphism analysis of genomic DNA methylation on *Epinephelus lanceolatus*, *Epinephelus fuscoguttatus* and their hybrid generation. *Journal of Hainan University (Natural Science)*, 2017, 35(2): 145–151 [周莹, 韩玉龙, 骆剑, 等. 鞍带石斑鱼、棕点石斑鱼及其杂交子代 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *海南大学学报(自然科学版)*, 2017, 35(2): 145–151]
- Zhu DL. The analysis of molecular markers and DNA methylation in the different strains of *Meretrix meretrix*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [朱东丽. 文蛤(*Meretrix meretrix*)不同壳色花纹品系的分子标记及 DNA 甲基化分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhu HP, Lu MX, Huang ZH, *et al.* Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1460–1467 [朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响. *水产学报*, 2013, 37(10): 1460–1467]
- Zuo ZL, Tan J, Wu B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white *A. japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 93–100 [左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 93–100]

DNA Methylation Analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and Their F₁ Hybrid

LI Yanlu¹, CHEN Chao^{1①}, CHEN Jianguo¹, ZHAI Jieming²

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai 261400)

Abstract DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications. It is vital to maintain the stability of the whole genome and regulate the expression of tissue-specific genes. Methylation level and distribution throughout genomic DNA are significantly correlated with gene expression rate. In order to investigate the changes of genomic DNA methylation level associated with heterosis of *Epinephelus* spp., we applied methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technology to detect the genomic DNA methylation levels of longtooth grouper (*E. moara*), giant grouper (*E. lanceolatus*), and their F₁ hybrid [*E. moara* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)], and we analyzed the difference of DNA methylation level between the F₁ hybrid and parents. The results showed that overall genomic DNA methylation was higher in *E. moara* and *E. lanceolatus*. The total methylation rates of *E. moara*, *E. lanceolatus*, and the F₁ hybrid were 60.62%, 59.38%, and 55.78%, respectively. The rates of fully methylated sites were 31.37%, 30.67%, and 29.27%, respectively, and the hemi-methylation rates were 29.25%, 28.71%, and 26.51%, respectively. The total methylation rate, the full methylation rate, and the hemi-methylation rate of DNA of the F₁ hybrid were all significantly lower ($P < 0.01$) than that of either parent. The full methylation rates were all higher than the hemi-methylation rates of *E. moara*, *E. lanceolatus*, and the F₁ hybrid. The study also showed that the DNA methylation level of the F₁ hybrid is negatively correlated with heterosis. Moreover, reduced DNA methylation level of the F₁ hybrid may be one of the reasons for the heterosis phenomena such as rapid growth. In general, DNA methylation is negatively correlated with gene expression. The DNA methylation level of the hybrid was lower than either parent, allowing otherwise silenced genes to be activated, enhancing gene expression activity, and resulting in the hybrid progeny exhibiting heterosis. The relationship between methylation level of specific genes and heterosis, the genetic pattern of these DNA methylation sites, the effect on gene structure and function, and the regulatory mechanism require further study.

Key words *Epinephelus moara*; *Epinephelus lanceolatus*; Hybrid F₁; DNA methylation

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180831002

http://www.yykxjz.cn/

李晶晶, 陈丽梅, 耿绪云, 董学旺, 孙金生. 中华绒螯蟹野生群体和不同水系人工选育群体的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 105-113

Li JJ, Chen LM, Geng XY, Dong XW, Sun JS. Genetic diversity analysis of wild and cultured population of *Eriocheir sinensis* from different water systems. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 105-113

中华绒螯蟹野生群体和不同水系人工选育群体的遗传多样性分析*



李晶晶^{1,2} 陈丽梅³ 耿绪云² 董学旺² 孙金生^{1①}

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津 300387; 2. 天津市水生动物疫病预防控制中心 天津 300221;
3. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384)

摘要 本研究利用 10 个微卫星分子标记分析了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 3 个不同水系人工选育群体(“长江 1 号”、“光合 1 号”和七里海河蟹)和 1 个海河流域自然群体的遗传多样性和遗传分化水平。结果显示, 10 个位点在 4 个群体中的等位基因数(N)为 3~17, 平均等位基因数为 8.5~9.7, 平均期望杂合度为 0.720~0.745, 平均观测杂合度为 0.566~0.661, 平均多态信息含量为 0.687~0.716, 近交系数(F_{is})范围为-0.080~0.827。在 40 个群体-位点组合中, 有 13 个群体-位点组合显著偏离哈迪-温伯格平衡($P < 0.05$)。遗传多样性分析结果显示, 与海河自然群体相比, 3 个人工选育群体遗传多样性水平略有降低, 但仍保持在较高水平, 具有较大的选育潜力。遗传分化分析结果显示, 群体间遗传分化指数(F_{st})范围为 0.015~0.075, 遗传相似度为 0.7702~0.9401, 遗传距离为 0.0617~0.2611。基于 Nei's 遗传距离构建了群体 UPGMA 系统进化树, 自然群体和“光合 1 号”聚为一支, 而七里海河蟹群体单独聚为一支。综上所述, 4 个中华绒螯蟹群体间的遗传分化水平较低, 群体遗传多样性较高。本研究将为中华绒螯蟹选育繁育和种质资源利用与管理等提供理论基础。

关键词 中华绒螯蟹; 遗传多样性; 遗传分化; 微卫星

中图分类号 S968.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0105-09

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 自然分布于我国长江、黄河、辽河和瓯江等河川及附近地区(Ma *et al.*, 2007; 肖起珍等, 2017)。自 20 世纪 70 年代末突破人工育苗技术难关, 经过 30 余年的发展, 中华绒螯蟹养殖遍布我国辽宁、河北、天津、山东、江

苏、浙江等沿海省份及广大内陆地区, 成为我国重要经济甲壳动物之一(李晶晶等, 2016)。随着中华绒螯蟹养殖产业的规模化发展, 过度捕捞野生自然资源, 无序引进异地苗种, 大大加剧了中华绒螯蟹种质退化和混杂, 已成为当前养殖生产发展的瓶颈(王成辉等,

* 天津市财政基金项目(七里海优质河蟹繁养技术示范应用)、天津市水产局科研推广项目(J2013-21)、天津市水产产业技术体系专项(ITFRS2017002)、天津市种业科技重大专项(15ZXZYNC00050)和天津市自然科学基金项目(16JCQJNC09500)共同资助 [This work was supported by Project of Tianjin Financial Funds (Demonstration and Application of Qililai Crab Breeding and Culture Technology), Research and Extension Project of Tianjin Aquatic Products Bureau (J2013-21), Tianjin Aquaculture Research System (ITFRS2017002), Major Project for Tianjin Seed Technology (15ZXZYNC00050), and Tianjin Natural Science Foundation (16JCQJNC09500)]. 李晶晶, E-mail: jingjingli206@163.com

① 通讯作者: 孙金生, 研究员, E-mail: jinshsun@163.com

收稿日期: 2018-08-31, 收修改稿日期: 2018-10-20

2002)。研究和保护中华绒螯蟹种质资源,对河蟹养殖业的持续稳定发展具有重要意义。近年来,科研院所和养殖企业积极开展中华绒螯蟹良种人工选育工作,已培育出5个国家级新品种(“光合1号”、“长江1号”、“长江2号”、“江海21”和“诺亚1号”)。

天津市地处环渤海中部,具有得天独厚的海、淡水养殖环境条件,中华绒螯蟹养殖历史悠久。辖区内的七里海是我国重要的古海岸与古湿地保护区,独特的生态环境创出了味道鲜美、膏满黄肥的天津市特色农产品品牌——七里海河蟹(朱广奇,2012;杜红梅,2014)。然而,50年代末期,天津海河入海口处建设了防潮闸,切断了中华绒螯蟹的生殖洄游通道,导致本地区自然资源逐年减少。2000年,天津市水生动物疫病预防控制中心采集七里海核心区中华绒螯蟹野生群体作为选育基础群体,利用群体选育技术连续选育6代,获得快速生长的七里海河蟹群体。

在传统人工选育中,由于长期不引进外来亲本,经过连续多代选育获得的新品种或新品系,其种群遗传多样性是否有所降低,有待进行科学评价。一般认为,遗传多样性的大小及其群体遗传结构跟一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力密切相关(李博,2000)。因此,分析检测育种群体的遗传特征,对于中华绒螯蟹选育效果预测、种质资源保护以及养殖产业健康持续发展意义重大。

目前,天津地区中华绒螯蟹资源主要有人工选育群体“七里海河蟹”、“长江1号”、“光合1号”以及海河流域自然群体。本研究利用10个多态性丰富的微卫星分子标记,比较分析了天津地区4个中华绒螯蟹群体的遗传多样性和群体间的遗传分化,旨在为开展中华绒螯蟹选育和种质资源利用与管理等工作提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验共采集4个中华绒螯蟹群体,每个群体样

品数量为60只(表1)。七里海河蟹群体于2012年采自天津市蟹源水产养殖有限公司,为天津地区海河流域人工选育的第6代成蟹群体;自然群体于2012年采自海河入海口,是天津地区海河流域野生成蟹种群;“长江1号”和“光合1号”于2013年分别采自江苏省淡水水产研究所和盘锦光合蟹业有限公司,为长江水系和辽河水系人工选育幼蟹群体。采集的4个中华绒螯蟹群体同属奇数年群体。分别剪取每只中华绒螯蟹步足肌肉组织,置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2 微卫星引物

本研究选用了10个已发表的多态性较高的微卫星位点,用于中华绒螯蟹4个群体的遗传分析(Li *et al.*, 2016)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及特征见表2。

1.3 DNA提取与检测

采用天根生化科技有限公司的海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒,提取中华绒螯蟹肌肉组织的总DNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,紫外分光光度法测定DNA浓度和纯度。用灭菌双蒸水将DNA稀释成 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 后, -20°C 保存备用。

1.4 PCR反应体系、反应程序及扩增产物的检测

PCR反应在 $10\ \mu\text{l}$ 体系中进行,包括 $1\times\text{buffer}$ 、 $2\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{MgCl}_2$ 、 $0.2\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{dNTP}$ 、 $1\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 引物、 $0.25\ \text{U}\ \text{Taq}\ \text{DNA}$ 聚合酶(TaKaRa)和 $100\ \text{ng}\ \text{DNA}$ 模板。PCR程序: 94°C 预变性3 min; 94°C 变性1 min,退火1 min, 72°C 延伸1 min,35个循环;最后 72°C 延伸5 min。PCR扩增产物用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银法染色, $10\ \text{bp}\ \text{DNA}\ \text{ladder}$ (Invitrogen)作为Marker检测扩增片段大小。

1.5 数据分析

使用Microsatellite Analyser (MSA)软件计算各微卫星位点在4个群体中的等位基因数(N)、期望杂合度(H_e)和观测杂合度(H_o) (Dieringer *et al.*, 2003)。用

表1 中华绒螯蟹群体的取样时间、地点、群体类型和样本数
Tab.1 The sampling time, location, population and size of *E. sinensis*

群体 Population	采样地点 Sampling location	采样时间 Sampling time	群体类型 Type of population	样本数 Sample size
七里海河蟹 Qilihai crab	天津 Tianjin	2012	选育群体 Breeding population	60
自然群体 Wild population	天津 Tianjin	2012	自然群体 Wild population	60
长江1号 Yangtze No. 1	江苏 Jiangsu	2013	选育群体 Breeding population	60
光合1号 Guanghe No. 1	辽宁 Liaoning	2013	选育群体 Breeding population	60

表 2 中华绒螯蟹 10 个微卫星位点特征
Tab.2 Characteristics of ten microsatellite loci of *E. sinensis*

位点名称 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 T_a (°C)
SSR352	FL572494	(GT) ₁₀	F: CACTCGGTACAAACATCAC R: AATGGGTATGGATTTAGTGT	53
SSR1240	FG982578	(TACA) ₁₁	F: ATTGTAGCCATACCAGCAT R: ACAAATCTTACAACACTACGGC	52
SSR1300	FL575122	(TG) ₁₀	F: CCCTTGTTGATTGCCCTA R: GTCACGAAGAAGCACCTC	55
SSR1053	FL572054	(CA) ₁₀	F: CTACACCAAGACCTCCTCGT R: GGCTGGTTTGTGGGTAAG	57
SSR1289	FL574500	(TTA) ₁₃	F: ACCTTGTTGGATACCAGCAT R: TTCCCTTCAACCATACATAA	50
SSR271	FG359821	(TG) ₁₂	F: GCTTCTCACCCGTGATGT R: CTCCTCCTTTGCTTTCTTTA	54
SSR1482	FL576108	(TG) ₇	F: ACTATCCCTGCCTCACTACCG R: GAACAAACATTACCGTCACTCG	57
SSR1171	FG357452	(AC) ₈ N ₅ (TC) ₆	F: CAATCTGCCCTAATCTGTCTGTAA R: GGGAAAGGTAGGAGGATAAGTGA	57
SSR1126	FG359126	(AAGG) ₁₂	F: TGTCCAGTCTCCCATCAA R: TGGTATGGTCGCTAATCTC	54
SSR709	FL574505	(GCA) ₇	F: GCAGCCACAACCAGCAGAAG R: CTCGCCATGCAGGATCACC	60

公式 $N_e = 1 / \sum x_i^2$ 计算有效等位基因数 (N_e) (x_i 表示每个位点第 i 个等位基因的频率) (Kimura *et al.*, 1964)。FSTAT 2.9.3 软件(Goudet, 2001)计算每个群体每个位点的近交系数(F_{is})。应用 PIC-CALC 0.6 软件计算多态信息含量(PIC)。Genepop 4.2 软件检测 10 个位点的哈迪-温伯格平衡(HWE)偏离情况, 并比较分析各位点在群体间等位基因频率(Raymond *et al.*, 1995)。MSA 软件计算 F_{st} 值(Weir *et al.*, 1984)。应用 SPAGeDi 1.1 软件(Hardy *et al.*, 2002)对无效等位基因进行校正, Bonferroni 检验对显著性水平的多点检测进行校正(Rice, 1989)。使用 Popgene Version 1.31 计算 Nei's 遗传距离(Nei, 1978), 利用 MEGA 5 软件构建群体间 UPGMA 系统进化树(Tamura *et al.*, 2011)。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点多态性及群体遗传多样性

应用选取的 10 对微卫星引物, 对 4 个中华绒螯蟹群体共 240 个个体进行扩增分析, 遗传多样性参数见表 3。等位基因数范围为 3~17, 其中, 位点 SSR352 和 SSR1289 等位基因数最多($N=17$), 分别出现在七里海河蟹群体和自然群体中。七里海河蟹、自然群体、

“长江 1 号”和“光合 1 号”的平均等位基因数分别为 9.4、9.7、9.0 和 8.5; 平均观测杂合度为 0.658、0.661、0.566 和 0.618; 平均期望杂合度为 0.720、0.745、0.732 和 0.720; 平均多态信息含量为 0.691、0.716、0.694 和 0.687, 所有参数的最高平均值均出现在自然群体中。所有位点的平均观测杂合度均略低于平均期望杂合度, 4 个群体均具有较高的平均期望杂合度(>0.5)和平均多态信息含量(>0.5)。

10 个位点在 4 个群体中的近交系数 F_{is} 范围为 -0.080~0.827。在七里海河蟹群体中, 位点 SSR1240、SSR1053 和 SSR709 的近交系数为负值; 在“光合 1 号”群体中, 位点 SSR1289、SSR1126 和 SSR709 的近交系数为负值; 在自然群体中, 位点 SSR709 的近交系数为负值, 其余均为正值。经过 Bonferroni 校正后, 10 个位点在 4 个群体中, 有 13 个显著偏离哈迪-温伯格平衡($P < 0.05$)。其中, “长江 1 号”中偏离 HWE 平衡的位点最多, 为 5 个, 七里海河蟹和海河自然群体均有 3 个位点出现显著偏离, “光合 1 号”偏离位点最少, 为 2 个。

2.2 群体间的遗传分化

4 个群体间的 F_{st} 值存在显著差异($P < 0.05$), 结果

表 3 4 个中华绒螯蟹群体 10 个微卫星位点的遗传多样性
 Tab.3 Genetic diversities of ten microsatellite loci in four populations of *E. sinensis*

位点名称 Locus	统计指标 Statistical index	七里海河蟹 Qilihai crab	自然群体 Wild population	长江 1 号 Yangtze No. 1	光合 1 号 Guanghe No. 1
SSR352	$N(N_e)$	17(11.4)	15(8.7)	13(9.1)	12(9.4)
	H_o	0.768	0.849	0.793	0.897
	H_e	0.920	0.894	0.898	0.901
	F_{is}	0.162*	0.046*	0.113*	0.001
	PIC	0.906	0.874	0.880	0.884
SSR1240	$N(N_e)$	13(8.0)	11(7.5)	8(5.6)	9(4.6)
	H_o	0.883	0.795	0.548	0.692
	H_e	0.883	0.878	0.833	0.797
	F_{is}	-0.005	0.089	0.338*	0.124
	PIC	0.863	0.853	0.797	0.761
SSR1300	$N(N_e)$	5(2.5)	4(1.8)	7(3.2)	5(3.2)
	H_o	0.519	0.327	0.610	0.593
	H_e	0.602	0.443	0.691	0.697
	F_{is}	0.134	0.259	0.113	0.145
	PIC	0.560	0.409	0.649	0.646
SSR1053	$N(N_e)$	6(3.2)	7(3.6)	9(3.8)	6(3.3)
	H_o	0.741	0.661	0.717	0.661
	H_e	0.697	0.725	0.739	0.704
	F_{is}	-0.069	0.085	0.027	0.057
	PIC	0.637	0.676	0.691	0.651
SSR1289	$N(N_e)$	12(7.0)	17(9.1)	14(6.2)	13(6.5)
	H_o	0.782	0.847	0.818	0.898
	H_e	0.864	0.898	0.847	0.853
	F_{is}	0.092	0.052	0.030	-0.058
	PIC	0.842	0.881	0.825	0.828
SSR271	$N(N_e)$	6(3.8)	8(5.9)	8(5.8)	7(5.6)
	H_o	0.615	0.720	0.719	0.692
	H_e	0.744	0.847	0.836	0.829
	F_{is}	0.168	0.143	0.136	0.162
	PIC	0.699	0.809	0.805	0.798
SSR1482	$N(N_e)$	7(2.1)	6(3.4)	3(2.1)	5(2.3)
	H_o	0.250	0.917	0.091	0.296
	H_e	0.518	0.712	0.525	0.567
	F_{is}	0.516*	0.294*	0.827*	0.476*
	PIC	0.475	0.657	0.411	0.490
SSR1171	$N(N_e)$	8(6.7)	11(7.7)	11(5.4)	12(7.2)
	H_o	0.900	0.340	0.492	0.400
	H_e	0.860	0.879	0.821	0.869
	F_{is}	0.053*	0.612*	0.400*	0.539*
	PIC	0.832	0.857	0.790	0.847
SSR1126	$N(N_e)$	14(9.3)	11(9.7)	11(5.2)	12(8.5)
	H_o	0.883	0.892	0.737	0.950
	H_e	0.900	0.909	0.815	0.890
	F_{is}	0.014	0.012	0.092	-0.072
	PIC	0.883	0.887	0.790	0.871
SSR709	$N(N_e)$	6(1.3)	7(1.3)	6(1.5)	4(1.1)
	H_o	0.233	0.267	0.138	0.100
	H_e	0.217	0.261	0.319	0.097
	F_{is}	-0.080	-0.026	0.567*	-0.032
	PIC	0.208	0.252	0.300	0.095
平均 Average	$N(N_e)$	9.4(5.53)	9.7(5.87)	9.0(4.79)	8.5(5.17)
	H_o	0.658	0.661	0.566	0.618
	H_e	0.720	0.745	0.732	0.720
	PIC	0.691	0.716	0.694	0.687

注: *表示显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)

Note: * means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$)

如表 4 所示, 七里海河蟹群体与“长江 1 号”群体、“光合 1 号”群体的遗传分化程度较高, 达到中等水平($F_{st} > 0.05$); 七里海河蟹群体与自然群体、自然群体与“长江 1 号”群体、自然群体与“光合 1 号”群体、“长江 1 号”群体与“光合 1 号”群体的遗传分化程度处于低水平($F_{st} < 0.05$)。分别对每个位点进行等位基因频率的群体间两两比较, 60 个比较中有 28 个差异

显著($P < 0.05$) (表 6)。

4 个群体两两间的遗传相似度范围为 0.7702~0.9401, 遗传距离(D_c)范围为 0.0617~0.2611, 群体间遗传距离越大的遗传相似性越低(表 5)。基于 Nei's 遗传距离构建的群体 UPGMA 系统进化树显示, 自然群体与“光合 1 号”聚为一支后, 再与“长江 1 号”聚为一支, 而七里海河蟹群体单独聚为一支(图 1)。

表 4 群体两两间的遗传分化指数(F_{st})
Tab.4 Genetic differentiation index (F_{st}) between any two populations

群体 Population	七里海河蟹 Qilihai crab	自然群体 Wild population	长江 1 号 Yangtze No. 1	光合 1 号 Guanghe No. 1
七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
自然群体 Wild population	0.048*	—	—	—
长江 1 号 Yangtze No. 1	0.075*	0.033*	—	—
光合 1 号 Guanghe No. 1	0.066*	0.015*	0.038*	—

注: *表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Note: * means significant difference ($P < 0.05$). The same as below

表 5 4 个中华绒螯蟹群体的遗传相似度和遗传距离
Tab.5 Nei's genetic identity and genetic distance of the four populations of *E. sinensis*

群体 Population	七里海河蟹 Qilihai crab	自然群体 Wild population	长江 1 号 Yangtze No. 1	光合 1 号 Guanghe No. 1
七里海河蟹 Qilihai crab	—	0.8484	0.7702	0.8021
自然群体 Wild population	0.1643	—	0.8846	0.9401
长江 1 号 Yangtze No. 1	0.2611	0.1227	—	0.8780
光合 1 号 Guanghe No. 1	0.2205	0.0617	0.1301	—

注: 对角线以上为遗传相似度; 对角线以下为遗传距离

Note: The diagonal above was genetic identity; the diagonal below was genetic distance

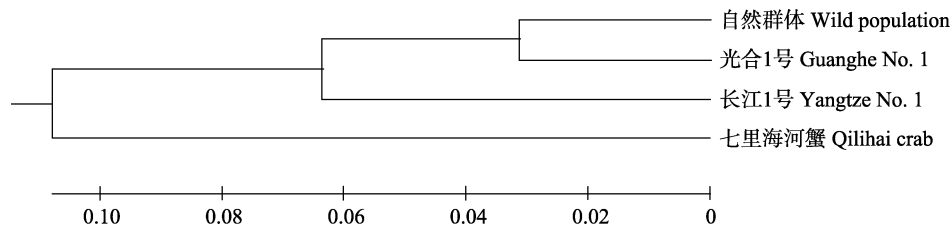


图 1 基于 Nei's (1978) 遗传距离构建的 4 个中华绒螯蟹群体的 UPGMA 系统进化树

Fig.1 UPGMA dendrogram of four populations of *E. sinensis* based on Nei's (1978) genetic distance

表 6 10 个微卫星位点等位基因频率的群体间两两比较
Tab.6 Comparisons of allele frequency in ten microsatellite loci between any two populations

位点名称 Locus	群体 Population	七里海河蟹 Qilihai crab	自然群体 Wild population	长江 1 号 Yangtze No. 1	光合 1 号 Guanghe No. 1
SSR352	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.135	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.252	0.000*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.053	0.054	0.010	—
SSR1240	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.499	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.010	0.046	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.008*	0.115	0.573	—

续表 6

位点名称 Locus	群体 Population	七里海河蟹 Qilihai crab	自然群体 Wild population	长江 1 号 Yangtze No. 1	光合 1 号 Guanghe No. 1
SSR1300	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.059	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.329	0.006*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.016	0.000*	0.174	—
SSR1053	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.000*	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.642	0.000*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.000*	0.076	0.000*	—
SSR1126	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.040	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.000*	0.000*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.000*	0.002*	0.000*	—
SSR1289	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.215	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.176	0.003*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.220	0.052	0.032	—
SSR271	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.038	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.005*	0.820	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.000*	0.392	0.542	—
SSR1482	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.000*	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.000*	0.002*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.000*	0.000*	0.344	—
SSR1171	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.000*	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.000*	0.000*	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.000*	0.000*	0.000*	—
SSR709	七里海河蟹 Qilihai crab	—	—	—	—
	自然群体 Wild population	0.804	—	—	—
	长江 1 号 Yangtze No. 1	0.197	0.201	—	—
	光合 1 号 Guanghe No. 1	0.275	0.260	0.006*	—

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹自然和人工选育群体遗传多样性

遗传多样性是生物多样性的基础,对物种的生存、繁衍和进化至关重要(张荣良等, 2016)。一个遗传多样性丰富的种群,往往具有较高的适应能力、生存能力和进化潜能,在育种和遗传改良上也更具有潜力,所以对遗传多样性的准确评估是生物多样性保护和可持续利用的基础和前提。人工选择育种就是在保持选育群体具有一定遗传多样性的基础上,筛选获得具有目标性状的选育新品种或新品系(张荣良等,

2016)。大量相关研究表明,养殖群体因人工选择作用和瓶颈效应等原因,其遗传多样性往往低于未经选育的野生群体。张辉等(2010)和王军等(2018)分别应用 mtDNA 控制区序列和微卫星标记分析了中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 养殖群体与野生群体,显示野生群体的基因多样性高于养殖群体。肖起珍等(2017)利用 29 对 SSR 标记对中华绒螯蟹长江水系野生和人工繁育大眼幼体的遗传多样性进行了分析,发现野生群体的平均等位基因数、平均有效等位基因数和平均期望杂合度均高于人工繁育群体,香农信息指数体现的群体遗传多样性野生群体也高于人工繁

育群体。在鱼类群体遗传研究中也获得了相似的结果, 曾庆凯等(2017)应用 SSR 标记比较翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)湖南洞庭湖野生群体和广东、安徽养殖群体的遗传多样性, 分析结果也显示野生群体的遗传多样性略高于养殖群体。

遗传多样性主要用多态信息含量(PIC)和杂合度(H)来评估。其中, 多态信息含量用于评价标志基因(或标志序列)的多态性大小。PIC>0.5 的位点为高多态性位点, 0.25<PIC<0.5 的位点为中等多态性位点(Botstein *et al*, 1980)。本研究中, 10 个位点在 4 个群体中的平均多态信息含量为 0.691、0.716、0.694 和 0.687, 均具有较高的多态性。群体多态性常用杂合度来描述, 杂合度越高, 说明群体的遗传多样性越丰富(Qin *et al*, 2013), 当杂合度处在 0.5~0.8 之间, 即可认为该群体具有较高的多样性(Takezaki *et al*, 1996)。一般来说, 对于衡量群体遗传多样性的大小, 期望杂合度比观测杂合度更准确(Nei, 1987)。在本研究的 4 个群体中, 平均观测杂合度和平均期望杂合度的范围分别是 0.566~0.661 和 0.720~0.745; 各群体的平均观测杂合度数值均低于平均期望杂合度; 10 个位点平均期望杂合度的最高值出现在自然群体中(0.745)。上述结果说明, 4 个群体都表现出了较高的遗传多样性; 10 个微卫星位点大多存在杂合子缺失现象; 不同水系 3 个人工选育群体较自然群体遗传多样性略有下降, 但仍保持在较高水平上。

由于连续多代人工选育, 不引进外来亲本, 所以造成了中华绒螯蟹选育群体遗传多样性的降低, 使选育群体的遗传多样性略低于自然群体。但在人工选育过程中, 增加有效繁育亲本数量, 严格控制选育群体的近交衰退, 在一定程度上保证了选育群体的遗传稳定性, 使中华绒螯蟹的人工选育群体经过累代繁殖多年之后, 依然保持着较高的遗传多样性。

3.2 群体间的遗传分化

遗传分化指数(F_{st})和遗传距离(D_c)是衡量群体间遗传差异的重要参数。Wright (1978)认为, F_{st} 值在 0~0.05 之间, 说明群体间的遗传差异很小; F_{st} 值在 0.05~0.15 之间, 说明群体间发生了中等水平的遗传分化; 在 0.15~0.25 之间, 说明群体间存在较大的遗传差异; 当 F_{st} >0.25 时, 说明群体间高度遗传分化。本研究中, 4 个群体两两间比较, 七里海河蟹群体与“长江 1 号”群体、“光合 1 号”群体间的遗传分化达到中等水平(F_{st} >0.05); 其他比较组间的遗传分化程度处于低水平(F_{st} <0.05)。两两群体间的 Nei's 无偏遗传距离为 0.0617~0.2611, 群体间遗传距离较小。这

与肖起珍等(2017)对长江水系中华绒螯蟹野生与人工繁殖群体遗传研究的结果相似。

群体系统进化树显示, 自然群体和“光合 1 号”聚为一支后, 再与“长江 1 号”聚为一支, 而七里海河蟹群体单独聚为一支。这可能是由天津地区中华绒螯蟹养殖产业现状导致的。自 20 世纪中后期, 天津海河入海口建设了防潮闸后, 海河流域的中华绒螯蟹自然资源逐年减少, 同时养殖产业迅速发展。但天津地区遗传育种研究起步晚, 育种技术相对落后, 本地人工繁育蟹苗量少, 远远无法满足当地养殖生产需求。所以, 养殖企业大量引进辽河、长江等其他水系苗种, 以“光合 1 号”和“长江 1 号”居多。在养殖生产过程中, 由于养殖群体个体逃逸, 可能会与自然群体发生基因交流, 从而导致了异地引进群体与自然群体间的遗传距离变小, 打破了各水系中华绒螯蟹的原始分布格局。

本研究以中华绒螯蟹 3 个水系人工选育群体和海河流域自然群体为对象, 应用微卫星分子标记技术分析各群体的遗传多样性和群体间的遗传分化。结果表明, 4 个群体的遗传分化程度处于中低水平, 3 个人工选育群体的遗传多样性与自然群体相比有一定程度的降低, 但仍保持在较高水平上, 具有较大的选育潜力。

参 考 文 献

- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al*. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331
- Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 167-169
- Du HM. Brief discussion of Qilihai crab ecological cultivation. *Rural Science and Technology*, 2014(3): 29 [杜红梅. 七里海河蟹生态养殖浅谈. *乡村科技*, 2014(3): 29]
- Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001, Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hardy OJ, Vekemans X. SPAGeDi: A versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(4): 618-620
- Kimura M, Crow JF. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 1964, 49(4): 725-738
- Li B. *Ecology*. Beijing: Higher Education Press, 2000, 338-341 [李博. *生态学*. 北京: 高等教育出版社, 2000, 338-341]
- Li JJ, Geng XY, Chen LM, *et al*. Identification and characterization

- of thirty novel microsatellite DNA markers from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* expressed sequence tags. *BMC Research Notes*, 2016, 105(9): 1–5
- Li JJ, Geng XY, Dong XW, *et al.* Evaluation of visible implant elastomer tags in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Marine Fisheries*, 2016, 38(4): 400–405 [李晶晶, 耿绪云, 董学旺, 等. 中华绒螯蟹可视荧光标记应用研究. *海洋渔业*, 2016, 38(4): 400–405]
- Ma HT, Chang YM, Yu DM, *et al.* Microsatellite variations among four populations of *Eriocheir sinensis*. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 126–133
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 1987
- Qin Y, Shi G, Sun Y. Evaluation of genetic diversity in *Pampus argenteus* using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(4): 5833–5841
- Raymond M, Rousset F. Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248–249
- Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 1989, 43(1): 223–225
- Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144(1): 389–399
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang CH, Li SF. Advances in studies on germplasm in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(1): 82–86 [王成辉, 李思发. 中华绒螯蟹种质研究进展. *中国水产科学*, 2002, 9(1): 82–86]
- Wang J, Wang QY, Kong J, *et al.* SSR Analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 104–111 [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的SSR分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 104–111]
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358–1370
- Wright S. *Evolution and the genetics of population variability within and among natural population*. University of Chicago Press, Chicago, 1978, 121–124
- Xiao QZ, Liu Q, Wu XG, *et al.* Genetic diversity analysis of wild and cultured megalopa population of *Eriocheir sinensis* from Yangtze River. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(5): 1935–1945 [肖起珍, 刘青, 吴旭干, 等. 长江水系中华绒螯蟹野生和人工繁殖大眼幼体的遗传多样性分析. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(5): 1935–1945]
- Zeng QK, Sun CF, Dong JJ, *et al.* Analysis of genetic diversity in three different populations of *Siniperca chuatsi*. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(8): 3241–3250 [曾庆凯, 孙成飞, 董浚键, 等. 翘嘴鲌 3 个不同群体的遗传多样性分析. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(8): 3241–3250]
- Zhang H, Gao TX, Zhuang ZM, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild population of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1149–1155 [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较. *水产学报*, 2010, 34(8): 1149–1155]
- Zhang RL, Wang WJ, Feng YW, *et al.* Assessment of genetic variability and microsatellite analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) after artificial selection of the shell width. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 90–96 [张荣良, 王卫军, 冯艳微, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳宽快速生长选育群体遗传多样性及遗传结构的微卫星标记分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 90–96]
- Zhu GQ. Integration and application of key technologies for ecological cultivation of Qilihai crab. *Tianjin Fisheries*, 2012(1): 35–39 [朱广奇. 七里海河蟹生态养殖关键技术集成与应用. *天津水产*, 2012(1): 35–39]

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity Analysis of Wild and Cultured Population of *Eriocheir sinensis* from Different Water Systems

LI Jingjing^{1,2}, CHEN Limei³, GENG Xuyun², DONG Xuewang², SUN Jinsheng^{1①}

(1. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387; 2. Tianjin Diseases Prevention and Control Center of Aquatic Animals, Tianjin 300221; 3. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, Fisheries College, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract The Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* is one of the most economically important aquaculture species in China due to its taste and nutritional value. In this study, the genetic status of both wild and cultivated stocks of *E. sinensis* was assessed using simple sequence repeat (SSR) markers. Ten microsatellite markers reported in previous studies were selected to estimate the level of genetic diversity within one Haihe natural population and three selected artificial populations (Yangtze No.1, Guanghe No.1, and Qilihai crab) and to compare the degree of genetic differentiation among them. Unique PCR products and high levels of polymorphism were observed for all loci. For the four populations of *E. sinensis*, the number of alleles per locus ranged from 3 to 17, with a mean allele number of 8.5 to 9.7. The mean observed heterozygosities ranged from 0.566 to 0.661, while the mean expected heterozygosities ranged from 0.720 to 0.745. Additionally, the mean polymorphism information content ranged from 0.687 to 0.716. Furthermore, the inbreeding coefficient (F_{is}) ranged from -0.080 to 0.827, and there were 13 cases that significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$) among the 40 population-locus cases (4 populations \times 10 loci). The results of the microsatellite survey indicated that the genetic diversity of the three artificially selected populations was slightly lower than that of the natural population, but still maintained at a high level for further breeding. The analysis of genetic differentiation showed that F_{st} ranged from 0.015 to 0.075, genetic similarity ranged from 0.7702 to 0.9401, and genetic distance ranged from 0.0617 to 0.2611. UPGMA phylogenetic analysis divided these populations into two groups. Natural population and Guanghe No.1 stocks were allocated to the same cluster, and the Qilihai crab was allocated to another cluster. In conclusion, the four populations of *E. sinensis* possessed high genetic diversity but low to moderate levels of genetic differentiation. The information on the genetic variation and differentiation obtained in this study will provide a theoretical basis for further breeding and utilization of germplasm resources of *E. sinensis*.

Key words *Eriocheir sinensis*; Genetic diversity; Genetic differentiation; Microsatellite

① Corresponding author: SUN Jinsheng, E-mail: jinshsun@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180914001

http://www.yykxjz.cn/

唐永成, 彭姣, 赵运林, 徐正刚, 丁一, 吴良. 池养中华绒螯蟹不同性别形态及质量差异分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 114-120

Tang YC, Peng J, Zhao YL, Xu ZG, Ding Y, Wu L. Morphological attributes and quality parameters of different sexes of *Eriocheir sinensis* cultured in a pond. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 114-120

池养中华绒螯蟹不同性别形态及质量差异分析*

唐永成¹ 彭 姣¹ 赵运林¹ 徐正刚^{1,2①} 丁 一¹ 吴 良¹

(1. 中南林业科技大学 林业遥感大数据与生态安全湖南省重点实验室 长沙 410004;

2. 湖南城市学院 材料与化学工程学院 益阳 413000)



摘要 池塘养殖中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是当前的主要生产方式,为了解池养中华绒螯蟹形态指标参数,分别测定了中华绒螯蟹幼体和成体的头胸甲长、头胸甲宽、体高、体质量和各部位的质量及含水率,计算了肝胰腺指数和肌肉指数,旨在了解池养中华绒螯蟹形态指标及质量参数的关系。结果显示,不同性别幼蟹头胸甲长、头胸甲宽、体高、肌肉指数无显著差异($P>0.05$),而体质量差异显著($P<0.05$);不同性别成蟹各形态指标差异极显著($P<0.01$);幼蟹的肝胰腺、肌肉及其他部分含水率差异极显著,高于成蟹($P<0.01$);成蟹的肌肉指数和肝胰腺指数差异极显著,高于幼蟹($P<0.01$)。本研究分别建立了幼蟹体质量(Y_1)与体高(X_3)、成蟹体质量(Y_2)与头胸甲宽(X_2)的回归方程: $Y_1=-12.067+16.416X_3$, $Y_2=-268.423+62.078X_2$, 幼蟹的决定系数高于成蟹。本研究可为中华绒螯蟹生态养殖中的产量估算和品质鉴定提供参考。

关键词 中华绒螯蟹; 形态指标; 肝胰腺指数; 相关性; 肥满度

中图分类号 S964.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0114-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国重要的经济水产动物(张世勇等, 2013),广泛分布于我国渤海、黄海和东海沿岸诸省,长江水系的中华绒螯蟹主要分布于长江中下游的河流、湖泊与水库,不同水系的中华绒螯蟹的形态通常存在一定差异(王茜等, 2006)。长江水系中华绒螯蟹生长快,个体肥大,肉质细嫩,味道鲜美,与瓯江、闽江、珠江及辽河水系的中华绒螯蟹相比,具有明显的生长性能及肉质品质优势,深受消费者青睐(李晓晖等, 2009)。

我国中华绒螯蟹养殖方式主要有池塘养殖、荡滩养殖、网围养殖、稻田养殖、庭院养殖等(周明东, 2009),以池塘生态养殖为主。池塘生态养殖利用池

塘,通过符合生态规律的一些技术手段保持河蟹养殖水体生态平衡,使河蟹池塘养殖可持续发展(纪连元, 2013)。目前已从不同方面研究了池养中华绒螯蟹,如对池养中华绒螯蟹的营养成分分析(黄春红等, 2013);对池养和野生中华绒螯蟹的生理研究(Hui et al, 2005; Wójcik et al, 2014; 姜晓东等, 2016);不同水域中华绒螯蟹的形态特征研究(耿绪云等, 2003)。

中华绒螯蟹的池塘养殖多经历幼蟹和成蟹 2 个阶段(中国农业百科全书总编辑委员会, 1996)。作者研究了湖南省益阳市大通湖中华绒螯蟹养殖基地池塘养殖幼蟹和成蟹的形态指标及质量参数,为中华绒螯蟹的品质鉴定、产量估算和生态养殖提供参考。

* 湖南省科技计划项目(2016TP1014; 2016TP2007)和国家科技支撑项目(2014BAC09B03-02)共同资助 [This work was supported by Science and Technology Project of Hunan Province (2016TP1014; 2016TP2007), and National Key Technology Research and Development Program of China(2014BAC09B03-02)]. 唐永成, E-mail: 740138269@qq.com

① 通讯作者: 徐正刚, E-mail: rssq198677@163.com

收稿日期: 2018-09-14, 收修改稿日期: 2018-11-13

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验蟹苗来自于长江水系, 放苗时间为 2016 年 3 月中旬, 放苗密度为 1000 只/亩。苗种饲养于湖南省大通湖区农登村湘蟹养殖专业合作社基地(112.37°E, 29.07°N)。实验池塘规范整洁, 池底平坦, 进排水方便, 平均水深为 1 m。实验池塘周围设置深为 50 cm、宽为 6 m 的“回”字形围沟。池底种植伊乐藻(*Elodea nuttallii*), 用于净化水质、提供 O₂。养殖期间随气温升高, 不断加深水位, 最高水位控制在 1~1.2 m 之间。养殖过程中不排水、不换水, 只按水位要求加水。每天 17:00 投喂 1 次, 投喂量依生长、天气情况和摄食量调整。前期投喂粗蛋白为 34%~40% 和粗脂肪为 4.4%~8.9% 的海大河蟹专用配合饲料, 从 6 月初开始缩减配合饲料的投喂量, 逐步投喂冰鲜海鱼和煮熟的玉米、小麦和黄豆等。

随机选择同一池塘活泼健壮、无断足、无病伤的幼蟹与成蟹, 分别于 2016 年 4 月和 10 月捕捞。共捕捞幼蟹 275 只, 其中, 雌蟹 141 只、雄蟹 134 只; 共捕捞成蟹 221 只, 其中, 雌蟹 114 只, 雄蟹 107 只。

1.2 形态指标测定

游标卡尺测定中华绒螯蟹头胸甲长(Carapace length, CL)、头胸甲宽(Carapace width, CW)、体高(Carapace height, CH)及体质量(Weight, W)等形态指标, 精确到 0.01 cm。头胸甲长指头胸甲前后缘长度; 头胸甲宽指头胸甲左右最大宽度; 体高指背腹最大长度。用滤纸吸干蟹表面水分后, 用电子天平称量体质量, 精确到 0.001 g。解剖中华绒螯蟹, 分离肌肉、肝胰腺、性腺、蟹壳和其他器官, 分别称重, 并烘干记录, 使用电热恒温鼓风干燥箱干燥样品, 参照国标 GB/T 5009.3-2003 测定, 先在 50°C 烘箱中干燥 3~5 h, 然后, 转入 105°C 烘箱中干燥恒重(刘丹, 2015)。

中华绒螯蟹幼蟹至成蟹养殖阶段早期性腺发育较慢, 在 3~5 月, 中华绒螯蟹性腺非常小, 解剖时很难发现(徐佳倩等, 2016), 故幼蟹阶段未单独分离。6 月性腺开始发育, 至 10 月中华绒螯蟹性成熟后, 成蟹性腺重量急剧增加, 单独分离成蟹性腺。

1.3 数据处理与分析

计算中华绒螯蟹头胸甲长、头胸甲宽、体高、体质量、肥满度(Condition factor, CF)的平均数、标准差及变异系数。计算中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、性腺及其他部分的含水率(Moisture content, MC)。肝胰腺指

数(Hepatosomatic index, HSI)、肌肉指数(Muscle index, MI)参考何杰(2016a)计算方法。采用独立样本 *T*-检验进行差异比较, 利用 Pearson 相关系数法进行相关分析, 使用逐步回归方法建立形态指标回归模型。相关数据用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 处理。具体公式:

$$CF=100 \times W / (CL)^3$$

$$MC(\%)=100 \times (W - W_0) / W$$

$$HSI(\%)=100 \times WH / W$$

$$MI(\%)=100 \times WM / W$$

式中, *L* 指甲壳长, *WH* 指肝胰腺重, *WM* 指肌肉重, *W* 指体质量湿重, *W*₀ 指体质量干重。

2 结果与分析

2.1 不同性别中华绒螯蟹形态指标

不同性别中华绒螯蟹形态指标见表 1, 从表 1 可以看出, 不同性别幼蟹头胸甲长、头胸甲宽、体高及肥满度均无显著差异(*P*>0.05)。雌性幼蟹平均体质量为(8.543±2.555) g, 雄性幼蟹平均体质量为(9.304±2.977) g, 雄性幼蟹体质量较雌性幼蟹大, 且差异显著(*P*<0.05)。雄性成蟹的头胸甲长、头胸甲宽、体高、体质量、肥满度均高于雌性成蟹, 且差异极显著(*P*<0.01)。因此, 不同性别幼蟹向成蟹发育过程中的生长特性可能存在差异。

2.2 不同性别中华绒螯蟹各部位含水率

不同性别中华绒螯蟹各部位含水率见表 2, 由表 2 可知, 雌性幼蟹的肌肉、肝胰腺和其他部分含水率均极显著高于成蟹(*P*<0.01), 雄性幼蟹肝胰腺含水率亦显著高于成蟹(*P*<0.01), 但雄性幼蟹和成蟹肌肉含水率及其他部分含水率差异不显著(*P*>0.05)。不同性别幼蟹的肌肉和肝胰腺含水率无显著差异(*P*>0.05), 而其他部分含水率差异显著(*P*<0.05); 不同性别成蟹的性腺含水率差异极显著(*P*<0.01), 肌肉、肝胰腺和其他部分含水率则无显著差异(*P*>0.05)。总体上, 幼蟹的肌肉、肝胰腺及其他部分的含水率极显著高于成蟹(*P*<0.01), 但同阶段不同性别中华绒螯蟹不同部位的含水率则没有明显规律。

2.3 中华绒螯蟹幼体与成体肝胰腺指数和肌肉指数

图 1 表明, 雌蟹幼蟹肌肉指数(图 1a)为(12.113±5.245)%, 成蟹为(17.795±2.510)%; 雄蟹幼体肌肉指数为(10.868±1.930)%, 成体为(19.677±2.146)%。不同生长阶段的中华绒螯蟹肌肉指数差异极显著(*P*<0.01), 雄蟹肌肉指数增长率高于雌蟹。肝胰腺指数(图 1b)也呈现同样规律, 雌蟹幼蟹和成蟹的肝胰腺指数分别

表 1 不同性别中华绒螯蟹成蟹、幼蟹形态指标
Tab.1 Morphological index of juvenile and adult *E. sinensis* of different gender

	头胸甲长 CL (cm)		头胸甲宽 CW (cm)		体高 CH (cm)		体质量 W (g)		肥满度 CF		
	平均值± 标准差	变异 系数	平均值± 标准差	变异 系数	平均值± 标准差	变异 系数	平均值± 标准差	变异 系数	平均值± 标准差	变异 系数	
	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	
幼蟹 Juvenile	雌 Female (n=141)	2.409±0.270	11%	2.617±0.284	11%	1.262±0.144	11%	8.543±2.555	30%	60.309±12.102	20%
	雄 Male (n=134)	2.465±0.265	11%	2.628±0.291	11%	1.269±0.162	13%	9.304±2.977	32%	60.397±5.166	9%
	T-test	P>0.05		P>0.05		P>0.05		P<0.05*		P>0.05	
成蟹 Adult	雌 Female (n=114)	5.755±0.364	6%	6.054±0.347	6%	3.162±0.232	7%	102.193±16.539	16%	53.410±5.008	9%
	雄 Male (n=107)	6.104±0.369	6%	6.589±0.378	6%	3.304±0.247	7%	146.177±28.409	19%	63.819±6.588	10%
	T-test	P<0.01**		P<0.01**		P<0.01**		P<0.01**		P<0.01**	

注：*表示差异显著(P<0.05)，**表示差异极显著(P<0.01)

Notes: *indicates significant difference (P<0.05), ** showed highly significant difference (P<0.01)

表 2 不同性别中华绒螯蟹各部位含水率
Tab.2 Moisture content of different parts of juvenile and adult *E. sinensis* of different gender (%)

组织 Tissue	性别 Sex	幼蟹 Juvenile	成蟹 Adult	T-test
肌肉 Muscle	雌 Female	84.779±5.886	68.933±5.576	P<0.01**
	雄 Male	78.650±12.597	70.178±6.274	P>0.05
肝胰腺 Hepatopancreas	雌 Female	72.671±8.778	47.733±8.911	P<0.01**
	雄 Male	70.871±9.685	50.422±6.472	P<0.01**
性腺 Gonad	雌 Female		34.533±9.494	
	雄 Male		59.422±11.214	
其他部分 Other parts	雌 Female	67.021±3.839	52.178±2.973	P<0.01**
	雄 Male	62.886±5.179	56.111±10.863	P>0.05

注：其他部分指解剖后除去肌肉、肝胰腺、性腺(幼蟹包括极少部分性腺)后的部分；*表示差异显著(P<0.05)，**表示差异极显著(P<0.01)

Notes: Other parts refer to dissection after removing the muscle, hepatopancreas, gonad (the juvenile crabs including few gonads); * indicates significant difference (P<0.05), ** showed highly significant difference (P<0.01)

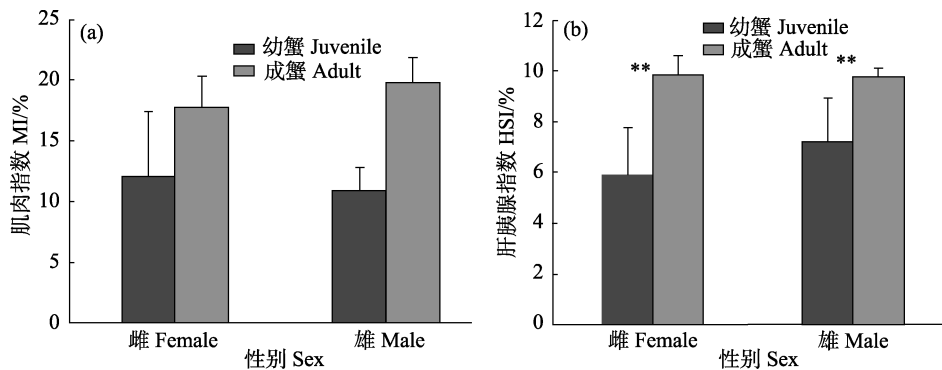


图 1 中华绒螯蟹幼蟹和成蟹肌肉指数与肝胰腺指数的比较

Fig.1 Comparison of muscle index and hepatosomatic index of juvenile and adult *E. sinensis*

**表示差异极显著(P<0.01)

** showed highly significant difference (P<0.01)

为(5.892±1.860)%和(9.814±0.774)%; 雄蟹幼蟹和成蟹的肝胰腺指数分别为(7.166±1.752)%和(9.752±0.334)%, 成蟹肝胰腺指数极显著高于幼蟹($P<0.01$), 雌蟹肝胰腺指数增长率高于雄蟹。从总体看, 同阶段不同性别中华绒螯蟹肌肉指数与肝胰腺指数的差异不显著($P>0.05$)。

2.4 形态指标与体质量回归模型

分析表明, 幼蟹和成蟹形态指标间相关性达到极显著水平, 体质量和形态指标间相关性亦达到极显著水平($P<0.01$)(表 3 和表 4)。在幼蟹阶段, 体质量与头胸甲长、体高的相关系数分别达到了 0.932 和 0.911, 但和头胸甲宽的相关系数仅为 0.271。幼蟹头胸甲长和体高的相关系数虽然达到 0.891, 但头胸甲宽与体高的相关系数仅为 0.251, 因此, 难以仅使用体高来估算幼蟹体质量, 而宜使用体高和头胸甲宽估算幼蟹体质量。在成蟹阶段, 体质量与头胸甲长、头胸甲宽、体高的相关系数均较高, 分别为 0.830、0.878、0.714。由于头胸甲长、头胸甲宽、体高之间的相关系数均较高, 可用头胸甲宽预估成蟹体质量。

表 3 幼蟹形态指标相关性

Tab.3 Correlation between morphological index of juvenile *E. sinensis*

指标 Index	头胸甲长 CL(cm)	头胸甲宽 CW(cm)	体高 CH(cm)	体质量 W(g)
头胸甲长 CL (cm)	1	0.222**	0.891**	0.932**
头胸甲宽 CW (cm)		1	0.251**	0.271**
体高 CH (cm)			1	0.911**
体质量 W (g)				1

注: **表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关, 下同

Notes: ** indicated that correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). The same as below

表 4 成蟹形态指标相关性

Tab.4 Correlation between morphological index of adult *E. sinensis*

指标 Index	头胸甲长 CL(cm)	头胸甲宽 CW(cm)	体高 CH(cm)	体质量 W(g)
头胸甲长 CL(cm)	1	0.912**	0.847**	0.830**
头胸甲宽 CW(cm)		1	0.785**	0.878**
体高 CH(cm)			1	0.714**
体质量 W(g)				1

以中华绒螯蟹体质量为因变量(Y), 头胸甲长、头胸甲宽、体高为自变量(X), 采用逐步回归方法对中华绒螯蟹测量数据进行多元线性回归分析, 建立最优多元线性回归分析。回归方程如下:

$$Y_1 = -14.828 + 6.064X_1 + 0.079X_2 + 6.918X_3 (R^2 = 0.903)$$

$$Y_2 = -278.439 + 13.515X_1 + 50.983X_2 (R^2 = 0.776)$$

式中, Y_1 为幼蟹体质量(g)、 Y_2 为成蟹体质量(g); X_1 为头胸甲长(cm); X_2 为头胸甲宽(cm); X_3 为体高(cm); R^2 为决定系数。

依据形态指标之间的相关性, 进一步简化不同生长阶段中华绒螯蟹体质量与形态指标的关系方程。幼蟹使用体质量与体高和头胸甲宽建立回归方程, 成蟹使用体质量与头胸甲宽建立回归方程, 方程如下:

$$Y_1 = -12.067 + 0.078X_2 + 16.416X_3 (R^2 = 0.832)$$

$$Y_2 = -268.423 + 62.078X_2 (R^2 = 0.771)$$

式中, Y_1 为幼蟹体质量(g)、 Y_2 为成蟹体质量(g); X_2 为头胸甲宽(cm); X_3 为体高(cm); R^2 为决定系数。

3 讨论

在渔业养殖过程中, 野生和养殖水产动物往往存在形态和活力差异(孔祥迪等, 2016)。对养殖水产动物形态指标等基础资料进行研究具有重要意义与价值。首先, 该类研究能够为渔业养殖提供基础资料。其次, 该类研究是生态渔业与高效渔业发展的基础。形态指标是表征中华绒螯蟹生长和鉴别其种质来源的重要指标。形态学研究作为一种直观方便且简单实用的技术手段, 已应用于中华绒螯蟹种质鉴定、种群和产地判别等研究领域(何杰等, 2015; 杨文斌等, 2012)。本研究侧重分析不同性别中华绒螯蟹形态指标的差异。结果显示, 不同性别幼蟹头胸甲长、头胸甲宽、体高、肥满度均无显著差异($P>0.05$); 而不同性别成蟹的上述指标差异却极显著($P<0.01$), 在成蟹养殖期间, 雄蟹个体的增长率要大于雌蟹, 这与何杰等(2016b)的研究结果一致。胡清彪(2017)对不同家系中华绒螯蟹生长情况进行研究, 发现不同环境对不同家系生长影响不同, 认为遗传对于幼蟹的生长具有重要作用。因此, 其他水系池养中华绒螯蟹生长规律需要进一步研究。

肝胰腺指数及其生化组成可以在很大程度上反映中华绒螯蟹的营养状况, 何杰(2016a)研究表明, 长江水系中华绒螯蟹野生群体和养殖群体成蟹的性腺指数和肝胰腺指数存在显著差异。本研究不同性别中华绒螯蟹幼蟹与成蟹肌肉指数与肝胰腺指数均不存在显著差异, 说明在相同养殖环境条件下, 二者营养

状况相差不大。从种群繁衍的角度看,雌性个体比雄性个体肩负着更为繁重的繁衍后代任务,在生殖洄游前期其所需的能量也比雄性个体多(李思发等,2001)。故雌蟹营养积累早于雄蟹,这也说明此时雌蟹品质高于雄蟹,是10月份雌蟹占据大部分市场的原因。实验中,雌雄成蟹肌肉和肝胰腺含水率均较幼蟹低,可能与肌肉、肝胰腺组成成分有关。幼蟹从蟹苗培育基地经过长途运输及适应期后才开始摄食,饥饿胁迫使幼蟹营养缺乏,但营养缺乏状况不能在体形、体质量上显现出来,饥饿期间,组织中以水来填充消耗的能源物质,导致含水率相对增加,这可能是甲壳动物生理调节的共有特征(何杰等,2013)。

现阶段形态指标与体重的关系在鱼类、贝类、虾蟹类等水产动物的研究中都得到了高度重视(安丽等,2013)。对长江野生和池塘养殖中华绒螯蟹形态学进行比较,发现野生种群较养殖种群存在较大的差异,但野生种群在选育过程中逐渐与养殖群体趋于一致,因此形态学特征不能作为中华绒螯蟹良种选育的可靠指标(姜晓东等,2018)。本研究所测幼蟹和成蟹的头胸甲长、头胸甲宽、体高3个形态指标中,通过逐步回归方法确定了影响体质量的最优方程,幼蟹的决定系数高于成蟹,这可能是由于幼蟹是产自同一地区同一蟹种,生境差异小,所以形态差异较小(张列士等,2000);而成蟹生长受水草密度、投饵随机性和蟹密度等因素影响较大(何杰等,2015)。建立形态指标与体质量方程,对中华绒螯蟹生产应用具有重要作用,中华绒螯蟹成体形态指标变量少于幼体,说明幼体向成体发育,涉及多维尺度,而成体的生长则相对稳定。

致谢:感谢益阳大通湖区农登村湘蟹养殖专业合作社张清在实验中给予的帮助。

参 考 文 献

- An L, Zhu YA, Fu PS, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight in sutchi catfish *Pangasius sutchi*. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(1): 5–9 [安丽,朱永安,付佩胜,等.淡水鲈鱼形态性状与体质量关系的初步研究.水产学杂志,2013,26(1):5–9]
- China Agricultural Encyclopaedia General Editorial Board. Chinese agricultural encyclopaedia. Down, water industry volume. Beijing: Agricultural Press, 1996, 789–790 [中国农业百科全书总编辑委员会.中国农业百科全书.下,水产业卷.北京:农业出版社,1996,789–790]
- Geng XY, Sun JS, Ma WL, *et al.* Comparison of the external morphological features of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) of different water systems. Tianjin Fisheries, 2003(1): 29–33 [耿绪云,孙金生,马维林,等.不同水系中华绒螯蟹外部形态特征的比较.天津水产,2003(1):29–33]
- He J, Wu XG, Long XW, *et al.* Comparative studies of morphology and biochemical composition between wild-caught and pond-reared juvenile Chinese mitten crab for Yangtze population. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1665–1678 [何杰,吴旭干,龙晓文,等.池塘养殖和野生长江水系中华绒螯蟹扣蟹形态学及生化组成的比较研究.水产学报,2015,39(11):1665–1678]
- He J, Wu XG, Long XW, *et al.* Comparison in edible yield and nutritional quality of pond-cultured adult *Eriocheir sinensis* from wild-caught and pond-reared crabseeds. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016a, 47(1): 140–150 [何杰,吴旭干,龙晓文,等.中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)野生和养殖蟹种对池塘养殖成蟹可食率和营养品质的影响研究.海洋与湖沼,2016a,47(1):140–150]
- He J, Wang C, Shao LC, *et al.* Impacts of starvation on the juveniles of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(8): 2077–2084 [何杰,王春,邵路畅,等.饥饿胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)仔蟹的影响.生态学杂志,2013,32(8):2077–2084]
- He J, Wu XG, Zhao HL, *et al.* Growth performance and gonadal development of pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) fed formulated diets during the whole culture process. Journal of Fishery Sciences of China, 2016b, 23(3): 606–618 [何杰,吴旭干,赵恒亮,等.全程投喂配合饲料条件下池养中华绒螯蟹的生长性能及其性腺发育.中国水产科学,2016b,23(3):606–618]
- Huang CH, Yang PH, Han Q, *et al.* Nutrients analysis on the edible parts of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards. Food and Machinery, 2013, 29(1): 61–65 [黄春红,杨品红,韩庆,等.池塘精养中华绒螯蟹营养成分分析与评价.食品与机械,2013,29(1):61–65]
- Hui CA, Rudnick D, Williams E. Mercury burdens in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in three tributaries of southern San Francisco Bay, California, USA. Environmental Pollution, 2005, 133(3): 481–487
- Hu QB. The study of the growth of juvenile Chinese mitten crab and the identification of different families. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2017 [胡清彪.中华绒螯蟹幼蟹生长及家系间的鉴别研究.大连海洋大学硕士研究生学位论文,2017]
- Ji LY. Exploration of key points in the pond farming process of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [纪连元.中华绒螯蟹池塘养殖过程中关键点的探究.上海海洋大学硕士研究生学位论文,2013]
- Jiang XD, Wu XG, Liu Q, *et al.* Comparison of the early culture performance, the disease resistance, and the non-specific immunity between wild-caught and pond-reared juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Progress in Fishery

- Sciences, 2016, 37(6): 131–137 [姜晓东, 吴旭干, 刘青, 等. 长江野生和池塘养殖河蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹种早期养殖性能、抗病力和非特异性免疫性能的比较. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 131–137]
- Jiang XD, Wu XG, He J, *et al.* Effects of selective breeding on the morphological characteristics of wild and cultured juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Fisheries of China, 2018, 42(8): 1285–1298 [姜晓东, 吴旭干, 何杰, 等. 遗传选育对野生和养殖中华绒螯蟹蟹种形态学特征的影响. 水产学报, 2018, 42(8): 1285–1298]
- Kong XD, Liu L, Li YL, *et al.* Nutritional values of 2-year-old cultured *Epinephelus akaara* and causes of its common deformities. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(5): 38–45 [孔祥迪, 刘莉, 李炎璐, 等. 养殖2龄赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)的营养价值与畸形原因分析. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 38–45]
- Li XH, Xu ZQ, Ge JC, *et al.* Advances in germplasm research of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* originated from the Yangtze River. Journal of Aquaculture, 2009, 30(10): 42–47 [李晓晖, 许志强, 葛家春, 等. 长江水系中华绒螯蟹种质资源研究进展. 水产养殖, 2009, 30(10): 42–47]
- Li SF, Wang CH, Zhao NG. Studies on gonad developmental rule of lake stocked mitten crab of Yangtze population. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(4): 350–357 [李思发, 王成辉, 赵乃刚. 湖泊放养长江水系中华绒螯蟹的性成熟规律研究. 水生生物学报, 2001, 25(4): 350–357]
- Liu D. Research on energy allocation of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [刘丹. 中华绒螯蟹的能量分配研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Wang Q, Li XD, Dai W, *et al.* The morphological discrimination of populations of mitten crab in different river systems. Fisheries Science, 2006, 25(3): 125–128 [王茜, 李晓东, 戴伟, 等. 不同水系绒螯蟹群体外部形态的判别分析. 水产科学, 2006, 25(3): 125–128]
- Wójcik D, Normant M. Gonad maturity in female Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from the southern Baltic Sea – the first description of ovigerous females and the embryo developmental stage. Oceanologia, 2014, 56(4): 779–787
- Xu JQ, Wu XG, Zhang PC, *et al.* Growth, gonadal development and secondary sexual characteristics of pond-reared male Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) during the second year culture. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(3): 434–448 [徐佳倩, 吴旭干, 张鹏超, 等. 池塘养殖中华绒螯蟹二龄雄体生长、性腺发育和第二性征的变化. 动物学杂志, 2016, 51(3): 434–448]
- Yang WB, Su YP, Liu HB, *et al.* A comparative study of morphological characteristics and elemental fingerprints of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from three lakes. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 84–93 [杨文斌, 苏彦平, 刘洪波, 等. 长江水系3个湖泊中华绒螯蟹形态及元素“指纹”特征. 中国水产科学, 2012, 19(1): 84–93]
- Zhang LS, Qu JJ, Wang DD. Ecological and morphological characteristics of populations of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) from Changjiang, Oujiang and Liaohe Rivers and the quality identification of their young crabs. Fisheries Science and Technology Information, 2000, 27(5): 200–205 [张列士, 瞿纪军, 王东冬. 长江、瓯江、辽河水系河蟹种群生态和形态特征及蟹种质量鉴别. 水产科技情报, 2000, 27(5): 200–205]
- Zhang SY, Fu HT, Qiao H, *et al.* Research progress on genetics and breeding of *Eriocheir sinensis*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(20): 39–45 [张世勇, 傅洪拓, 乔慧, 等. 中华绒螯蟹遗传育种研究进展. 中国农学通报, 2013, 29(20): 39–45]
- Zhou MD. The comparison of culture results and growth characteristics of *Eriocheir sinensis* under different specifications and densities. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2009 [周明东. 池塘养殖不同规格、密度河蟹生长特性及养殖效果. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2009]

Morphological Attributes and Quality Parameters of Different Sexes of *Eriocheir sinensis* Cultured in a Pond

TANG Yongcheng¹, PENG Jiao¹, ZHAO Yunlin¹, XU Zhenggang^{1,2①}, DING Yi¹, WU Liang¹

(1. Key Laboratory of Forestry Remote Sensing Based Big Data & Ecological Security for Hunan Province, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

2. School of Material and Chemical Engineering, Hunan City University, Changsha 413000)

Abstract The Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is an important freshwater crustacean cultured in China. It is popular with consumers because of its high nutritional value, pleasant smell, and taste. With increasing demand from the Chinese market, Chinese mitten crabs are now widely cultivated in ponds, lakes, and reservoirs. Pond culture of *E. sinensis* is the current main production method. To understand the parameters of morphological indicators of the Chinese mitten crab, some morphometrical traits, including carapace length (CL), carapace width (CW), carapace height (CH), and body weight (W) and moisture content were measured in *E. sinensis* cultured in ponds, and the hepatosomatic index (HSI) and muscle index (MI) were estimated to understand morphological attributes and quality parameters. The results showed no significant difference in CL, CW, body height, and MI in different sex groups of juvenile crabs ($P>0.05$), with significant differences in body weight in juvenile crabs ($P<0.05$). There were highly significant differences by sex in the above indices for adult crabs ($P<0.01$). Juvenile crabs had significantly higher HSI and MI than adult crab ($P<0.01$). The regression equation for juvenile crab body weight (Y_1), body weight of adult crabs (Y_2) CW (X_2), and CH (X_3) were expressed as $Y_1=-12.067+16.416X_3$, and $Y_2=-268.423+62.078X_2$, a higher decision coefficient for juveniles than for adults. The findings provide a scientific basis for ecological breeding of Chinese mitten crabs in yield estimation and quality evaluation.

Key words *Eriocheir sinensis*; Morphometrical index; Hepatosomatic index; Correlation; Condition factor

① Corresponding author: XU Zhenggang, E-mail: rssid198677@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190304001

http://www.ykxjz.cn/

魏智薪, 辛鲁生, 白昌明, 李亚楠, 张淑敏, 李成华, 王崇明. 魁蚶 *Ets* 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 121-130

Wei ZX, Xin LS, Bai CM, Li YN, Zhang SM, Li CH, Wang CM. Cloning of nine genes in the *Ets* family of ark clam (*Scapharca broughtonii*) and their expression in response to oyster herpes virus (OsHV-1) infection. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 121-130

魁蚶 *Ets* 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析*

魏智薪^{1,3} 辛鲁生^{2,3} 白昌明^{2,3} 李亚楠³
张淑敏³ 李成华¹ 王崇明^{2,3①}

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 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)

摘要 *Ets* 蛋白是宿主 MAPK 信号通路下游的一类可参与调控病毒基因转录复制的重要转录因子。本研究通过基因克隆成功获得魁蚶(*Scapharca broughtonii*) *Ets* 家族 9 条基因(分别命名为 *ETS-1*~*ETS-9*), 开放阅读框(ORF)大小分别为 1065、1290、1569、912、1344、1404、1521、1968 和 1191 bp, 并分别编码 354、429、522、303、447、468、506、655 和 396 个氨基酸。系统进化树分类表明, 本研究所获得的基因均属 *Ets* 家族。对 *ETS-1* 和 *ETS-3* 的氨基酸序列和三维结构分析表明, 其均含有高度保守的 *ETS* 结构域。在不同水温条件下, 通过人工注射牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)对魁蚶进行感染, 并对病毒拷贝数和 *Ets* 的相对表达量进行定量分析。结果显示, *ETS-1* 和 *ETS-3* 只在高温阳性组中相对表达量显著上调, 与病毒拷贝数在高温条件下增长趋势呈正相关; *ETS-4* 和 *ETS-8* 只在低温阳性组中相对表达量显著上调, 但在高温阳性组中 *ETS-4* 和 *ETS-8* 的相对表达量与病毒拷贝数呈负相关; 初步研究结果显示, 从魁蚶 *Ets* 基因中筛选出 2 条 *Ets* 基因(*ETS-1* 和 *ETS-3*), 在高温条件下(16±2)°C, 其可能参与正向调控病毒 OsHV-1 的复制过程。本研究为进一步探索魁蚶在夏季因感染牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)而导致的大量死亡提供了科学数据。

关键词 魁蚶; *Ets* 家族; OsHV-1; 克隆; 温度

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0121-10

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)属瓣鳃纲(Lamelli-branchia)、翼形亚纲(Pteriomorphia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae)(刘寒苗等, 2017; 李瑶瑶等, 2018), 是一

种底栖冷水性大型贝类, 主要分布于中国黄渤海、日本海、朝鲜半岛及俄罗斯东南部等沿海地区(毛雪英等, 2007; 张启刚等, 2007); 在近海岸水深 3 m 到外海

* 现代农业产业体系专项资金(CARS-49)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022017007; 20603022018014)共同资助[This work was supported by China Aquaculture Research System (CARS-49), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute (20603022017007; 20603022018014)]. 魏智薪, E-mail: weizhixin315@yeah.net

① 通讯作者: 王崇明, 研究员, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-04, 收修改稿日期: 2019-03-11

近 60 m 处的泥沙质或泥质海底均有分布(梁超等, 2010)。其营养价值极高、口感鲜美, 深受消费者喜爱, 成为中国对外出口创汇的重要的经济贝类之一(刘锡胤等, 2002)。

持续扩大的市场需求和有限的养殖环境使贝类养殖业向高密度养殖发展, 随之而来的则是大规模的病害暴发, 在高温季节, 病害问题尤为严重, 严重制约着海水贝类养殖业的可持续发展。贝类的病原(Elston, 1997; Hine *et al.*, 2000)可分为细菌、病毒和寄生虫类等, 其中, 病毒类病原以致死率高、感染速度快等特征引起广泛关注, 尤以牡蛎疱疹病毒 OsHV-1 (Ostreid herpesvirus 1) 的危害最为严重(胡宗福等, 2017; Roque *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2007; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2005)。自 20 世纪 90 年代以来, 该疫病就在法国和美国牡蛎养殖海域连年暴发, 随后蔓延至欧、美、亚等牡蛎养殖场, 造成了巨大的经济损失(Renault *et al.*, 2001; Segarra *et al.*, 2010)。在中国, OsHV-1 已造成了扇贝(Ren *et al.*, 2013)和魁蚶的大规模死亡(Xia *et al.*, 2015)。

病毒复制过程依赖宿主细胞, 包括必需的能量和功能蛋白元件等均需要宿主细胞供给(Ruelas *et al.*, 2013)。OsHV-1 属于双链 DNA 病毒, 需在宿主细胞核内进行转录复制(Jouaux *et al.*, 2013; 胡宗福等, 2017)。Ets(E-Twenty-Six)转录因子家族是含有 ETS 结构域的一类转录因子, 是宿主细胞核中一类可参与调控病毒基因转录复制的重要转录因子。Ets 转录因子在 MAP 激酶、Ca²⁺ 依赖的信号通路以及 TGF- β 等信号通路的调节下, 参与调控胚胎的发育、细胞的生长、分化和凋亡, 进而调控许多生理和病理过程(曾红等, 2017; Suico *et al.*, 2017)。Pleschka 等(2001)研究表明, 流感病毒的传播受到 RAF/MEK/ERK 信号级联的抑制。Bosselut 等(1990)对 HTLV-1 的研究发现, 人的 Ets1 和 Ets2 蛋白参与调控 HTLV-1 病毒的转录复制过程。本研究基于 Ets 的转录调控功能和 OsHV-1 中存在 Ets 结合位点, 初步推断 Ets 转录因子可能参与 OsHV-1 的复制调控过程。本研究采用基因克隆和实时荧光定量 PCR 技术克隆魁蚶 Ets 转录因子, 研究其在感染 OsHV-1 后的表达变化, 以及进一步对 Ets 转录因子相对表达量变化与病毒拷贝数变化进行相关性分析。以期 OsHV-1 感染魁蚶的致病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用魁蚶捕捞自渤海海域。随机选取 2 龄魁

蚶[壳长为(6.0 \pm 1.0) cm, 壳高为(5.0 \pm 1.5) cm, 体重为(90 \pm 10) g], 实验室室温暂养。实验用魁蚶暂养分为(16 \pm 2) $^{\circ}$ C 的高温暂养和(10 \pm 2) $^{\circ}$ C 的低温暂养, 暂养时间为 1 周。暂养期间, 每天更换 1 次海水, 每次更换 1/2 体积; 魁蚶日常投喂适量小球藻(*Chlorella vulgaris*), 并始终充氧。魁蚶病料为自然感染 OsHV-1 个体, -80 $^{\circ}$ C 保存(用于制备病毒悬液)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 Trizol (TaKaRa) 法进行样本总 RNA 提取。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取质量。使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计测量其浓度。以提取的总 RNA 为模板, 采用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remove (TOYOBO) 合成第一链 cDNA, 实验方法按照说明书进行。-80 $^{\circ}$ C 保存 cDNA 备用。

1.2.2 魁蚶 Ets 家族基因开放阅读框(ORF)的克隆及测序 根据本实验室的魁蚶转录组测序获得 Ets 家族的部分基因的全序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 ORF 引物(表 1), 并利用 KOD 酶进行扩增。采用扩增体系(20 μ l): cDNA 模板 1 μ l、KOD 酶 0.4 μ l、前引物 0.5 μ l、后引物 0.5 μ l、2 \times KOD 酶缓冲液 10 μ l、超纯水 3.6 μ l、2 mmol/L dNTP 4 μ l; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2.0 min, 35 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa) 将目的条带进行切胶回收。随后, 将回收的目的片段与 pMD19-T 载体(3 : 1) 在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 取 5 μ l 连接产物与 50 μ l 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞在 42 $^{\circ}$ C 热激 30 s。利用载体多克隆位点两侧的引物 RV-M(GAGCGGATAACAATTTTCACACAG) 和 M13-47(CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC) 对单克隆进行菌落 PCR 鉴定。阳性单克隆经验定后送生派生诺(青岛)股份有限公司进行测序。

1.2.3 魁蚶 Ets 家族基因的生物信息学分析 将测序结果正确的目的基因进行 BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 同源性比对, 利用在线网址(<http://www.expasy.org/>) 将 Ets 基因的 cDNA 序列推导成氨基酸序列; 使用 MEGA7.0 进行进化树分析; 利用生物在线网站(https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/cgi-bin/itasser_submit.cgi) 对 ETS-1、ETS-3 编码的蛋白质进行 3D 结构、ETS 结构域及酶催化位点进行预测。

1.2.4 OsHV-1 病毒悬液的制备及拷贝数检测 将本课题组-80 $^{\circ}$ C 保存的自然感染 OsHV-1 的魁蚶放置冰

表 1 本实验用到的引物序列
Tab.1 Sequences of primers used in this study

序列名称 Sequence name	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')
<i>ETS-1</i>	ETS-1-F	ATGGACGATGTTGGACGATG
	ETS-1-R	TAACACACAAGATATCTTTC
<i>ETS-2</i>	ETS-2-F	ATGGCTACTGTCTGCCACC
	ETS-2-R	AATAGACTGCCAACCCGAGG
<i>ETS-3</i>	ETS-3-F	ATGGACATTGAAGCATTGCAG
	ETS-3-R	CTCATCATCTTTGTTCGGCCT
<i>ETS-4</i>	ETS-4-F	ATGTCATCATCTTTCTGCAGTCG
	ETS-4-R	ACGTGTGAAAACTTTTGCCTC
<i>ETS-5</i>	ETS-5-F	ATGATTGACATTGACATGGAATTA
	ETS-5-R	ACTGTATTTCTCCCAACCATGAG
<i>ETS-6</i>	ETS-6-F	ATGGATACACTACTTAGTTCAATTC
	ETS-6-R	TAAATTGGAACAATCAATATCTAT
<i>ETS-7</i>	ETS-7-F	ATGGAAAATGACAACAATACCAT
	ETS-7-R	TTTAGTTGTATCTACATTTAACGAA
<i>ETS-8</i>	ETS-8-F	ATGGCAAATATCGCTGTGGA
	ETS-8-R	TGGATAAAATGAGCCAACATGT
<i>ETS-9</i>	ETS-9-F	ATATAATATCATAAATGCACGCC
	ETS-9-R	CTCTTCAAAGTTGTCCACGGTAG

上解冻, 随后取外套膜组织 1~2 g, 将样本润洗 2~3 次。无菌剪刀剪碎, 按 1:9(g:ml)加入无菌海水(0.22 μm 过滤), 50 ml 无菌管组织匀浆(5~10 s/3 次)。低速离心去除杂质: 1000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。取上清液 4 倍稀释, 过滤滤膜(5 μm –2 μm –0.45 μm –0.22 μm), 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按 Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit 试剂盒说明书提取病毒悬液 DNA。将提取后产物的病毒拷贝数进行实时荧光定量检测。检测体系(20 μl): 2 \times Mix 10 μl 、BF 引物 0.8 μl 、B4 引物 0.8 μl 、探针 0.4 μl 、超纯水 0.4 μl ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 35 个循环。使用的探针序列: BP6FAM-ATCGGGGGGGGGGGTTTATBHQ-1; 使用的引物序列为 BF-GTCGCATCTTTGGA-TTTAACAA; B4-ACTGGGATCCGACTGACAAC。定量后的 OsHV-1 病毒悬液用于后续实验。

1.2.5 OsHV-1 感染魁蚶实验 从实验室暂养的魁蚶中选取 80 只, 随机分为 4 组: (16 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 高温阴性组与高温阳性组, (10 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 低温阴性组与低温阳性组, 每组分别为 20 只。高温阳性组和低温阳性组通过腹足注射的方式每只魁蚶注射 100 μl 浓度约为 10⁵ copies/ μl 的病毒悬液。高温阴性组和低温阴性组

则注射 100 μl 健康魁蚶组织悬液。注射完成后, 将魁蚶静置 10 min, 随后放入实验箱内。分别在注射后的 0、6、12、24、48 和 72 h 进行组织样品采集。随机从各组中选取 3 只魁蚶, 采集血淋巴样品: 用一次性注射器采集魁蚶血液, 混匀后分装到 1.5 ml EP 管中, 每管 1 ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 800 g 离心 5 min 后, 除去血清, 并加入 800 μl Trizol (TaKaRa), 混匀后–80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 魁蚶感染 OsHV-1 病毒后 *Ets* 的表达研究 按照 Trizol 法提取血细胞总 RNA, 对提取的总 RNA 进行质量和浓度检测后, 以总 RNA 为模板, 用反转录试剂盒(Prime ScriptTM cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)合成模板, 操作方法按照说明书进行。以魁蚶 RL15 作为内参基因(Xin *et al*, 2018), 使用 Primer 5.0 设计 *Ets* 定量引物(表 2), 对 *Ets* 进行 qPCR 检测。检测使用 Universal qPCR Master Mix 试剂盒(NEB), 反应体系(20 μl): SYBR[®] Premix Ex Taq II 10 μl 、前引物 1 μl 、后引物 1 μl 、模板 2 μl 、超纯水 6 μl ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环。每组实验均实验重复 3 次。2^{– $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法对荧光定量 PCR 检测结果进行分析, 利用 SPSS 20.0 对结果进行显著性分析。

表2 *Ets* 基因定量引物
Tab.2 Quantitative primers of *Ets* genes

序列名称 Sequence name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
<i>ETS-1</i>	ETS-1-RT-F	TGTAAGAATGGTGTCTTGGTCCTA
	ETS-1-RT-R	CTGCCACAGTGTAATGTTAGAATCC
<i>ETS-2</i>	ETS-2-RT-F	TTGCCGAACTTCTTAGAAATTCCAC
	ETS-2-RT-R	TCGTCTCGACTTCAAAGTCATACC
<i>ETS-3</i>	ETS-3-RT-F	GAAAGAAGTTACGCAGGAAAGAGCC
	ETS-3-RT-R	GGGTCCATAGCCTTGTTGAACAAAT
<i>ETS-4</i>	ETS-4-RT-F	ATGTCAGTCCAACCTCCAACCAGAT
	ETS-4-RT-R	CATAGAGAACTTGGTAACCGGGAC
<i>ETS-5</i>	ETS-5-RT-F	AATCAGACGCATTTGACGATAACGG
	ETS-5-RT-R	TAGACCCCGAAGACTTGTGGTTATT
<i>ETS-6</i>	ETS-6-RT-F	GGCGGACTGAAGCCAATGAGAGAAT
	ETS-6-RT-R	GTAGGTTTCCATCGACTCGCTTCT
<i>ETS-7</i>	ETS-7-RT-F	ACCAAAGTTGTCATCCCCTTCCAG
	ETS-7-RT-R	ACTAACTGAACTCCTTCATCGCCC
<i>ETS-8</i>	ETS-8-RT-F	AGTTGGTTCAGCAATTTTAACGGAC
	ETS-8-RT-R	TATGACGCCATTTTTTGAACATAT
<i>ETS-9</i>	ETS-9-RT-F	CTCGTCCAATCTATCTATCTTCCA
	ETS-9-RT-R	ATTGCTGTTTGATTCTGGATGGAGT

2 结果与分析

2.1 魁蚶 *Ets* 家族基因的 cDNA 开放阅读框(ORF) 的克隆

从本课题组魁蚶转录组数据库中获得的 9 条 *Ets* 序列片段, 成功克隆获得 9 条 *Ets* 基因的完整的 ORF 序列, 从 *ETS-1* 到 *ETS-9* 对其进行分别命名。这 9 条 *Ets* 基因的开放阅读框(ORF)大小分别为 1065、1290、1569、912、1344、1404、1521、1968 和 1191 bp, 并分别编码 354、429、522、303、447、468、506、655 和 396 个氨基酸(图 1)。

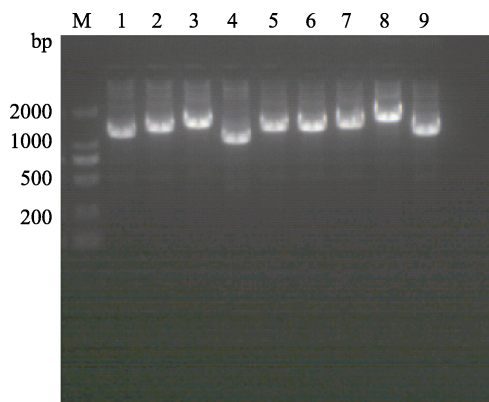


图1 魁蚶 *Ets* 家族基因克隆

Fig.1 The cloning of *Ets* family sequences

M: Marker; 1~9: *ETS-1*~*ETS-9*

2.2 *Ets* 家族进化树分析

通过 NCBI 在线获取其他物种 *Ets* 蛋白序列并与获得的魁蚶 *Ets* 家族基因进行多序列比对, 利用 Mega 7.0 软件建立系统进化树。结果显示, 魁蚶 *Ets* 高度保守, *ETS-1* 与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的 *Elk-1* 转录因子(OWF55447.1)进化关系较近, 与丘疹旋毛虫的 *Elk-1* 转录因子(KRZ74488.1)关系较远; *ETS-2* 与虾夷扇贝的 *Elf-3-like* 转录因子(XP_021347939.1)进化关系较近; *ETS-3* 与虾夷扇贝的 *C-ets-1-like* 转录因子(XP_021366637.1)进化关系较近, 与卡罗莱纳箱龟(*Terrapene mexicana triunguis*)的 *C-ets-1* 转录因子(XP_024065379.1)关系较远; *ETS-4* 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)*C-ets-2* 转录因子(XP_019928533.1)进化关系较近; *ETS-5* 与长牡蛎的 *Elf-3* 转录因子(XP_019917945.1)进化关系较近; *ETS-6* 与虾夷扇贝的 *ETV6-like* 转录因子(XP_021352365.1)进化关系较近; *ETS-7* 与虾夷扇贝的 *GA bindind* 转录因子(XP_021360845.1)进化关系较近; *ETS-8* 与长牡蛎的 *Erg* 转录因子(EKC21903.1)进化关系较近; *ETS-9* 与虾夷扇贝的 *SAM pointed domain containing Ets* (XP_021365446.1)进化关系较近(图 2)。

2.3 OsHV-1 感染后的病毒拷贝数检测

利用实时荧光定量 PCR 检测 OsHV-1 感染魁蚶

后在不同时间段的病毒拷贝数的变化。结果显示, 在低温阴性组和低温阳性组中, 魁蚶均能够正常生长, OsHV-1 拷贝数变化均在 0~100 copies/ng 范围内, 属于本底水平, 病毒没有增殖; 在高温组中, 高温阴性组正常生长, OsHV-1 拷贝数变化在 0~100 copies/ng 范围内, 属于本底水平, 病毒没有增殖, 但在高温阳性组中, 病毒拷贝数随感染时间的延长, 病毒拷贝逐步上升, 在 0~6 h, 病毒拷贝数处于本底水平, 在 6~12 h, 病毒拷贝数增长至 1.0×10^3 copies/ng, 在 12~24 h, 病毒拷贝数增长至约 6.0×10^4 copies/ng, 在 24~48 h, 病毒

拷贝数呈现爆炸式增长, 约为 3.4×10^6 copies/ng, 并持续增长, 在 72 h, 病毒拷贝数达到最大值 (7.4×10^6 copies/ng), 此时魁蚶均已死亡(图 6)。

2.4 魁蚶感染 OsHV-1 病毒后 *Ets* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术对 OsHV-1 感染魁蚶后 *Ets* 基因在不同时间点的表达情况分析。结果显示, 在高温阳性组中, *ETS-1* 和 *ETS-3* 的相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), 其中, *ETS-1* 在 12、24、48 和 72 h 分别比高温阴性组上调 3.9、2.8、7.4 和 15.6 倍; 低

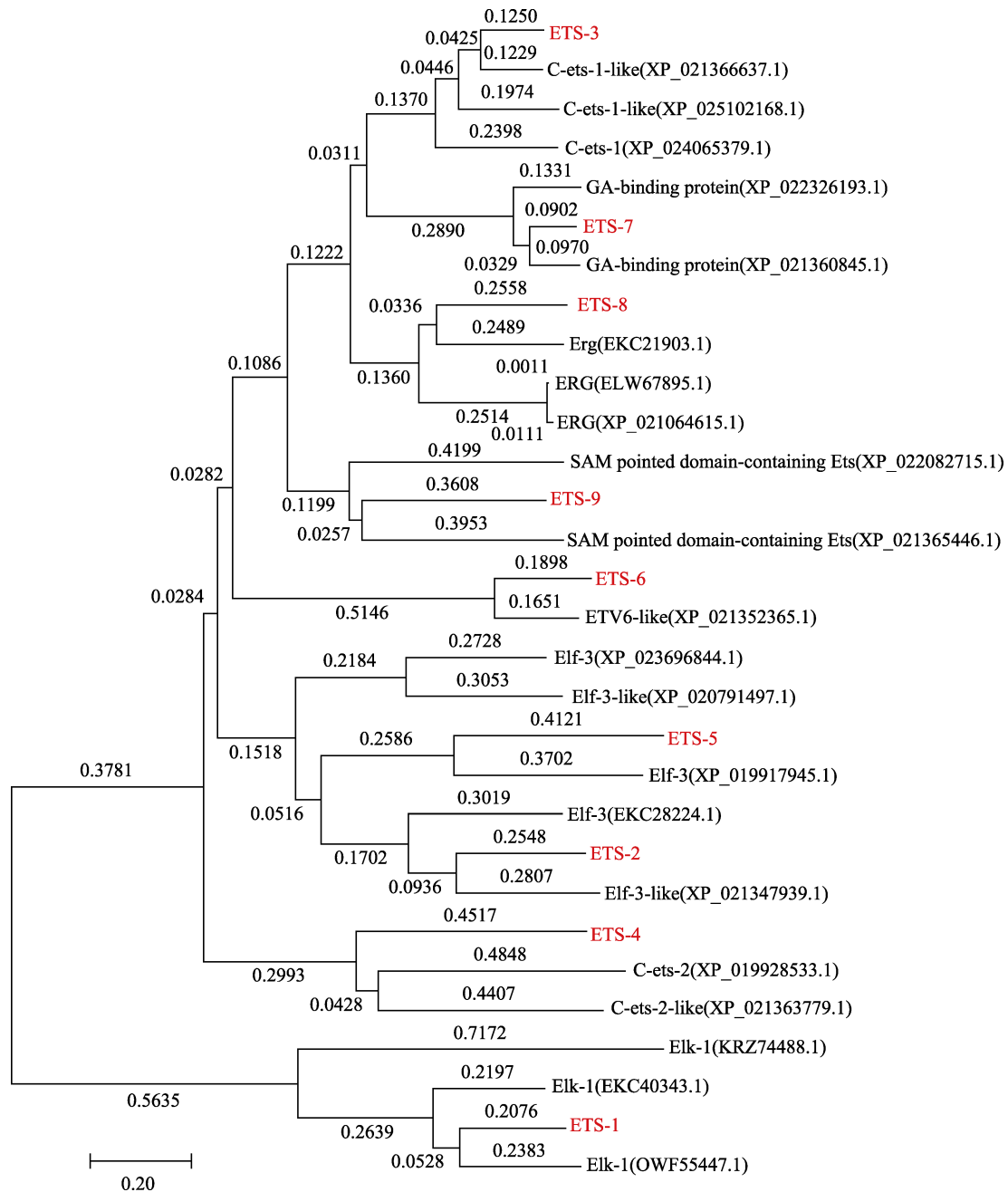


图 2 基于 NJ 法构建的魁蚶 *Ets* 氨基酸序列的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of Ark clam *Ets* constructed based on NJ method


```

1 M D D V G R C G T S S P A L S D S S K C S D N N L
1 ATG GAC GAT GTT GGA CGA TGT GGT ACA TCA TCT CCT GCT TTG TCA GAC TCC TCT AAG TGC TCT GAT AAT AAC CTA
26 D S F N T R L I N A A K S T K G M D S N I T L W Q
76 GAT AGT TTT AAT ACC AGA CTT ATA AAT GCA GCC AAA TCT ACT AAA GGA ATG GAT TCT AAC ATT ACA CTG TGG CAG
51 F L L E L L V G N Q H T H I I O W T N S E G E F K
151 TTT TTA TTG GAA TTA CTC GTT GGT AAC CAA CAC ACA CAC ATA ATA CAA TGG ACA AAC AGT GAA GGA GAG TTC AAA
76 L I N A E E V A K L W G L R K N K N N M N Y D K L
226 CTT ATC AAT GCT GAA GAG GTG GCT AAA CTC TGG GGC CTG AGA AAA AAC AAA AAC AAT ATG AAC TAT GAC AAA CTT
101 S R A L R Y Y Y D K N I I K K V M G Q K F V Y K F
301 AGC AGA GCT TTG AGA TAT TAT TAT GAT AAA AAT ATT ATC AAA AAA GTC ATG GGA CAA AAA TTT GTG TAT AAA TTT
126 V S F P E I V K T E N K I P F K V K M E T L A Q E
376 GTT TCT TTC CCA GAA ATT GTG AAA ACT GAA AAT AAA ATT CCA TTC AAA GTT AAA ATG GAA ACA TTA GCT CAG GAA
151 Y G Q R I F P H F A S Y N A M D I K S S A N Q A T
451 TAT GGA CAG CGC ATA TTT CCT CAC TTT GCC TCA TAC AAT GCC ATG GAT ATC AAA TCG TCT GCT AAT CAA GCA ACC
176 T G T R O G S S P R T D D F S R S P V P K V N V M
526 ACT GGA ACA AGA CAA GGA TCG TCA CCA AGA ACA GAC GAC TTC AGC AGA AGT CCT GTC CCA AAA GTG AAT GTC ATG
201 E T I S D D N K Y L T V K T E S V C S S P G M S L H
601 GAG ACT ATT TCC GAC AAT AAA TAT TTG ACT GTG AAA ACA GAG TCT GTT TGT TCC AGT CCT GGC ATG TCA CTA CAT
226 Q I S P T T T V T V O K P K P I P L S L S L A D T
676 CAG ATA TCA CCG ACA ACT ACA GTG ACT GTC CAG AAA CCG AAG CCT ATT CCG TTA TCA TTA AGT TTA GCG GAT ACA
251 S S T A L T A A L G V P V P S P K I A S S T F T T
751 TCA TCA ACT GCC TTA ACT GCC GCT TTA GGT GTA CCA GTG CCT AGT CCA AAA ATA GCT TCA TCG ACT TTC ACG ACG
276 P L V L A S P V I G P R T P F L H F W S S L S P J
826 CCG TTA GTG CTT GCA AGT CCT GTA ATA GGA CCA AGG ACA CCA TTC TTA CAT TTT TGG AGC TCT TTG AGC CCA ATA
301 T M S P R L A A T T S A F P F P A F A T N O M T V T
901 ACA ATG AGT CCT CGG TTG GCT ACA ACG TCT GCC TTC CCA TTT CCC GCC TTT GCT ACA AAT CAA ATG ACT GTT TCG
326 P M A L P H F S N V E S L A T P A L T S P T R K J
976 CCA ATG GCG TTG CCG CAT TTT TCT AAT GTA GAA TCT CTT GCC ACG CCG GCA TTG ACT TCA CCA ACA AGA AAG ATA
351 S C V L *
1051 TCTTGTGTGTTATGA

```

图 3 ETS-1 碱基和氨基酸序列

Fig.3 The nucleotide and the deduced amino acid sequence of ETS-1

红色下划线表示 ETS 结构域氨基酸序列；黑色下划线表示 BLLF1 superfamily 结构域氨基酸序列
The red underlined indicates the amino acid sequence of the ETS domain; the black underline indicates the amino acid sequence of the BLLF1 superfamily domain

```

1 M D I E A L Q S E Y S M D N V E F F A Q E T K K S
1 ATG GAC ATT GAA GCA TTG CAG TCA GAA TAC AGC ATG GAC AAT GTC GAA TTT TTT GCC CAG GAG ACG AAA AAG TCG
26 K N R P P R I P K V V T Y D P E L T R E I D R L N
76 AAA AAT CGT CCA CCC CGG ATT CCG AAA GTG GTG ACC TAT GAC CCA GAG TTG ACT AGA GAA ATT GAC CGC CTG AAT
51 C M L T R Q D S I D D H R V P N L G S V Q K V P S
151 TGT ATG TTG ACC AGA CAA GAC AGC ATA GAT GAC CAC CGA GTA CCT AAC CTT GGC AGC GTG CAG AAG GTC CCG TCG
76 I S D M D E D N T D I C A T Q V P P L T P G T T Q
226 ATA TCG GAC ATG GAT GAA GAC AAT GAC ATT CCA GCC ACA CAA GTG CCT CCG CTA ACC CCG GGA ACC ACA CAG
101 K M S Q A L L D S F K S F E K D Q Q R F N I P K D
301 AAA ATG TCC CAA GCC TTG CTG GAC AGT TTT AAA AGT TTT GAG AAA GAC CAA CAG AGG TTT AAT ATT CCA AAA GAT
126 P A R W G E L H V V O W L H W A I O E F S L E G J
376 CCA GCC AGG TGG GGA GAG TTA CAT GTT GTA CAG TGG TTA CAT TGG GCC ATC CAG GAG TTC AGT CTT GAG GGG ATC
151 N M G N F A M N G O E L V K M E K E N F L K L A P
451 AAC ATG GGG AAT TTT GCC ATG AAC GGA CAA GAA CTA GTA AAG ATG GAG AAG GAA AAC TTC CTT AAG TTG GCC CCA
176 P F M M G D I L W E H L D I L O K E V T Q E R A S L
526 CCC TTC ATG GGG GAT ATC CTA TGG GAA CAT TTA GAT ATT TTA CAG AAA GAA GTT ACG CAG GAA ACC GCA TCA TTA
201 C N V T P S N Y S E P V C M P E F G E Q F V Q Q G Y
601 TGT AAC GTC CCA TCT AAT TAT AGC GAA GTA TGT ATG CCC GAG TTT GGA GAA CAA TTT GCT CAA CAA GGC TAT
226 G P P E H P V A Q V P T S K S Y M D N K C T Y N Q
676 GGA CCC CCA GAA CAC CCA GTT GCA CAG GTT CCA ACG AGT AAA TCA TAC ATG GAC AAT AAA TGT ACT TAC AAC CAA
251 I A E S M Q A L N N D V S D I I N S N Y E D T S
751 ATA GCA GAA TCC ATG CAG GCA CTT AAT AAT GAT GTC AGC AGT GAC ATC ATC AAC AGT AAC TAC GAG GAC ACG TCT
276 D Y Q S L E N V N Q N N N Y Y D H S P T D F G Y P I I
826 GAT TAC CAA AGT TTG GAA AAT GTC AAT CAA AAT AAT TAC TAC GAC CAC AGT CCA ACG GAT TTC TAT CCC ATA ATA
301 P E Q K Y R P P I P G P E N L C Q R G Q F M R Q D
901 CCA GAA CAG AAG TAC CGC CCA CCC ATT CCA GGC CCA GAA AAC TTG TGT GAG AGA GGT CAG TTT ATG CGA CAA GAT
326 S T H A P D S Y Y D Q Q P Y Q M V P T I K Q E C Q
976 TCC ACA CAT GCT CCT GAC AGT TAC TAT GAC CAG CAG CCA TAT CAG ATG GTT CCT ACA ATC AAA CAA GAG TGC CAG
351 W S T Q D C A Q D L S D S W S S S D L R N G L S
1051 TGG TCA ACC CAG GAC TGT GCT CAG GAC CTA AGT GAT AGC TGG TCA TCT TCT GAC CTT AGA AAC GGT CTG TCC AGC
376 G G Y R S I Q S S P T D H Y P P H L D G K P M I Q
1126 GGC GGA TAT AGA AGT ATC CAG TCA TCA CCA ACA GAT CAT TAC CCG CCA CAT CTT GAC GGG AAA CCA ATG ATA CAG
401 A A A L A G Y S G S G P I O L W O F L L E L L T D
1201 GCA GCT GCC CTG GCT GGA TAT TCA GGG AGT GGA CCA ATC CAA TTG TGG CAG TTT CTT GAA CTA CTG ACA GAC
426 K T C O H F I S W T G D G W E F K L S D P D E V A
1276 AAA ACA TGC CAG CAT TTT ATA AGC TGG ACT GGA GAT GGT TGG GAA TTC AAA TTA TCC GAT CCA GAC GAG GTA GCC
451 R R W G I R K N K P K M N Y E K L S R G L R Y Y Y
1351 AGA AGA TGG GGG ATC CGC AAA AAC AAG CCC AAA ATG AAT TAC GAA AAG TTA AGC CGT GGA CTG AGA TAT TAT TAT
476 D K N I I H K T A G K R Y V Y R F V C D L Q S L L
1426 GAT AAG AAT ATC ATA CAC AAG ACA GCG GGA AAA CGT TAC GTG TAT CGC TTT GTC TGC GAT TTA CAA AGC CTG CTG
501 G Y T P E E L F E A C D I K P Q A D K D D E *
1501 GGA TAC ACT CCA GAA GAG TTG TTT GAA GCC TGT GAT ATC AAG CCT CAG GCC GAC AAA GAT GAT GAG TGA

```

图 4 ETS-3 碱基和氨基酸序列

Fig.4 The nucleotide and the deduced amino acid sequence of ETS-3

红色下划线表示 ETS 结构域氨基酸序列；黑色下划线表示 SAM superfamily 结构域氨基酸序列
The red underlined indicates the amino acid sequence of the ETS domain; the black underline indicates the SAM amino acid sequence of the superfamily domain

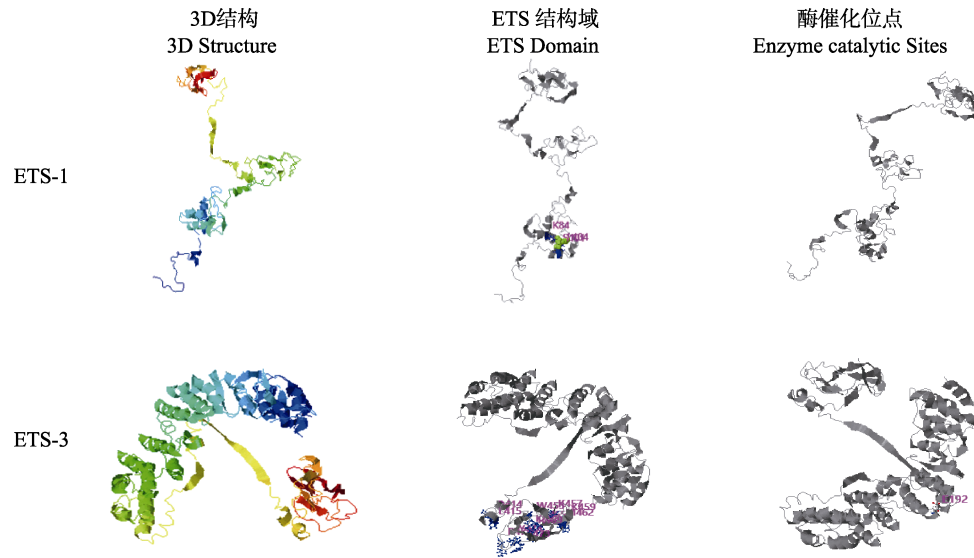


图 5 Ets 蛋白三维结构及功能位点

Fig.5 The three-dimensional structure and function site of Ets

温阴性组与低温阳性组 *ETS-1* 相对表达量无显著差异; 低温阴性组与高温阴性组 *ETS-1* 相对表达量无显著差异(图 7A)。在高温阳性组中, *ETS-3* 在 48 h 后相对表达量显著上调, 48 和 72 h 分别比高温阴性组上调 3.0 和 22.6 倍; 低温阴性组、低温阳性组和高温阴性组 *ETS-3* 相对表达量无显著差异(图 7C)。在低温阳性组中, *ETS-4* 和 *ETS-8* 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), 其中, *ETS-4* 在 24、48 和 72 h 分别比低温阴性组上调 4.3、7.0 和 8.2 倍; 高温阳性组、高温阴性组和低温阴性组 *ETS-4* 相对表达量无显著差异(图 7D)。*ETS-8* 在低温阳性组 24 和 48 h 分别比低温阴性组上调 2.4 和 1.8 倍; 高温阳性组、高温阴性组和低温阴性组 *ETS-8* 相对表达量无显著差异(图 7H)。其余 5 条 *Ets* 转录因子(*ETS-2*、*ETS-5*、*ETS-6*、*ETS-7*、*ETS-9*)相对表达量变化无明显规律(图 7B、图 7E、图 7F、图 7G、图 7I)。

2.5 *ETS-1* 和 *ETS-3* 生物信息学分析

对 *ETS-1* 和 *ETS-3* 进行生物信息学分析, 结果显示, *ETS-1* 和 *ETS-3* 除了含有 ETS 结构域外, *ETS-1* 还含有 BLLF1 superfamily 结构域(图 3), 而 *ETS-3* 还含有 SAM superfamily 结构域氨基酸序列(图 4), 通过 I-TASSER 对 *ETS-1*、*ETS-3* 3D 结构进行预测, *ETS-1* 的结构主要由 4 条 α -螺旋环绕成的复杂结构, ETS 结构域是保守的“螺旋-转角-螺旋”结构, 无酶催化位点; *ETS-3* 的结构主要是由 11 个 α -螺旋构成的复杂结构, ETS 结构域是保守的“螺旋-转角-螺旋”结构, 并且具有酶催化位点(图 5)。

3 讨论

Ets 转录因子的一个显著特征是均含有 1 个约 85 个氨基酸残基的进化保守的 ETS 结构域, 该结构域能介导 *Ets* 蛋白与富含嘌呤的序列为 GGAA/T 和额外的侧翼核苷酸 DNA 序列发生特异性结合, 进而参与靶基因的转录调控(Graves *et al*, 1998)。本研究对魁蚶 *Ets* 家族基因进行了克隆鉴定, 共获得了 9 个家族成员分子, 生物信息学分析表明, 其基因 ETS 结构域高度保守。

Ets 家族蛋白是 MAPK 信号通路下游级联信号转导的参与者(Oikawa *et al*, 2003; Wang *et al*, 2017; Wasyluk *et al*, 1998)。在高等生物中, *Ets* 转录因子不仅参与正常细胞的生长、凋亡、分化等生理过程(Sharrocks *et al*, 2001), 还可参与病毒的转录复制过程(Panagoulis *et al*, 2017), 例如, *Ets* 家族蛋白可参与调控 HIV-1 病毒复制过程(Seth *et al*, 1993); 人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 长末端重复(LTR)的远端增强子区域对 HIV 复制至关重要, 其包含相邻的 E-box 和 *Ets* 2 个结合位点。Sieweke 等(1998)发现, *Ets-1* 与 USF-1(Upstream stimulatory factor)蛋白相互作用, 并分别与 HIV-1 病毒的 E-box 和 *Ets* 结合位点(-130~-166)结合, 激活病毒复制。*Ets* 在贝类中的功能有待研究(Ma *et al*, 2009)。*OsHV-1* 是目前贝类中流行的主要病毒性病原, 频繁造成全球范围内养殖贝类的大规模死亡。前期分析 *OsHV-1* 基因组序列时, 鉴定出诸多 *Ets* 转录因子结合位点, 初步推断魁蚶 *Ets* 转录因子可能参与病毒的复制调控。魁蚶在高温环境中感染

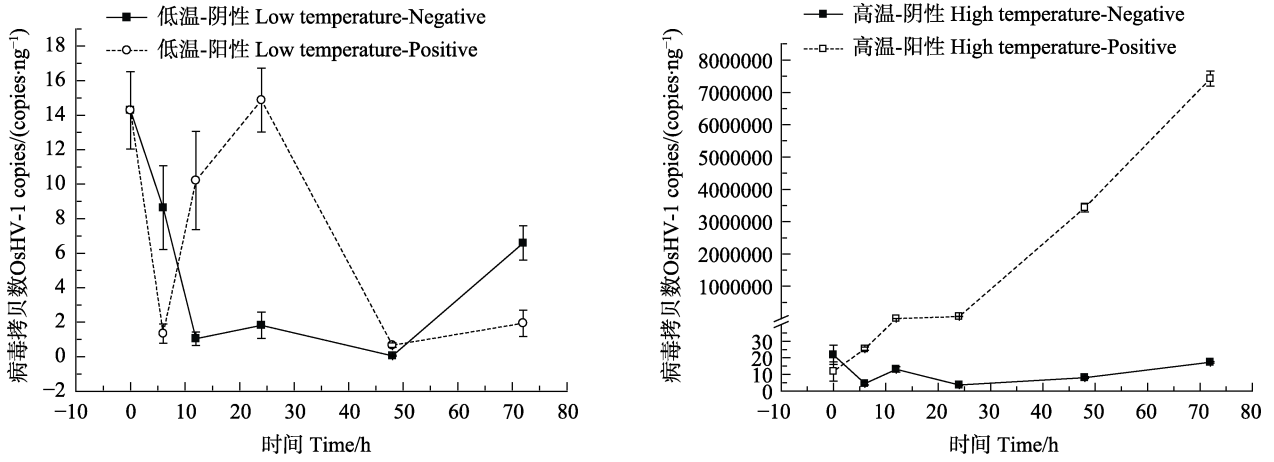


图6 OsHV-1感染后魁蚶血液中病毒拷贝数变化

Fig.6 Kinetics of virus DNA detection in hemocytes of *S. broughtonii* after OsHV-1 infection

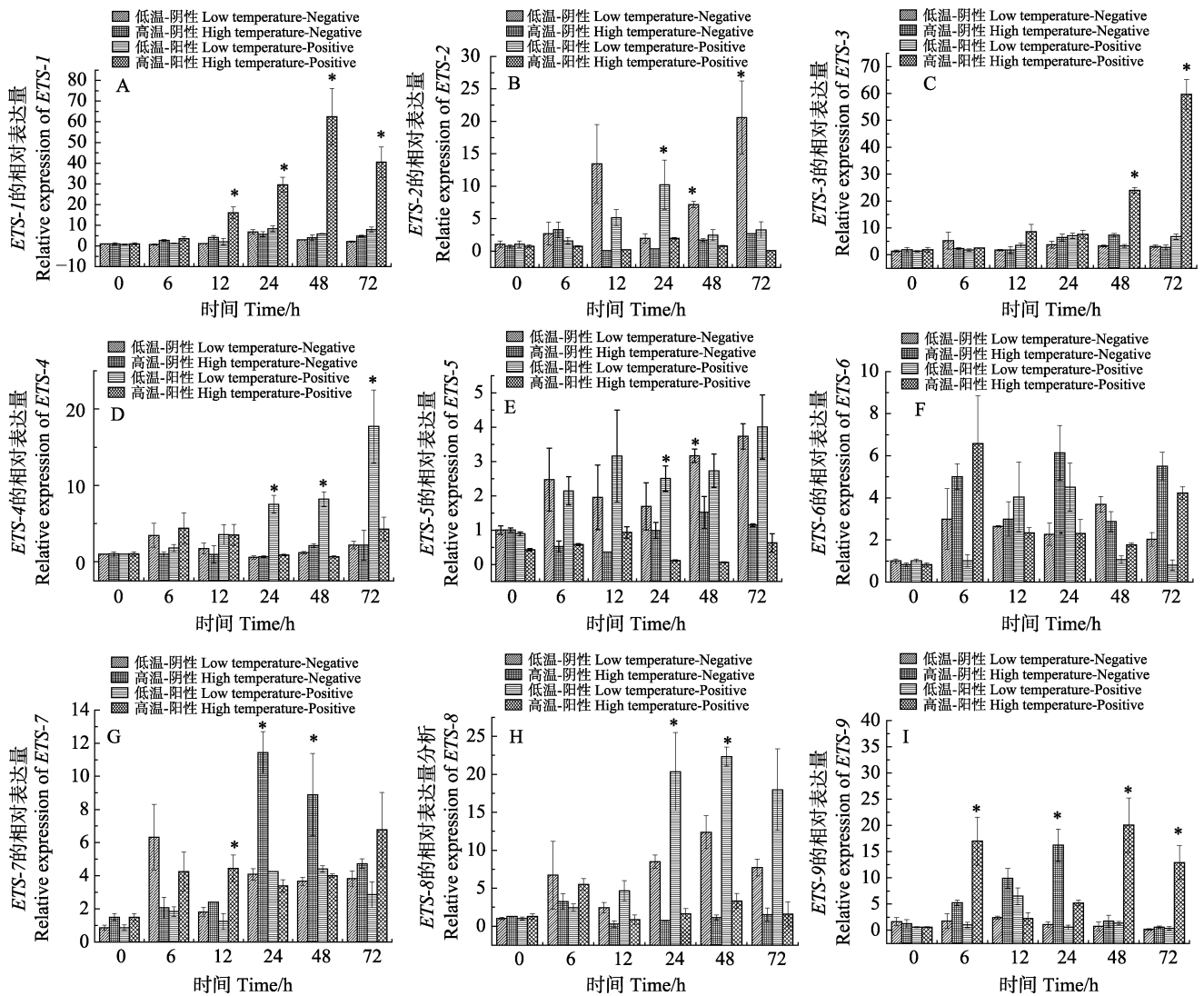


图7 OsHV-1感染后魁蚶血细胞 *Ets* 表达水平

Fig.7 Temporal expression of the *Ets* transcripts in infected blood cell of OsHV-1

*表示实验组和对照组之间差异显著($P < 0.05$)

* indicated the difference between experiment and control group was statistically significant ($P < 0.05$)

OsHV-1 后, *ETS-1* 和 *ETS-3* 相对表达量显著上调, 与病毒的拷贝数增长趋势呈正相关。魁蚶在低温环境中感染 OsHV-1 后, 病毒拷贝数不增加, *ETS-1* 和 *ETS-3* 的相对表达量处于本底水平状态。以上结果表明, *ETS-1* 和 *ETS-3* 与病毒的复制密切相关, 可能参与了病毒的复制调控过程。但它是通过何种机制参与的、在病毒复制过程中是否起主导作用仍需要进一步研究。

本研究成功克隆出魁蚶 9 个 Ets 转录因子家族成员。通过 OsHV-1 人工感染魁蚶后对 9 个家族成员基因表达模式分析, 初步确定了 *ETS-1* 和 *ETS-3* 参与病毒的复制调控。为深入研究魁蚶在夏季感染 OsHV-1 后暴发大规模死亡提供了一定的理论数据。

参 考 文 献

- Barbosa-Solomieu V, Dégremont L, Vázquez-Juárez R, *et al.* Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research*, 2005, 107(1): 47–56
- Bosselut R, Duvall JF, Gégonne A, *et al.* The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *Embo Journal*, 1990, 9(10): 3137–3144
- Elston R. Bivalve mollusc viruses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 393–403
- Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the *ets* family of transcription factors. *Advances in Cancer Research*, 1998, 75: 1–57
- Hine PM, Thorne T. A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(1): 67–78
- Hu ZF, Ren SJ, Li SG. Research progress of oyster herpes virus (OsHV-1). *Fisheries Science and Technology Information*, 2017, 44(5): 259–264, 267 [胡宗福, 任绍杰, 李树国. 牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)研究进展. *水产科技情报*, 2017, 44(5): 259–264, 267]
- Jouaux A, Lafont M, Blin JL, *et al.* Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 590
- Li YY, Liu YG, Liu XL, *et al.* The taxonomic status of Chinese population of *Scapharca broughtonii* based on sequences of *COI* and *12S rRNA* genes. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 73–80 [李瑶瑶, 刘云国, 刘晓玲, 等. 基于线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列的魁蚶中国群体分类学地位研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 73–80]
- Liang C, Yang AG, Liu ZH, *et al.* RAPD analysis of genetic variations in four geographical populations of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 59–64 [梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 59–64]
- Liu HM, Wu B, Liu ZL, *et al.* Genetic diversity and geographic population structures of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 92–99 [刘寒苗, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 92–99]
- Liu XY, Xu HZ. Seedling technique of Ark clam (*Scapharca broughtonii*) at room temperature. *Scientific Fish Farming*, 2002(10): 14–15 [刘锡胤, 徐惠章. 魁蚶常温育苗技术. *科学养鱼*, 2002(10): 14–15]
- Ma H, Wang J, Wang B, *et al.* Characterization of an ETS transcription factor in the sea scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 953–958
- Mao XY, Yan ZJ, Shao YQ. A new exploration of artificial seedling and seedling preservation in Ark clams (*Scapharca broughtonii*). *Hebei Fisheries*, 2007(4): 38–39 [毛雪英, 阎子娟, 邵雁群. 魁蚶人工育苗及保苗的新探索. *河北渔业*, 2007(4): 38–39]
- Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 2003, 303(1–2): 11–34
- Panagoulas I, Karagiannis F, Aggeletopoulou I, *et al.* Ets-2 acts as a transcriptional repressor of the human immunodeficiency virus type 1 through binding to a repressor–Activator target sequence of 5'-LTR. *Frontiers Immunology*, 2018, 8: 1924
- Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, *et al.* Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the RAF/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(3): 301–305
- Ren WC, Chen HX, Renault T, *et al.* Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal*, 2013, 10: 110
- Renault T, Lipart C, Arzul I. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(6): 369–376
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, *et al.* First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*, 2012, 324(3): 303–306
- Ruelas D, Greene W. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, 2013, 155(3): 519–529
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, *et al.* Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 2010, 153(1): 92–99
- Seth A, Hodge DR, Thompson DM, *et al.* ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *Aids Research and Human Retroviruses*, 1993, 9(19): 1017–1023
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, *et al.* The ETS-domain transcription factor family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1997, 29(12): 1371–1387

- Sieweke MH, Tekotte H, Jarosch U, *et al.* Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo Journal*, 1998, 17(6): 1728–1739
- Suico MA, Shuto T, Kai H. Roles and regulations of the ETS transcription factor ELF4/MEF. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2017, 9(3): 168–177
- Wang B, Krall EB, Aguirre AJ, *et al.* ATXN1L, CIC, and ETS transcription factors modulate sensitivity to MAPK pathway inhibition. *Cell Reports*, 2017, 18(6): 1543–1557
- Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: Nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Science*, 1998, 23(6): 213–216
- Webb SC, Fidler A, Renault T, *et al.* Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 2007, 272(1–4): 126–139
- Xia JY, Bai CM, Wang CM, *et al.* Complete genome sequence of *Ostreid herpesvirus-1* associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal*, 2015, 12: 110
- Xin LS, Huang BW, Bai CM, *et al.* Validation of housekeeping genes for quantitative mRNA expression analysis in OsHV-1 infected Ark clam, *Scapharca broughtonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 155: 44–51
- Zeng H, Yang Y, An Y, *et al.* Physiological functions of Ets family of transcription factors. *China Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(12): 1645–1650 [曾红, 杨洋, 安输, 等. Ets 转录因子的生理作用研究进展. *中国药理学通报*, 2017, 33(12): 1645–1650]
- Zhang QG, Wang RC, Wang XZ, *et al.* Selective breeding of strain of *Arca (Anadara) inflata* reeve. *Modern Fisheries Information*, 2007, 22(7): 25–26 [张启刚, 王如才, 王兴章, 等. 魁蚶(*Arca (Anadara) inflata* Reeve)品系选育. *现代渔业信息*, 2007, 22(7): 25–26]

(编辑 马瑾艳)

Cloning of Nine Genes in the Ets Family of Ark Clam (*Scapharca broughtonii*) and Their Expression in Response to Oyster Herpes Virus (OsHV-1) Infection

WEI Zhixin^{1,3}, XIN Lusheng^{2,3}, BAI Changming^{2,3}, LI Yanan³, ZHANG Shumin³,
LI Chenghua¹, WANG Chongming^{2,3①}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;

3. Key Laboratory of 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)

Abstract Ets transcription-factor networks represent a model for how combinatorial gene expression is achieved. The characteristic feature of Ets factors is the conserved ETS domain (Helix-Turn-Helix). Thus, the Ets proteins bind to a core GGAA/T consensus sequence and regulate expression of several genes and play an important role in various cellular functions (mitosis, growth, development, differentiation, and apoptosis) and the regulation of immunity. In this experiment, 9 *Ets* genes (named *ETS 1~ETS9*, respectively) of the Ark clam (*Scapharca broughtonii*) were successfully obtained by gene cloning technology, and the open reading frames (ORFs) were 1065 bp, 1290 bp, 1569 bp, 912 bp, 1344 bp, 1404 bp, 1521 bp, 1968 bp, and 1191 bp, respectively. Moreover, they encoded respectively 354, 429, 522, 303, 447, 468, 506, 655, and 396 amino acids. Evolutionary relationships of taxa showed that all genes in this chapter belonged to the *Ets* family genes. The qPCR detection showed that the expression of two *Ets* genes (*ETS-1*, *ETS-3*) was significantly increased. Thus, the present study showed that the Ark clam *ETS-1* and *ETS-3* are involved in the replication process of the OsHV-1 under high temperature conditions (16±2)°C. In conclusion, the results of this study provide a scientific basis for further study concerning the large number of deaths of Ark clams due to infection with OsHV-1 in summer.

Key words *Scapharca broughtonii*; Ets family; OsHV-1; Gene cloning; Temperature

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180507002

http://www.yykxjz.cn/

张恒宇, 柳逸群, 葛源. 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆及其参与调控程序性细胞死亡研究. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 131-137

Zhang HY, Liu YQ, Ge Y. Cloning of the metacase type I gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its involvement in the regulation of programmed cell death. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 131-137

莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆 及其参与调控程序性细胞死亡研究*



张恒宇¹ 柳逸群² 葛源^{1①}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘要 Metacaspase 是在原生动物、真菌和植物中发现的一种具有底物精氨酸/赖氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶。根据蛋白质结构特征可将 metcaspase 分为 type I 与 type II 两种类型, 均参与调控多种植物与原生动物程序性细胞死亡。本研究根据 GenBank 数据库莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) type I metacaspase 基因 (GenBank No. XM_001696904) 序列, 采用巢式 PCR 克隆获取 type I metcaspase 基因开放阅读框 (ORF) 序列并命名为 CrMC1。CrMC1 ORF 全长 987 bp, 推测编码 1 个包含 405 个氨基酸的蛋白质。通过与已知物种 type I metacaspase 氨基酸序列进行同源序列比对发现, CrMC1 具有高度保守的 p20、p10、连接区结构域以及精氨酸、半胱氨酸活性中心位点。研究显示, 在 H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡过程中, CrMC1 表达量显著提高 ($P < 0.05$), 2 h 后达到峰值, 3 h 时下降至对照组同一水平。结果表明, 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 CrMC1 参与 H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡调控。

关键词 Metacaspase; 莱茵衣藻; 程序性细胞死亡

中图分类号 S9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0131-07

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是绿藻门 (Chlorophyceae)、团藻目 (Volvocales)、衣藻属 (*Chlamydomonas*) 的一种单细胞真核微藻, 具有良好的环境适应能力、繁殖能力以及生长速率, 能在固体培养基上形成单藻落, 也可在液体中培养, 有“绿色酵母”之称 (谢传晓等, 2003; 孙晓梅等, 2004; 耿予欢等, 2007)。目前, 莱茵衣藻全基因组测序已经完成 (Merchant *et al*, 2007), 已成功建立针对莱茵衣藻线粒体、叶绿体与细胞核基因组的遗传操作系统和 CRISPR/Cas9 介导的基因组精确编辑系统 (Greiner *et al*,

2017)。此外, 目前已建立莱茵衣藻光合作用、呼吸作用、细胞分裂、养分吸收、辐射、紫外线和化学诱变下的基因组稳定性和适应性反应、耐重金属植物修复、盐度、水温、渗透压和氧化胁迫应激等重要生理过程研究的模型 (Harris, 2001; Hanikenne, 2003; Hema *et al*, 2007; Dimova *et al*, 2008)。因此, 莱茵衣藻已经成为藻类遗传学、生物化学和分子生物学研究的重要模式物种 (徐田枚, 2007; Harper, 1999; Wu *et al*, 1997)。

植物程序性细胞死亡 (Programmed cell death) 是指与动物细胞凋亡 (Apoptosis) 同源的植物细胞死亡

* 863 计划生物医药领域青年科学家专项基金 (2015AA020903) 和青岛市科技计划基础研究项目 (13-1-4-253-jch) 共同资助 [This work was supported by China National High-Tech Research and Development Programme (863 Programme) (2015AA020903), and Qingdao Municipal Science and Technology Project Basic Science Research Programme (13-1-4-253-jch)]. 张恒宇, E-mail: 854636605@qq.com

① 通讯作者: 葛源, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-05-07, 收修改稿日期: 2018-05-17

方式,普遍存在于植物发育和应对病原感染、干旱等生物或非生物胁迫过程中(Reape *et al*, 2008)。然而,动物细胞凋亡通路中关键调控与执行基因家族胱冬肽酶(Cysteine aspartic acid specific protease, caspase)家族在植物中并不存在(van Doorn *et al*, 2005; Ge *et al*, 2016)。研究表明,植物中存在一种 caspase 同系蛋白 metacaspase。Metacaspase 是非后生动物完成正常生理学反应所必需的多功能蛋白酶,且植物和原生动物的氧化应激诱导的程序性细胞死亡过程都依赖于 metacaspase(Vercammen *et al*, 2007)。根据其结构特征, metacaspase 又可以分为 type I 与 type II 两类(马聪等, 2012)。其中, type I metacaspase 具有富含脯氨酸重复基序的 N 末端前结构域,并且包含锌指结构。而 type II metacaspase 缺乏前结构域,但在大(p20)、小(p10)亚基之间具有较长连接区。在原生动物和真菌中,目前仅发现了 type I metacaspase,而高等植物基因组中同时具有 type I 与 type II metacaspase。Metacaspase 活性中心普遍具有保守的组氨酸-半胱氨酸结构,其中半胱氨酸残基作为水解底物肽键的亲核体。

近年的研究表明,单细胞藻类在生物和非生物胁迫条件下,亦可发生程序性细胞死亡。莱茵衣藻经被用于程序性细胞死亡研究,并获得了成功(Moharikar *et al*, 2006; Zuo *et al*, 2012; Pérezpérez *et al*, 2010; Yordanova *et al*, 2013; Sirisha *et al*, 2014)。全基因组序列预测显示,莱茵衣藻基因组中同时存在 type I 与 type II metacaspase 基因,其结构与功能尚不明确。本研究通过巢式 PCR 克隆获得莱茵衣藻 type I metacaspase ORF 序列,利用生物信息学技术预测其氨基酸序列并进行同源性分析,继而利用荧光定量 PCR 技术分析 type I metacaspase 基因在 H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡过程中的表达量变化。本研究为更好地阐明植物与微藻程序性细胞死亡的分子机制及其生物演化关系提供理论依据,同时为高品质微藻藻种选育和微藻增殖工业及应用(何舟等, 2015; 乔洪金等, 2016)提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 藻种培养

野生型莱茵衣藻藻种 cc-125 mt+购自美国明尼苏达大学莱茵衣藻种质库(Chlamycolection, University of Minnesota, 美国)。藻种接种至含 100 μmol/L 氮苜青霉素的固体 TAP 培养基平板,挑取单克隆接种于液体 TAP 培养基中,置于 25℃、光照强度 2000 lx

的光照培养箱振荡培养(100 r/min)至对数生长期(OD_{434 nm}=1),光/暗周期为 12 h/12 h。

1.2 莱茵衣藻总 RNA 提取与 cDNA 合成

藻种离心收集后,采用液氮反复冻融法破壁,采用 QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取莱茵衣藻总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳法和 Qubit 3.0 分光光度计鉴定总 RNA 质量与浓度。cDNA 合成采用 M-MLV 反转录酶试剂盒进行。利用莱茵衣藻 18 rRNA (GenBank No. AY665726)作为内参。

1.3 CrMC1 ORF 巢式 PCR 扩增

根据 NCBI GenBank 数据库中莱茵衣藻 type I metacaspase cDNA 序列(GenBank No. XM_001696904)设计引物,进行两步法巢式 PCR 克隆,引物序列见表 1。使用 Nucleospin Gel and PCR Clean-up 试剂盒纯化第二步 PCR 产物,并进行 poly(A)-tailing 添加粘末端反应,进而将其连接到 pGEM-T 载体中进行蓝白斑筛选。筛选后提取质粒并送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序、组装并输入 BLAST 进行验证,证实所获序列为莱茵衣藻 type I metacaspase ORF 序列,命名为 CrMC1。

表 1 莱茵衣藻 metacaspase type I ORF 克隆引物
Tab.1 Primers for *C. reinhardtii* metacaspase type I ORF cloning

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CrMC1-NI-F1	TGTATAAGGCGTCCCTTGAGCCAC
CrMC1-NI-R1	CTTGGGTTGGGGTTACCG
CrMC1-NII-F1	ATGTATGGTTATCCCCCGC
CrMC1-NII-R1	TTAGATGTAAAGGCGGCTGG

1.4 生物信息学分析

利用在线 SMS 生物软件(<http://www.bio-soft.net/sms/>),根据 CrMC1 ORF 的 DNA 序列推测 CrMC1 氨基酸序列,获得包含 405 个氨基酸的序列。进而利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与从 NCBI 数据库获得的其他物种 metacaspase 构建系统进化树,物种名与蛋白编号见表 2。此外,通过将 CrMC1 氨基酸序列与自 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)获得的 3 种拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) type I metacaspase (AtMC1, No. Q7XJE6; AtMC2, No. Q7XJE5; AtMC3, No. Q9FMG1)氨基酸序列的同源比对,预测其功能域。

1.5 H₂O₂ 诱导莱茵衣藻细胞死亡率测定

将处于生长对数期(OD_{434 nm}=1)的莱茵衣藻

表 2 进化树所用 metacaspase 基因序列
Tab.2 Metacaspase gene sequence of phylogenetic tree

物种名 Species	拉丁学名 Latin name	NCBI 序列号
矮牵牛(type I)	<i>Petunia x hybrid</i>	AFK93070.1
矮牵牛(type II)	<i>Petunia x hybrid</i>	AFK93071.1
爱尔兰海藻	<i>Chondrus crispus</i>	XP_005717184.1
本生烟草	<i>Nicotiana benthamiana</i>	ABD47740.1
扁藻	<i>Tetraselmis sp.</i>	JAC78936.1
番茄	<i>Solanum lycopersicum</i>	AFY10520.1
拟南芥(type I)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q7XJE5.1
拟南芥(type II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O64517.1
玉山筷子芥	<i>Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata</i>	EFH64039.1
橡胶树	<i>Hevea brasiliensis</i>	ADM52185.1
小麦(type I)	<i>Triticum aestivum</i>	ANH79181.1
小麦(type II)	<i>Triticum aestivum</i>	ACY82389.1
团藻(type II)	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	XP_002948071.1
团藻(type II)	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	XP_002946738.1
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i>	ACG59943.1
玉米	<i>Zea mays</i>	NP_001151968.1
挪威云杉(type II)	<i>Picea abies</i>	CDG41615.1
挪威云杉(type II)	<i>Picea abies</i>	CAD59226.2
樟子松	<i>Pinus sylvestris</i>	ACB11499.1

cc125 mt+分别置于实验组(1 mmol/L H₂O₂)与对照组进行培养,并测定 0~480 min 内的死亡率。死亡率测定采取 SYTOX green 染料进行。利用正置荧光显微镜观察计数至少 200 个细胞,根据 SYTOX green 标记阳性为死亡细胞、隐性为存活细胞进行细胞计数,并计算死亡率。

1.6 荧光定量 PCR

提取不同时间点实验组与对照组莱茵衣藻总 RNA,并反转录获得 cDNA,利用荧光定量 PCR 法进行 CrMC1 表达量分析。荧光定量 PCR 反应使用 SensiFAST SYBR No-ROX 试剂盒在 ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 所得数据利用 18S rRNA 作为内参基因,按照 2^{-ΔΔCt} 法处理数据。所得数据利用 Microsoft Excel 2010 软件进行平均值、标准差和差异显著性分析($P < 0.05$)并作图。CrMC1 与内参基因 18S rRNA (Nguyen *et al.*, 2011)引物见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 引物
Tab.3 Primers used in qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CrMC1-QF1	ATTAGCACCAAGGCCAACAT
CrMC1-QR1	GTTTCAGCTCGTCATCCACAA
CrMC2-QF1	GCAAGAAGGCTGTCCCTCATC
CrMC2-QR1	GCTCTTGTCGGTGTCAATCA
18S RNA-QF	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
18S RNA-QR	ACCGAATCAACCTGACAAG

2 结果

2.1 CrMC1 基因克隆及进化分析

如图 1A 所示,本研究通过巢式 PCR 克隆到莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 ORF 全长序列,包含 987 bp,推测编码 405 个氨基酸,命名为 CrMC1。为分析 CrMC1 进化关系,本研究从 NCBI 数据库中筛选出已分类的植物 metacaspase 蛋白氨基酸序列,包括拟南芥、小麦 (*Triticum aestivum*)、鸡 (*Gallus gallus domesticus*)、挪威云杉 (*Picea abies*)、团藻 (*Volvox carteri f. nagariensis*) 等(表 1),使用 Vector NTI 11.5 软件的 ClustalX 法进行同源性分析,并构建系统进化树(NJ)。如图 1B 所示,系统进化树中的 19 个 metacaspase 成员形成了 2 个大分支,其中, CrMC1 与所有已知 type I metacaspase 位于同一分支内,故可推测 CrMC1 属于 type I metacaspase。此外,在 type I metacaspase 分支中, CrMC1 与团藻目的 *Volvox carteri f. nagariensis* metacaspase 具有最高相似性,与植物例如拟南芥 type I metacaspase AtMC2 亲缘关系较远,提示其位于生物演化的初级地位。

2.2 CrMC1 蛋白结构域预测

蛋白多序列比对分析显示(图 2), CrMC1 具有 metacaspase 家族典型的、高度保守的 p20(氨基酸 44~195)结构域、p10(氨基酸 229~328)结构域以及中间连

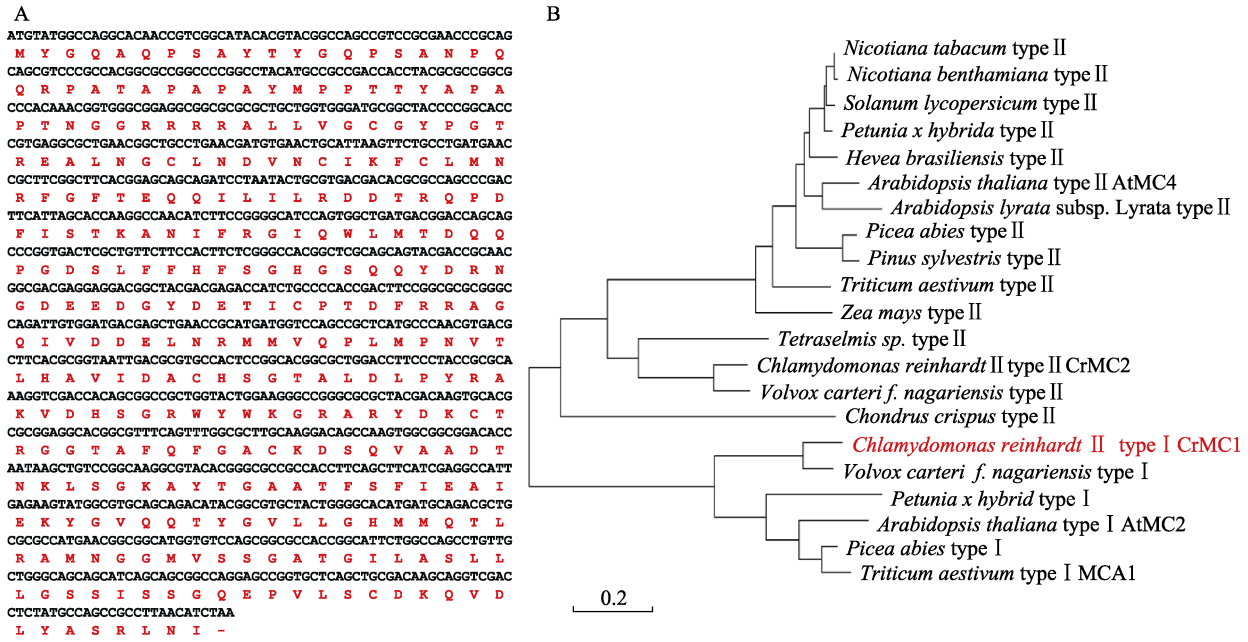


图1 CrMC1 结构分析
Fig.1 CrMC1 sequence analysis

A. 通过利用 SMS 生物软件(<http://www.bio-soft.net/sms/>)推测 CrMC1 氨基酸序列; B. 利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与从 NCBI 数据库获得的其他物种 metacaspase 构建系统进化树, 物种名与蛋白编号见表 2

A. CrMC1 ORF was deduced to CrMC1 protein sequence using online SMS software (<http://www.bio-soft.net/sms/>); B. Phylogenetic tree was constructed using metacaspase protein sequence of different species obtained from NCBI database. Latin names and protein IDs are presented in Table 2

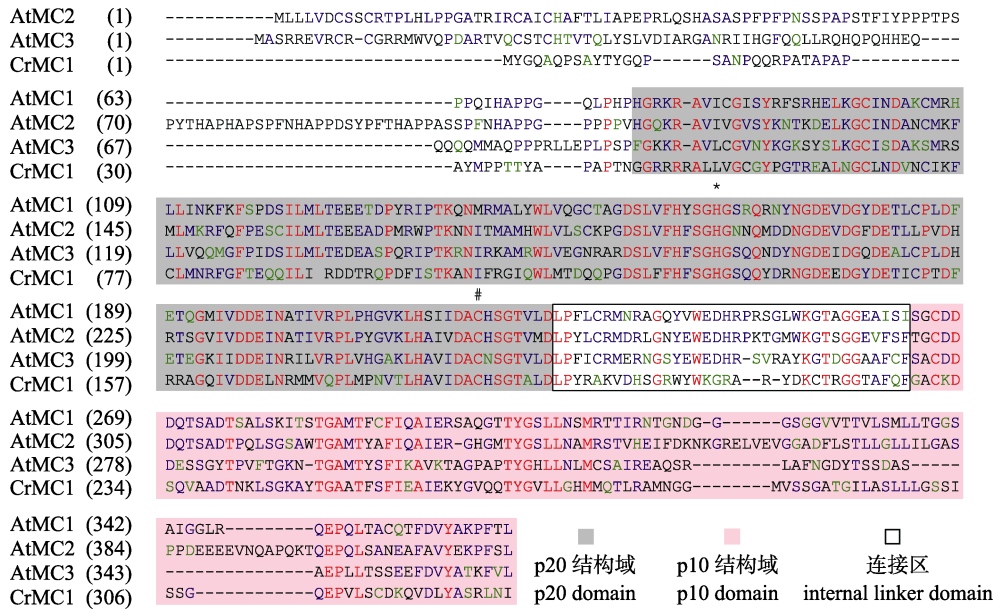


图2 CrMC1 蛋白质结构预测
Fig.2 CrMC1 protein domain prediction

利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与自 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)获得的 3 种拟南芥 I 型 metacaspase (AtMC1, NO. Q7XJE6; AtMC2, NO. Q7XJE5; AtMC3, NO. Q9FMG1)氨基酸序列进行同源比对。图中蓝色背景标示为 p20 结构域, 红色背景标示为 p10 结构域, 黑框标示区域为连接区。活性中心分别以*和#标出

CrMC1 was aligned with type I metacaspase from Arabidopsis: AtMC1, NO. Q7XJE6; AtMC2, NO. Q7XJE5; AtMC3, NO. Q9FMG1. Arabidopsis sequences were obtained from uniprot database. The domain of p20, p10 and internal linker is highlighted in blue background, red background and black frame, respectively. The conserved His-Cys residues are labelled by * and # respectively

接区(氨基酸 196~228)。与拟南芥 type I metacaspase 蛋白 AtMC1/2/3 比较, 虽然 CrMC1 的 N 末端区域较为简单, 然而其脯氨酸含量较高, 为典型的富含脯氨酸区域(23.2%), 符合 type I metacaspase 的结构特征。CrMC1 蛋白酶活性中心包含高度保守的组氨酸(132) (图 2*处)与半胱氨酸(188) (图 2#处)结构, 推测其具有已知 metacaspase 类似的蛋白酶活性。

2.3 莱茵衣藻 CrMC1 参与 H₂O₂ 诱导细胞死亡调控

由图 3A 可见, 1 mmol/L H₂O₂ 处理可诱导处于对数生长期的莱茵衣藻出现明显的细胞死亡现象。根据 Vavilala 等(2015)报道, H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻细胞死亡方式为程序性细胞死亡。本研究进而利用荧光定量 PCR 方法检测处于对数生长期的莱茵衣藻 CrMC1

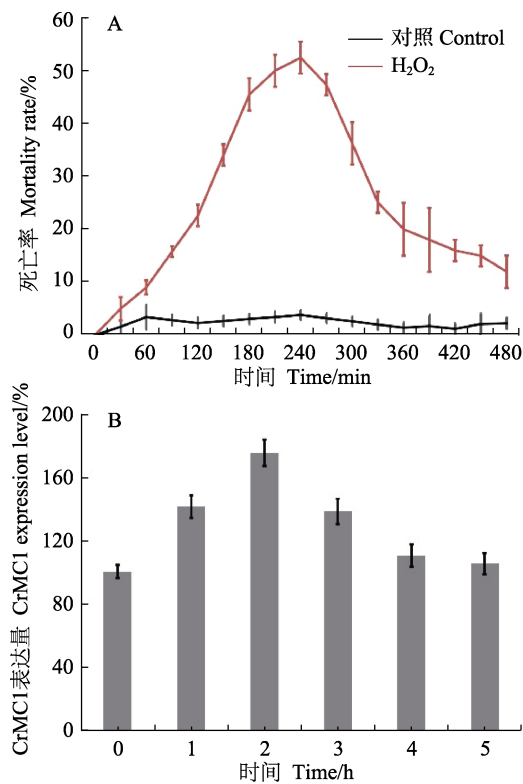


图 3 CrMC1 参与 H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡调控

Fig.3 CrMC1 involved in H₂O₂-induced PCD regulation of *C. reinhardtii*

A. H₂O₂ 处理后 1~480 min 内莱茵衣藻细胞死亡率。莱茵衣藻培养与 H₂O₂ 处理如前所述; B. CrMC1 基因在 H₂O₂ 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡中的表达量变化。实验均进行 3 次取平均值

A. The mortality of *C. reinhardtii* cells within 1~480 min after H₂O₂ treatment. *C. reinhardtii* culture and H₂O₂ treatment as previously described; B. CrMC1 gene expression changes in H₂O₂-induced PCD in *C. reinhardtii*. Each experiment was performed three times and averaged

基因在 1 mmol/L H₂O₂ 诱导后 1~8 h 内表达水平的变化情况。如图 3B 所示, 1 mmol/L H₂O₂ 诱导后, 莱茵衣藻 CrMC1 基因的表达量自 1 h 起显著高于对照组 ($P < 0.05$), 2 h 后达到最高, 约为对照组 1.77 倍, 5 h 时下降至对照组同一水平, 与程序性细胞死亡发生时间基本同步, 推测 CrMC1 处于莱茵衣藻程序性细胞死亡调控通路的上游。

3 讨论

Madeo 等(2002)首次报道了使用酵母 Yca1 突变菌株在氧化应激导致的细胞死亡对 metacaspase 的依赖性, 证明 Yca1 在酵母细胞中参与病毒毒素和非生物相关因素应激以及细胞衰老过程中的细胞死亡 (Madeo *et al.*, 2009)。此外, 还有研究表明, 脂毒性应激 (Low *et al.*, 2008) 和肌醇饥饿 (Guérin *et al.*, 2009) 等部分酵母细胞致死条件下, metacaspase 是酵母实现细胞死亡的必要的条件; 白念珠菌的 metacaspase, CaMCA1, 参与介导氧化应激诱导的细胞死亡 (Cao *et al.*, 2009); 而构巢曲霉的 2 个 metacaspase 的其中之一, CasA 在 ER 应激相关的细胞死亡起促进作用 (Colabardini *et al.*, 2010)。

目前, 在模式生物拟南芥中分别鉴定出 3 个 type I metacaspase 基因 (AtMC1~3) 与 6 个 type II metacaspase 基因 (AtMC4~9) (Vercammen *et al.*, 2004)。Type I metacaspase AtMC1 显示为拟南芥中 HR 细胞死亡的正调节物, 而 AtMC2 则能拮抗 AtMC1 的这种细胞死亡效应。而且 AtMC2 作为抗凋亡调节剂, 其蛋白水解活性是显性的。通过对 2 种 metacaspase 的遗传操作, 几乎可以使植物细胞内的免疫受体消除 HR 活性 (Coll *et al.*, 2010)。与高等植物相似, 莱茵衣藻中同时存在 1 个 type I metacaspase 基因与 1 个 type II metacaspase 基因。由此推测, 与酵母相比, 莱茵衣藻程序性细胞死亡调控与高等植物具有更高的同源性。因此, 对莱茵衣藻 metacaspase 基因及其功能的研究, 对更好地阐释植物程序性细胞死亡调控通路以及 type I 与 type II metacaspase 基因相互作用有着极为重要的意义。

本研究首次报道了莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 ORF 序列及其参与调控 H₂O₂ 诱导程序性细胞死亡作用。通过巢式 PCR 从野生型莱茵衣藻藻种中克隆到 1 个 type I metacaspase 基因并命名为 CrMC1。序列分析表明, CrMC1 具有 type I metacaspase 特征性的 N 末端脯氨酸富含区、保守的 p20 与 p10 结构域以及组氨酸-半胱氨酸活性中心结构, 推测其在演

化上与已知高等植物 metacaspase 具同源性。Type I metacaspase 在高等植物与酵母程序性细胞死亡中所扮演的角色尚存在争议。例如, AtMC2 表达量在拟南芥程序性细胞死亡过程中调高而 AtMC1 表达量调低或无变化。本研究的实验数据证实, 与 AtMC2 类似, CrMC1 表达量在过氧化物胁迫导致的莱茵衣藻程序性细胞死亡早期显著提高, 证实其参与早期程序性细胞死亡的调控。

综上所述, 本研究结果初步描述了莱茵衣藻中 type I metacaspase 基因的结构与功能, 为植物程序性细胞死亡研究和藻类增殖工业提供了理论基础和技术支持。

参 考 文 献

- Cao Y, Huang SB, Zhu Z, *et al.* Candida albicans cells lacking CamCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(2): 183–189
- Colabardini AC, De Castro PA, De Gouvêa PF, *et al.* Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. 2010, 78(5): 1259–1279
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, *et al.* Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science*, 2010, 330(6009): 1393–1397
- Dimova EG, Bryant PE, Chankova SG, *et al.* Adaptive response: Some underlying mechanisms and open questions. *Genetics and Molecular Biology*, 2008, 31(2): 396–408
- Ge Y, Cai YM, Bonneau L, *et al.* Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23: 1493–1501
- Geng YH, Wei D, Li GJ, *et al.* Research progress on *Chlamydomonas nivalis*. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(1): 175–179 [耿予欢, 魏东, 李国基, 等. 极地雪衣藻的研究进展. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(1): 175–179]
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, *et al.* Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*, 2017, 29(10): 2498–2518
- Guérin R, Beauregard PB, Leroux A, *et al.* Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6244–e6244
- Hanikenne M. *Chlamydomonas reinhardtii*, as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist*, 2003, 159(159): 331–340
- Harper JDI. *Chlamydomonas*, cell cycle mutants. *International Review of Cytology*, 1999, 189(08): 131–150
- Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52(52): 363–406
- He Z, Song J, Chang YQ, *et al.* Effects of adding *Myriophyllum spicatum* L. meal in diets on the growth, body composition and digestive enzymes activities of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 122–127 [何舟, 宋坚, 常亚青, 等. 穗花狐尾藻 (*Myriophyllum spicatum* L.) 饲喂对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 幼参生长、体成分及消化酶的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 122–127]
- Hema R, Senthil-Kumar M, Shivakumar S, *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. *Planta*, 2007, 226(3): 655–670
- Low CP, Shui G, Liew LP, *et al.* Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 2008, 121: 2671–2684
- Ma C, Kong WW. Research progress in plant metacaspase. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(5): 543–549 [马聪, 孔维文. 植物 Metacaspase 研究进展. *植物学报*, 2012, 47(5): 543–549]
- Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Ring J, *et al.* Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 382(2): 227–231
- Madeo F, Herker E, Maldener C, *et al.* A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Cell*, 2002, 9(4): 911–917
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, 318(5848): 245–250
- Moharikar S, D'Souza JS, Kulkarni AB, *et al.* Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) cells following UV irradiation: Detection and functional analyses. *Journal of Phycology*, 2006, 42(2): 423–433
- Nguyen AV, Toepel J, Burgess S, *et al.* Time-course global expression profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during photo-biological H₂ production. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29364
- Pérezpérez ME, Florencio FJ, Crespo JL. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 2010, 152: 1874–1888
- Qiao HJ, Wang JY, Zhang LM, *et al.* Effects of dietary fish oil replacement by microalgae in microdiets on growth performance, survival and fatty acid profile of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 56–63 [乔洪金, 王际英, 张利民, 等. 微粒饲料中以微藻粉替代鱼油对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 稚鱼生长存活和脂肪酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 56–63]
- Reape TJ, Molony EM, McCabe PF. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(3): 435–444
- Sirisha VL, Sinha M, D'Souza JS. Menadione-induced caspase-dependent programmed cell death in the green chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Phycology*, 2014, 50(3): 587
- Sun XM, Hu HJ, Li YG. New material of family Chlamydomonaceae (Volvocales) in China. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2004, 22(6): 503–506 [孙晓梅, 胡鸿钧, 李夜光. 中国衣藻科(团藻目)新资料. *武汉植物学研究*, 2004, 22(6): 503–506]
- van Doorn WG, Woltering EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(3): 117–122
- Vavilala S, Gawde K, Sinha M, *et al.* Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*,

- 2015, 50(4): 422–438
- Vercammen D, Cotte BVD, Jaeger GD, *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(44): 45329–45336
- Vercammen D, Declercq W, Vandenebeele P, *et al.* Are metacaspases caspases? *Journal of Cell Biology*, 2007, 179(3): 375–380
- Wu L, Hepler PK, John PCL. The met 1 mutation in *Chlamydomonas reinhardtii*, causes arrest at mitotic metaphase with persisting p34 cdc2-like H1 histone kinase activity that can promote mitosis when injected into higher-plant cells. *Protoplasma*, 1997, 199(3): 135–150
- Xie CX, Han W, Yu ZL. Progress of *Chlamydomonas* as a model organism. *Hereditas*, 2003, 25(3): 350–354 [谢传晓, 韩伟, 余增亮. 模式生物衣藻及其研究进展. *遗传*, 2003, 25(3): 350–354]
- Xu TM. Analysis of the mutational character of *Chlamydomonas reinhardtii* Nfr-4 mutant strain. Master's Thesis of Xinjiang University, 2007 [徐田枚. 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) Nfr-4 突变株的突变性质分析. 新疆大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Yordanova ZP, Woltering EJ, Kapchinatoteva VM, *et al.* Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of Botany*, 2013, 111(2): 191–205
- Zuo Z, Zhu Y, Bai Y, *et al.* Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 51(2): 175–184
- (编辑 冯小花)

Cloning of the Metacase Type I Gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and Its Involvement in the Regulation of Programmed Cell Death

ZHANG Hengyu¹, LIU Yiqun², GE Yuan¹①

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract The metacaspase is a cysteine protease with the substrate of arginine/lysine, specifically found in protozoa, fungi, and plants. The metacaspase is generally believed to be closely related to the caspase of the metazoan. Previous studies have shown that metacaspases can be divided into type I and type II according to the differences in their structural characteristics, and both types have been found to be involved in the regulation and the control of programmed cell death in various plants and protozoa. Based on the information of the sequence of the *Chlamydomonas reinhardtii* type I metacaspase cDNA, obtained from the Genbank database (Genbank NO. XM_001696904), this study was able to use the method of two-step nested PCR cloning to retrieve the Open Reading Frame (ORF) of the sequence of the *C. reinhardtii* type I metacaspase cDNA. The ORF sequence, mentioned above, was named as the CrMC1 in this study. The length of the CrMC1 ORF, in its entirety, is 987 bp, from which can be inferred that there are 405 amino acids encoded in this sequence. By the method of homologous sequence comparative analysis with the already known type I metacaspase protein, it was then found that the CrMC1 has conservative p20, p10, linker domain, and arginine and cysteine active center sites. Furthermore, this study is also able to show that, during the H₂O₂ induced programmed cell death of *C. reinhardtii*, the gene transcripts of the CrMC1 was increased at a statistically significant level ($P < 0.05$). The gene transcripts of the CrMC1 then reached its peak after 2 h. Eventually, the gene transcripts of the CrMC1 decreased to the same level as it was in the control group at 3 h. In conclusion, the results as discussed above have indicated the following: the *C. reinhardtii* CrMC1 was involved in the regulation and the control of the H₂O₂ induced programmed cell death of *C. reinhardtii*.

Key words Metacaspase; *Chlamydomonas reinhardtii*; Programmed cell death

① Corresponding author: GE Yuan, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180718003

http://www.yykxjz.cn/

葛红星, 陈钊, 李健, 常志强, 赵法箴. 温度对浒苔生长及不同氮源吸收特性的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 138–144
Ge HX, Chen Z, Li J, Chang ZQ, Zhao FZ. Effects of temperature on the growth rate and nitrogen uptake of *Ulva prolifera*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 138–144

温度对浒苔生长及不同氮源吸收特性的影响*

葛红星^{1,2} 陈钊¹ 李健^{1①} 常志强¹ 赵法箴¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005)

摘要 为了评估浒苔(*Ulva prolifera*)对养殖废水的净化效果,本文研究了4个温度水平(22.5℃、25.5℃、28.5℃和31.5℃)和3种氮源(NH₄Cl、NaNO₂和NaNO₃)下,浒苔对工厂化养殖水环境的适应能力及其净化效果。结果显示,96 h内4个温度处理组浒苔对总氨氮(TAN,包括NH₄⁺-N和NH₃)的平均吸收速率分别为14.65、14.88、14.48和13.53 μmol/(g·h),144 h内温度各处理组对亚硝态氮(NO₂-N)的平均吸收速率分别为11.28、10.48、9.11和8.38 μmol/(g·h),144 h内各温度处理组对硝态氮(NO₃-N)的平均吸收速率分别为9.41、8.62、8.80和7.35 μmol/(g·h);温度对浒苔的生长速率有极显著的影响($P<0.01$),而氮源对浒苔的生长速率有显著影响($P<0.05$);在相同氮源条件下,浒苔的生长速率随着温度的升高而逐渐降低;在相同温度条件下,氮源为氨氮(NH₄⁺-N)时,浒苔的生长速率大于氮源为NO₂-N和NO₃-N的生长速率;温度和氮源对浒苔叶绿素a的含量影响不显著($P>0.05$),氮源为NH₄⁺-N和NO₂-N时,随着温度的升高,浒苔中叶绿素a的含量均有升高的趋势,而氮源为NO₃-N时,浒苔中叶绿素a的含量呈先降低再升高的趋势;温度和氮源对浒苔中类胡萝卜素的含量均有极显著影响($P<0.01$)。随着温度的升高,各处理组浒苔中类胡萝卜素的含量均呈升高的趋势,其中,在28.5℃和31.5℃条件下,NO₃-N处理组浒苔类胡萝卜素的含量明显高于其他各处理组($P<0.05$)。研究表明,温度在22.5℃~31.5℃范围内,浒苔可以有效吸收TAN、NO₂-N和NO₃-N等对虾工厂化养殖废水中的营养盐,浒苔对NH₄⁺-N的吸收速率最大,但随着水温的升高,浒苔对NH₄⁺-N、NO₂-N和NO₃-N的吸收速率均呈降低的趋势。

关键词 浒苔; 水温; 氮源; 生长

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0138-07

近年来,随着养殖技术和设施的创新,对虾养殖业取得迅速发展,2014年全国对虾养殖总产量达 1.16×10^6 t(渔业统计年鉴,2015)。然而,养殖对虾对饲料的利用率较低,Thakur等(2003)研究表明,在对虾养殖过程中,收获对虾的含N量在N输出总量

中所占比例仅为23%~31%,其他饵料N主要以残饵和排泄物等形式存在于养殖系统中。而残饵、排泄物等经微生物分解后,可能直接或间接产生大量氨氮(NH₄⁺-N)、亚硝态氮(NO₂-N)和硝态氮(NO₃-N)等溶解性无机氮。Funge-Smith等(1999)研究表明,NH₄⁺-N、

* 国家虾产业技术体系-北方养殖岗位(CARS-48)、山东省泰山产业领军人才工程项目(LNJY2015002)和江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(HS2017002)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), the Program of Shandong Leading Talent (LNJY2015002), and Open Funds of Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology (HS2017002)]. 葛红星, E-mail: hongxinggelu@163.com

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

收稿日期: 2018-07-18, 收修改日期: 2018-08-27

NO₂-N 等可溶性无机氮是造成养殖水体污染的主要原因。养殖水体中的 NH₄⁺-N 和 NO₂-N 不仅危害对虾生长和存活, 不经合理处理而直接排放, 还会引起周围水域的富营养化。面对日益恶化的养殖环境, 国内外学者普遍认为, 大型海藻能够吸收溶解态的无机 N、P 等, 可以作为养殖废水的“生物净化器”。利用江篱(*Gracilaria tenuistipitata*) (李卓佳等, 2007)、海带(*Laminaria japonica*) (沈淑芬等, 2013)、石莼(*Ulva pertusa*) (李秀辰等, 1998) 和紫菜(*Porphyra yezoensis*) (田景波等, 2008) 等大型藻类净化富营养化的养殖废水已在国内外获得了广泛应用。

浒苔(*Ulva prolifera*) 含有多种活性物质和丰富的蛋白质, 是一种可食用、可药用的大型海藻(郑恒睿等, 2014)。浒苔具有适应能力强、生长速度快的特点。李瑞香等(2009)研究表明, 浒苔的最大相对生长率可达 27.57%/d。因此, 利用浒苔净化对虾养殖废水, 不仅具有生态效益, 还可以增加经济效益。然而, 对虾工厂化养殖水温一般维持在 30℃ 左右(Ge *et al.*, 2016), 而浒苔适宜温度为 23℃~26℃(李雪娜等, 2016), 这可能对浒苔生长造成一定的影响。另外, 对虾工厂化养殖车间为了维持水温的稳定, 一般采取隔热保温的设计方案, 这就可能造成养殖车间光照强度的减弱及光照时间的缩短。温度和光照是浒苔生长和繁殖的重要生态因子。因此, 本研究根据对虾养殖水体生态环境, 在低光照条件下, 研究不同温度浒苔生长及其对不同氮源吸收的特性, 旨在探讨浒苔处理对虾工厂化养殖废水的可能性, 为探讨大型海藻转化利用对虾养殖废水中营养物质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源及预培养

浒苔由浙江省象山旭文海藻开发有限公司提供。浒苔主枝长为 2~3 cm。实验用水为无氮海水。将藻体培养于除 N 以外的 f/2 培养液中, 在光照培养箱(武汉瑞华)中进行 3 d 氮饥饿条件下的预培养。预培养条件: 温度为(25.5±0.5)℃, 盐度为 29.5±0.5, 光照强度为 3000 lx, 光暗周期为 12 h : 12 h, CO₂ 浓度为 700 mg/L。预培养期间, 每天定时摇瓶 4 次。接种用海水及锥形瓶均经过高压灭菌处理, 且接种在无菌环境中进行。

1.2 实验设计

将经 N 饥饿处理后的浒苔表面水分吸干, 分别称取 0.4 g (鲜重), 置于装有 700 ml f/2 培养液的 1000 ml 锥形瓶中, 进行一次性培养。用锡箔封口, 每天定时摇瓶 4 次。实验在光照培养箱(武汉瑞华)中进行, 培

养条件除温度外与预培养相同。

实验设置 3 个不同氮源和 4 个不同温度共 12 个处理组合。f/2 培养液中氮源分别为等浓度(8.83×10² μmol/L) 的 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 和 NH₄⁺-N。本研究设置 4 个温度梯度(22.5℃、25.5℃、28.5℃和 31.5℃), 每个处理设 3 个重复。

1.3 无机氮的测定

每隔 24 h, 分别取水样 10 ml 用于总氮氮(TAN, 包括 NH₄⁺-N 和 NH₃)、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 浓度的测定。测定时使用 PhotoLab S12 (WTW, 德国), 根据操作说明, 直接读取 TAN、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 浓度。取样及测定方法参见葛红星等(2014)的方法。

1.4 浒苔对不同氮源的吸收速率

分别计算 24、48、72、96 和 144 h 时浒苔对不同氮源的吸收速率。在 96 h 时, 水体中 NH₄⁺-N 处理组中 TAN 基本消耗殆尽; 而在 144 h 时, 水体中 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 基本消耗殆尽, 故浒苔的吸收速率测定到 96 h, 对 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的吸收速率测定到 144 h。因此, 不同氮源对浒苔生长实验的时间也分别设定为 96、144 和 144 h。

吸收速率(Uptake rate, UR)=(C_t-C_{t-1})/(24×m)

式中, C_t 和 C_{t-1} 分别为 t 和 t-1 时氮源浓度, 单位为 μmol/L; m 为浒苔初始鲜重, 单位为 mg。

1.5 浒苔生长

根据无机氮消耗情况, 分别将氮源为 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的各处理组培养 96、144 和 144 h 后, 将浒苔表面水分吸干后称重, 并计算浒苔生长速率。

生长速率(Growth rate, RT)=(W_t-W₀)/t

式中, W_t 和 W₀ 分别为实验结束和初始时的浒苔鲜重, 单位为 mg; 氮源为 NH₄⁺-N 时, t=96 h, 氮源为 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 时, t=144 h。

1.6 光合色素含量分析

分别称取各处理组新鲜浒苔 0.2 g, 丙酮研磨提取后用于测定叶绿素 a 和类胡萝卜素, 测定方法参见徐智广等(2016)的方法。

1.7 统计分析

所得数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。所有数据经 Kolmogorov-Simirov 检验均符合正态分布(P>0.05), 单因素方差分析(One-way ANOVA)氮态氮、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 浓度和浒苔对氮源吸收速率; 用双因素方差分析(Two-way ANOVA)比较浒苔生长速率、

类胡萝卜素、叶绿素 *a* 和温度及氮源差异, 双因素方差分析时以温度和氮源为变量, 所有数据均经 Duncan 比较, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 实验结果

2.1 不同温度培养条件下总氨氮、亚硝态氮和硝态氮浓度变化

从图 1A 可以看出, TAN 浓度下降迅速, 第 96 小时, 22.5℃、25.5℃、28.5℃ 和 31.5℃ 各温度处理组 TAN 浓度分别为开始实验时的 13.6%、3.2%、4.8% 和 16.8%。NO₂⁻-N 下降缓慢, 第 144 小时, 22.5℃、25.5℃、28.5℃ 和 31.5℃ 各温度处理组 NO₂⁻-N 浓度分别为 1.79、75.00、178.58 和 235.71 μmol/L (图 1B)。NO₃⁻-N 浓度下降最慢, 实验结束时, 22.5℃、25.5℃、28.5℃ 和 31.5℃ 各温度处理组 NO₃⁻-N 浓度分别为 64.29、78.57、85.71 和 128.57 μmol/L (图 1C)。

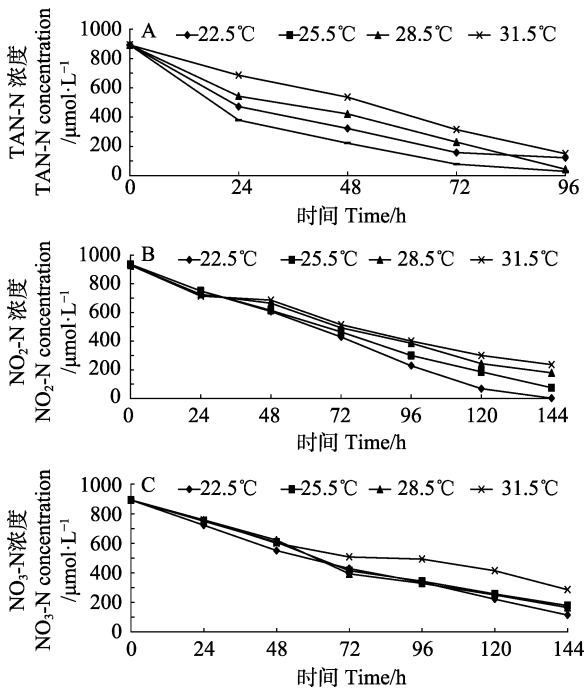


图 1 不同温度培养条件下总氨氮(A)、亚硝态氮(B)和硝态氮(C)浓度变化

Fig.1 The concentration of TAN(A), NO₂⁻-N(B) and NO₃⁻-N(C) at different temperature

2.2 不同温度培养下浒苔对不同氮源的吸收速率

从图 2 可以看出, 相同温度条件下, 浒苔对 TAN 的吸收速率最大, 其次是 NO₂⁻-N, 吸收 NO₃⁻-N 的速率最小。96 h 内, 22.5℃、25.5℃、28.5℃ 和 31.5℃

各温度处理组对 TAN 的平均吸收速率分别为 14.65、14.88、14.48 和 13.53 μmol/(g·h)。各温度处理组中, 浒苔对 TAN 的吸收速率在 24 h 时最大, 各温度处理组 TAN(图 2A)的吸收速率分别为 30.55、37.29、25.42 和 15.10 μmol/(g·h), 随着时间的延长, 22.5℃、25.5℃ 和 28.5℃ 处理组浒苔的 TAN 吸收速率呈先下降, 48 h 后吸收速率趋于稳定, 31.5℃ 处理组浒苔 TAN 的吸收速率始终在 10.93~16.14 μmol/(g·h)之间波动。在不同温度条件下, 浒苔对 NO₂⁻-N 吸收速率见图 2B。从图 2B 可以看出, 144 h 内各处理组对 NO₂⁻-N 的平均吸收速率分别为 11.28、10.48、9.11 和 8.38 μmol/(g·h)。实验期间, 31.5℃ 处理组浒苔对 NO₂⁻-N 的吸收速率始终小于 22.5℃、25.5℃ 和 28.5℃ 处理组。从图 2C 可以看出, 144 h 内各处理组对 NO₃⁻-N 的平均吸收速率分别为 9.41、8.62、8.80 和 7.35 μmol/(g·h)。22.5℃ 处理组浒苔对 NO₃⁻-N 的吸收速率随着实验的进行呈下降趋势。25.5℃ 和 28.5℃ 处理组对 NO₃⁻-N 的吸收速率呈先上升再下降的趋势, 在 72 h 时均达极值, 分别为 13.97 和 16.57 μmol/(g·h)。31.5℃ 处理组吸收速率呈先降低、96 h 达最低值、后上升的趋势。

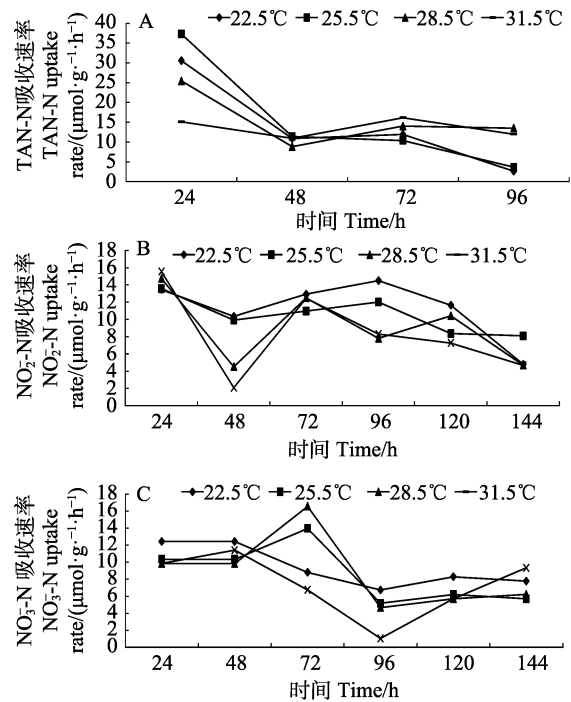


图 2 不同温度下浒苔对总氨氮(A)、亚硝态氮(B)和硝态氮(C)的吸收速率

Fig.2 Effects of different temperature on TAN (A), NO₂⁻-N (B) and NO₃⁻-N (C) uptake rate of *U. prolifera*

2.3 不同温度和氮源条件下浒苔生长及叶绿素 *a* 组成

不同温度和氮源条件下, 浒苔生长速率、叶绿素 *a*

和类胡萝卜素含量的变化情况见表 1。从表 1 可以看出, 各氮源处理条件下, 温度对浒苔的生长速率有极显著的影响($P < 0.01$), 而温度处理条件下, 氮源对浒苔的生长速率有显著影响($P < 0.05$)。相同氮源条件下, 浒苔的生长速率随着温度的升高而逐渐降低, 相同温度条件下, 氮源为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时, 浒苔的生长速率大于 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。其中, 当温度为 22.5°C , 氮源为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时, 浒苔的生长速率最大; 温度为 31.5°C , 氮源为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 时, 浒苔的生长速率最小。温度和氮源对叶绿素 a 的含量均有影响, 但影响不显著($P > 0.05$)。氮源为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 时, 随温度的升高, 浒苔中

叶绿素 a 的含量均有升高的趋势, 而氮源为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 时, 浒苔中叶绿素 a 的含量呈先降低再升高的趋势。温度和氮源对浒苔中类胡萝卜素的含量均有极显著影响($P < 0.01$)。在 22.5°C 、 25.5°C 和 28.5°C 条件下, 氮源为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 时, 浒苔类胡萝卜素含量无显著差异($P > 0.05$), 但均明显低于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 处理组($P < 0.05$)。随着温度的升高, 各处理组浒苔中类胡萝卜素的含量均呈升高的趋势, 其中, 在 28.5°C 和 31.5°C 条件下, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 处理组浒苔中类胡萝卜素的含量明显高于其他各处理组($P < 0.05$)。温度和氮源对浒苔生长速率、叶绿素 a 和类胡萝卜素含量均有交互作用。

表 1 不同温度和氮源条件下浒苔生长及叶绿素组成
Tab.1 The growth of *U. prolifera* at different temperature and nitrogen source

温度 Temperature ($^\circ\text{C}$)	氮源 Nitrogen source	生长速率 Growth rate (mg/h)	叶绿素 a Chl- a (mg/g)	类胡萝卜素 Carotenoid (mg/g)
22.5	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	13.44 ± 1.15^g	0.276 ± 0.010^{bc}	0.140 ± 0.009^a
	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	8.57 ± 0.59^{ef}	0.222 ± 0.018^a	0.133 ± 0.006^a
	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	7.72 ± 0.47^{de}	0.430 ± 0.010^e	0.180 ± 0.010^b
25.5	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	9.93 ± 0.62^f	0.313 ± 0.011^{cd}	0.138 ± 0.011^a
	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	7.16 ± 0.46^{cde}	0.265 ± 0.014^b	0.138 ± 0.007^a
	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	7.22 ± 0.36^{cde}	0.415 ± 0.007^e	0.205 ± 0.012^b
28.5	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	6.78 ± 0.35^{cd}	0.237 ± 0.016^{ab}	0.144 ± 0.012^a
	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	7.18 ± 0.78^{ced}	0.326 ± 0.011^d	0.153 ± 0.011^a
	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	5.17 ± 0.19^b	0.262 ± 0.013^{ab}	0.239 ± 0.014^c
31.5	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	6.03 ± 0.34^{bc}	0.407 ± 0.017^e	0.203 ± 0.008^b
	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	3.50 ± 0.20^a	0.315 ± 0.016^{cd}	0.184 ± 0.011^b
	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	3.31 ± 0.23^a	0.404 ± 0.015^e	0.264 ± 0.009^c
影响因素 Factors		双因素方差分析 P 值 P -value of two-way ANOVA		
温度 Temperature ($^\circ\text{C}$)		0.006	0.370	0.004
氮源 Nitrogen source (N)		0.022	0.179	0.001
温度 \times 氮源 Temperature \times Nitrogen source		0	0	0

注: 不同字母表示差异显著

Note: Different letters indicated significant differences

3 讨论

3.1 不同温度条件下浒苔对不同氮源的吸收

本研究发现, 在低光照条件下, 4 个温度处理组中, 浒苔对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 均有吸收能力, 表明温度在 22.5°C ~ 31.5°C 范围内, 浒苔可以正常存活。相同温度条件下, 浒苔对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率大于 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收速率, 表明浒苔对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 有较强的吸收能力。这与徐智广等(2016)关于氮源丰富条件下, 海带对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率大于硝氮的结果是一致的。这可能是因为大型海藻对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸

收为主动运输, 需要耗费能量, 而对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收是不需要耗能的被动扩散(Pritchard *et al*, 2015)。本研究发现, 同一氮源条件下, 浒苔对无机氮的吸收速率随着温度的升高而降低。徐军田等(2013)研究了浒苔对无机碳的利用对温度响应的机制发现, 温度对浒苔利用无机碳的能力有显著影响, 高温(30°C)条件下, 缘管浒苔(*Ulva linza*)的最大光合作用能力与最适温度相比下降了 56%。表明温度高于浒苔的最适温度会抑制浒苔的光合作用能力。而张晓红等(2012)研究了不同温度(5°C ~ 32°C)、不同盐度(14、20、26 和 32)对浒苔群体增长和生殖的影响, 发现温度为 20°C 时, 浒苔特定生长率最高, 达 37.80%。而本研究中, 最

低温度为 22.5℃, 随着温度的升高, 浒苔对无机氮的利用速率降低, 而对虾工厂化养殖水温往往在 30℃ 左右(Ge *et al.*, 2016), 表明对虾工厂化养殖由于水温较高, 可能会影响浒苔对无机氮的净化速率。

3.2 不同温度条件下氮源对浒苔生长速率的影响

包括浒苔在内的大型海藻的生长都是一个通过机体光合作用积累 C、N 代谢产物的复杂的生理过程(Xu *et al.*, 2009)。该过程受到温度(王阳阳等, 2010)、光照(程丽巍等, 2010)、营养盐(李文慧等, 2015)等诸多生态因子的调控。本研究发现, 相同氮源条件下, 温度对浒苔的生长速率有极显著影响。吴洪喜等(2000)研究了温度对浒苔生长的影响表明, 浒苔在水温为 10℃~30℃ 范围内, 均可以正常生长, 最适生长水温为 15℃~25℃。本研究发现, 在 22.5℃~31.5℃ 温度范围内, 浒苔均能保持生长, 但相同氮源情况下, 随着温度的升高, 浒苔的生长速率呈先升高后下降趋势, 可能超过其最适生长范围。水温超过藻类生长的最适范围, 即可能损伤其叶绿体构造, 抑制光合效率(Wen *et al.*, 2005), 这与吴洪喜等(2000)关于浒苔最适生长水温的研究也是一致的。忻丁豪等(2009)研究发现, 水温高于 32℃, 浒苔仅能存活 3 d。而本研究中, 浒苔在 31.5℃ 水温条件下能正常生长, 这可能是由于浒苔的生长是一个受到水温、光照和营养盐等诸多生态因子综合作用的生理过程。本研究发现, 相同温度条件下, 氮源对浒苔的生长速率有显著影响。藻类的生长与 N 营养盐吸收和 N 代谢产物的积累及调节分配密切相关(徐智广等, 2016)。陈建业等(2014)研究了不同氮源、磷源营养盐对亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)生长的影响发现, 以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为氮源时, 其生长速率大于以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为氮源, 这与本研究结果是一致的。一般情况下, 因为藻类对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收属于被动运输, 而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 等其他形式的氮源属于主动运输, 因此, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 更易于被藻体吸收(Pritchard *et al.*, 2015), 这与本研究中关于浒苔对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率大于 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的结论也是一致的。而陆德祥等(2004)研究了不同氮源对球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 3011 增殖的影响, 发现 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的增殖效果好于氨态氮。这与本研究的结果也是不矛盾的。因为, 不同氮源的形态及其浓度对藻类生长的影响存在差异。

3.3 不同温度条件下氮源对浒苔主要光合色素成分的影响

大型海藻光合色素的组成及含量在一定程度上可以反映生态因子对其光合作用强度的影响(王阳阳

等, 2010)。其中, 叶绿素 *a* 是藻类最丰富, 也是最基本的光合色素(梁磊等, 2014), 其含量受光照(卢晓等, 2014)、营养盐(徐智广等, 2016)及温度(卢晓等, 2014)等影响。本研究中, 温度和氮源对浒苔叶绿素 *a* 的含量均有影响, 表明温度和氮源的改变, 均可能影响浒苔中叶绿素 *a* 的含量, 进而影响浒苔的生长速率, 这也与本研究中温度和氮源影响浒苔生长速率的结论是一致的。氮源为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 时, 随着温度的升高, 浒苔叶绿素 *a* 的含量均有升高的趋势, 而氮源为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 时, 浒苔叶绿素 *a* 的含量呈先降低再升高的趋势。叶绿素 *a* 含量升高, 这可能是由于本研究中光照强度较低, 适当的升温, 浒苔通过提高叶绿素 *a* 等光合色素含量最大限度的利用光能, 以适应低光照强度。这也说明浒苔可以适应对虾养殖较低光照的环境, 进而起到净化水质的作用。类胡萝卜素是藻类重要的光合色素之一, 起着吸收光能的作用, 也是机体内重要的抗氧化剂(Xia *et al.*, 2005)。本研究中, 温度和氮源对浒苔中类胡萝卜素的含量均有极显著的影响, 这是因为随温度及氮源等营养盐的变化, 导致机体吸收和传递光能的过程可能有所改变, 以避免叶绿素的氧化损伤(汤俊等, 2010)。随着温度的升高, 各处理组浒苔中类胡萝卜素的含量均呈升高的趋势, 这可能是随着水温的升高, 导致机体内产生氧化胁迫, 机体通过产生类胡萝卜素以解除氧化胁迫(Xia *et al.*, 2005)。色素的合成是一个消耗能量的过程, 藻类大量合成色素, 会导致生长能分配的减少, 导致其生长受到抑制(Han *et al.*, 2008)。这也与本研究中浒苔的生长速率随着温度升高而呈降低的趋势是一致的。

参 考 文 献

- Chen JY, Lin D, Huang J, *et al.* Effect of different nitrogen and phosphorus sources on the growth of *Platymonas subcordiformis*. *Journal of Fujian Fisheries*, 2014, 36(4): 258-263 [陈建业, 林丹, 黄健, 等. 不同氮源、磷源营养盐对亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)生长的影响. *福建水产*, 2014, 36(4): 258-263]
- Cheng LW, Zou DH, Zheng QS, *et al.* Effects of temperature and light intensity on the nitrate uptake kinetics of nitrogen starved and replete *Ulva lactuca*. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 939-944 [程丽巍, 邹定辉, 郑青松, 等. 光照和温度对氮饥饿及饱和营养条件下石莼(*Ulva lactuca*)的硝态氮吸收动力学影响. *生态学杂志*, 2010, 29(5): 939-944]
- Funge-Smith SJ, Briggs MRP. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: Implications for sustainability. *Aquaculture*, 1999, 164(1-4): 117-133
- Ge HX, Li J, Chang ZQ, *et al.* Effect of microalgae with semicontinuous harvesting on water quality and zootechnical

- performance of white shrimp reared in the zero water exchange system. *Aquacultural Engineering*, 2016, 72-73: 70-76
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* The immune response of *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* under stress caused by ammonia nitrogen at different concentrations. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 76-82 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 76-82]
- Han T, Kang SH, Papk J S, *et al.* Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricanto* copper exposure. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(2): 176-184
- Li RX, Wu XW, Wei QS, *et al.* Growth of *Enteromorpha Prolifera* under different nutrient conditions. *Advances in Marine Science*, 2009, 27(2): 211-216 [李瑞香, 吴晓文, 韦钦胜, 等. 不同营养盐条件下浒苔的生长. *海洋科学进展*, 2009, 27(2): 211-216]
- Li WH, Zhu M, Liu R, *et al.* Effects of nitrogen and phosphorus nutrients on growth, photosynthesis and enrichment of nitrogen and phosphorus of *Ulva linza*. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2015, 31(4): 553-558 [李文慧, 朱明, 刘冉, 等. 氮磷营养盐因子对缘管浒苔生长、叶绿素荧光特性和氮磷富集的影响. *生态与农村环境学报*, 2015, 31(4): 553-558]
- Li XC, Zhang GC, Cui YA. Static purification of *Ulva pertusa* Kjellman for abalone effluents. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 1998, 14(1): 173-176 [李秀辰, 张国琛, 崔引安. 孔石莼对养鲍污水的静态净化研究. *农业工程学报*, 1998, 14(1): 173-176]
- Li XN, Han Z, Liu XJ, *et al.* A study of the relationship between the processes of *Enteromorpha* and *Sargassum* and sea surface temperature. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(5): 125-130 [李雪娜, 韩震, 刘贤博, 等. 浒苔和马尾藻的消长与海表面温度的相互影响研究. *海洋湖沼通报*, 2016(5): 125-130]
- Li ZJ, Luo YS, Wen GL. A research on purification of intensive shrimp effluent by *Gracilaria tenuistipitata* var. *liuiand* probiotics. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 23(6): 72-75 [李卓佳, 罗勇胜, 文国梁. 细基江蓠繁枝变种与益生菌净化养殖废水的研究. *热带海洋学报*, 2007, 23(6): 72-75]
- Liang L, Fang Z, Huang HQ, *et al.* The effect of temperature on the growth and pigment content of *Betaphycus gelatinum*. *Marine Sciences*, 2014, 38(3): 86-90 [梁磊, 方哲, 黄惠琴, 等. 温度对琼枝麒麟菜生长及色素含量的影响. *海洋科学*, 2014, 38(3): 86-90]
- Lu DX, Zhang M, Wang XH, *et al.* Effects of different nitrogen sources on proliferation of *Isochrysis galbana* sphaeroides 3011. *Journal of Aquaculture*, 2004, 25(3): 21-23 [陆德祥, 张敏, 王小红. 不同氮源对球等鞭金藻 3011 增殖的影响. *水产养殖*, 2004, 25(3): 21-23]
- Lu X, Li MZ, Wang ZG, *et al.* Effects of different temperature and illumination intensity on growth and biochemical constituents of *Gracilaria chouae*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1236-1243 [卢晓, 李美真, 王志刚, 等. 光照和温度对脆江蓠的生长和生化组成的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1236-1243]
- Ministry of Agriculture Fishery Administration. *China fishery statistical yearbook*. Beijing: China Agricultural Press, 2015, 17-25 [农业部渔业渔政管理局. *中国渔业统计年鉴*. 北京: 中国农业出版社, 2015, 17-25]
- Pritchard DW, Hurd CL, Beardall J, *et al.* Restricted use of nitrate and a strong preference for ammonium reflects the nitrogen ecophysiology of a light-limited red alga. *Journal of Phycology*, 2015, 51(2): 277-287
- Shen SF, Wei T, Sun QH, *et al.* Bioremediation of mariculture area by *Laminaria japonica* in Luoyuan Bay. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science)*, 2013, 29(4): 103-108 [沈淑芬, 魏婷, 孙琼花, 等. 海带对罗源湾养殖区海水的生物修复研究. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 29(4): 103-108]
- Tang J, Song LR, Sun SS, *et al.* Recruitment ability of *Microcystis aeruginosa* under low light low temperature combination. *Environmental Sciences*, 2010, 31(12): 2932-2937 [汤俊, 宋立荣, 孙松松, 等. 低光低温联合作用对铜绿微囊藻复苏能力的影响. *环境科学*, 2010, 31(12): 2932-2937]
- Thakur DP, Lin CK. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural Engineering*, 2003, 27(3): 159-176
- Tian JB, Wang YG, Sun XT, *et al.* The change of dissolved oxygen and pH of themarine microalgae cultivation in air-lift photobioreactor. *Fishery Modernization*, 2008, 35(2): 1-5 [田景波, 王印庚, 孙修涛, 等. 海水池塘养殖废水净化减排系统的设计和工程化技术. *渔业现代化*, 2008, 35(2): 1-5]
- Wen X, Gong H, Lu C. Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but not to photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(4): 389-395
- Wang YY, Huo YZ, Cao JX, *et al.* Influence of low temperature and low light intensity on growth of *Ulva compressa*. *Journal of Fishery Sciences in China*, 2010, 17(3): 593-599 [王阳阳, 霍元子, 曹佳春, 等. 低温、低光照强度对扁浒苔生长的影响. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 593-599]
- Wu HX, Xu AG, Wu MN. Effects of nitrogen and phosphorus nutrients on growth, photosynthesis and enrichment of Nitrogen and Phosphorus of *Ulva linza*. *Journal of Ecology and Rural Environment (Natural Science)*, 2000, 19(3): 230-234 [吴洪喜, 徐爱光, 吴美宁. 浒苔实验生态的初步研究. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2000, 19(3): 230-234]
- Xia JR, Gao KS. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6): 668-675
- Xin DH, Ren S, He PM, *et al.* Preliminary study on experimental ecology of *Enteromorpha* in Yellow Sea. *Marine Environmental Science*, 2009, 28(2): 190-192 [忻丁豪, 任松, 何培民, 等. 黄海海域浒苔属(*Enteromorpha*)生态特

- 征初探. 海洋环境科学, 2009, 28(2): 190–192]
- Xu JT, Wang XW, Zhong ZH, *et al.* The mechanism of the characters of inorganic carbon acquisition to temperature in two *Ulva* species. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(24): 7892–7897 [徐军田, 王学文, 钟志海, 等. 两种浒苔无机碳利用对温度响应的机制. 生态学报, 2013, 33(24): 7892–7897]
- Xu ZG, Gao KS. Impacts of UV radiation on growth and photosynthetic carbon acquisition in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) under phosphorus-limited and replete conditions. *Functional Plant Biology*, 2009, 36(12): 1057–1064
- Xu ZG, Wu HY, Sun FX, *et al.* Effects of enrichment with different nitrogen sources on growth, photosynthetic carbon fixation and nitrogen uptake of *Saccharina japonica*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 577–584 [徐智广, 吴海一, 孙福新, 等. 不同氮源加富对海带生长、光合固碳和氮吸收特性的影响. 水产学报, 2016, 40(4): 577–584]
- Zhang XH, Wang ZL, Li RX, *et al.* Microscopic observation on population growth and reproduction of *Enteromorpha prolifera* under different temperature and salinity. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(2): 276–283 [张晓红, 王宗灵, 李瑞香, 等. 不同温度、盐度下浒苔(*Enteromorpha prolifera*) 群体增长和生殖的显微观测. 海洋科学进展, 2012, 30(2): 276–283]
- Zheng HR, Li RG. A preliminary study on extraction of protion from *Enteromorpha* in Qingdao sea area and its antineoplastic activity. *Acta Academiae Medicinae Qingdao University*, 2014, 50(2): 124–126 [郑恒睿, 李荣贵. 青岛海域浒苔蛋白提取及其抗肿瘤活性的初步研究. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(2): 124–126]

(编辑 陈 严)

Effects of Temperature on the Growth Rate and Nitrogen Uptake of *Ulva prolifera*

GE Hongxing^{1,2}, CHEN Zhao¹, LI Jian¹*, CHANG Zhiqiang¹, ZHAO Fazhen¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005)

Abstract Marine macroalgae is used as a biofilter for aquaculture wastewater treatment. Marine macroalgae is used as a biofilter for aquaculture wastewater treatment. *Ulva prolifera* was cultivated at four different water temperatures (22.5°C, 25.5°C, 28.5°C, and 31.5°C) with a different inorganic nitrogen source (NH₄Cl, NaNO₂, and NaNO₃) for each temperature to evaluate the purification efficiency of marine macroalgae *U. prolifera* on wastewater; all measurements were carried out in triplicate. The results show that, in the temperature range 22.5°C~31.5°C, the TAN uptake rates were 14.65, 14.88, 14.48, and 13.53 μmol/(g·h) in 96 h; the nitrite and nitrate uptake rates were 11.28, 10.48, 9.11, and 8.38 μmol/(g·h) and 9.41, 8.62, 8.80, and 7.35 μmol/(g·h) in 144 h, respectively. Both the temperature ($P<0.01$) and the nitrogen source ($P<0.05$) had significant effects on the growth rate of *U. prolifera*. The growth rate decreased as the temperature increased; further, at the same temperature with an ammonium source, *U. prolifera* showed the largest growth rate, followed by that with nitrite and nitrate sources. For the ammonium and nitrite sources, the content of chlorophyll *a* (Chl-*a*) increased with an increase in temperature; however, for the nitrate source, the content of Chl-*a* decreased first and then increased. Both the temperature and the nitrogen source had a significant effect on the carotenoid content ($P<0.01$), which increased with an increase in temperature. In the temperature range of 28.5°C~31.5°C, the carotenoid content in the nitrate source were found to be significantly higher than that in the other sources ($P<0.05$). The temperature and nitrogen source, thus, has a significant influence on the growth rate, Chl-*a*, and carotenoid content of *U. prolifera*. Overall, the TAN uptake rate was the highest, followed by the nitrite and nitrate uptake rates. However, the inorganic nitrogen uptake rate decreased as the temperature increased.

Key words *Ulva prolifera*; Temperature; Nitrogen source; Growth

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180831001

http://www.yykxjz.cn/

岳陈陈, 余旭亚, 赵永腾, 王惠萍. 二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和油脂积累的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 145–153
Yue CC, Yu XY, Zhao YT, Wang HP. Effects of butylated hydroxytoluene on accumulation of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* LUGU. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 145–153

二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和 油脂积累的影响*



岳陈陈¹ 余旭亚¹ 赵永腾¹ 王惠萍²①

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明 650500; 2. 昆明市儿童医院 昆明 650228)

摘要 以雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)为对象, 研究高光照、缺氮条件下, 外源添加不同浓度的二丁基羟基甲苯(Butylated hydroxytoluene, BHT)对雨生红球藻生长、虾青素积累、油脂合成、脂肪酸组成、碳水化合物、蛋白含量以及虾青素和脂肪酸合成相关酶基因的影响。结果显示, 添加不同浓度的 BHT 后, 2 mg/L BHT 添加组虾青素积累量为最高, 显著高于其他实验组和对照组 ($P < 0.05$), 达到 31.66 mg/g, 是对照组的 1.87 倍。油脂含量达 45.56%, 高于同期对照组(39.06%), 脂肪酸组成变化不显著。在此条件下, 虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 表达水平分别是对照组的 5.19 倍和 2.04 倍; 脂肪酸合成关键酶基因 *kas* 和 *acp* 表达水平较对照组显著提高 ($P < 0.05$), 分别是对照组的 4.56 倍和 3.02 倍。与对照组相比, 2 mg/L BHT 添加组的碳水化合物和蛋白含量均呈下降趋势。研究表明, 在胁迫条件下, 外源添加适量浓度的 BHT 能有效促进雨生红球藻中虾青素的积累, 同时提高了藻细胞内的油脂含量。

关键词 雨生红球藻; 二丁基羟基甲苯; 虾青素; 油脂; 虾青素合成基因; 脂肪酸合成基因

中图分类号 S968.41 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0145-09

虾青素是一种红色脂溶性酮式类胡萝卜素, 在水产养殖、生物医药、化妆品等领域应用广泛(陈超等, 2014; Higuera-Ciapara *et al*, 2006; Shah *et al*, 2016)。研究发现, 胁迫条件, 如高光照、高盐、缺氮等, 能促进微藻积累虾青素(Chen *et al*, 2017; Gao *et al*, 2015; Liu *et al*, 2016; Zhekisheva *et al*, 2002)。雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)(绿藻门、团藻目)是一种分布于世界各地的单细胞淡水微藻, 由于其虾青素含量高而被公认为天然虾青素生产的主要原料(何磊等, 2011; Lorenz, 1999; Rao *et al*, 2010), 生产中, 一般采用增加生物量和细胞内虾青素积累量的方法来

提高虾青素的产量。

胁迫条件下, 雨生红球藻除了积累虾青素外, 还大量积累脂肪酸和甘油三酯(Saha *et al*, 2013)。研究发现, 雨生红球藻中约有 95% 的游离虾青素会和脂肪酸发生酯化并储存在富含三酰基甘油的胞质脂质体中(Holtin *et al*, 2009; Yuan *et al*, 2000; Chen *et al*, 2015)。虾青素合成以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸(GA3P)为起始物, 经 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)催化, 形成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸, 最后经类胡萝卜素酮酶(BKT)合成游离虾青素(Estévez *et al*, 2001; Huang *et al*, 2016)。acp 编码细胞中酰基载体蛋白(ACP)的合

* 国家自然科学基金地区科学基金项目(21766012; 21666012)和云南省重大科技专项计划(2018ZG003)共同资助 [This work was supported by Regional Science Foundation Project of National Nature Science Foundation of China (21766012; 21666012), Yunnan Province Major Science and Technology Special Program (2018ZG003)]. 岳陈陈, E-mail: 18468235975@163.com

① 通讯作者: 王惠萍, 主任医师, E-mail: 2500016390@qq.com

收稿日期: 2018-08-31, 收修改稿日期: 2018-10-05

成, 脂肪酸合成的第一个循环是乙酰-CoA 与丙二酸单酰-ACP 在 β -酮酰-ACP 合酶(KAS)的催化下生成乙酰乙酰-酰基载体蛋白, 进入下一步脂肪酸的合成(张梅等, 2018)。二丁基羟基甲苯(BHT)是一种人工合成的酚类抗氧化剂, 因其抗氧化性强、挥发性低、稳定性高、耐用性好等优点被广泛应用于化工、食品、医药等领域(赵磊等, 2016)。Nanou 等(2010)研究发现, 外源添加 BHT 能提高真菌 *Blakeslea trispora* 中 β -胡萝卜素的积累。而 β -胡萝卜素是虾青素合成通路中重要的中间代谢产物, 这为本研究将 BHT 用于雨生红球藻诱导虾青素积累提供了理论依据。

本研究通过在培养基中添加不同浓度 BHT, 考察其对雨生红球藻生长、虾青素含量、油脂含量、脂肪酸组分、碳水化合物、蛋白含量等生理生化指标及对虾青素、脂肪酸合成相关酶基因表达的影响, 优化 BHT 添加浓度, 为其改善雨生红球藻中虾青素和油脂积累的工艺提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

雨生红球藻分离、筛选自云南省泸沽湖, 本实验室保存。BHT 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Trizol、逆转录试剂盒、引物(*dxs*、*bkt*、*acp* 和 *kas*)和荧光定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 甲醇、DMSO、KOH、丙酮和葡萄糖等均为分析纯。

1.2 主要仪器

1730R 高速冷冻离心机, 丹麦 Labogene Scanspeed 公司; Ultrospec 2100pro 紫外可见分光光度计, 美国 General Electric 公司; FD5-12 冷冻干燥机, 西盟国际集团; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方 法

1.3.1 雨生红球藻的培养 以 Bold's Basal Medium (BBM)(Ebrahimian *et al.*, 2014)为基础培养基, 将雨生红球藻接种到容积为 3 L 的鼓泡式光生物反应器中, 2800 lx 持续光照, 培养温度为(25±1)°C, 连续通入 0.1 vvm 的无菌空气, 培养 15 d(此时生物量约为 7.0×10^5 cells/ml)。

1.3.2 BHT 诱导 将 BHT 溶于无水乙醇, 制成质量浓度为 3.5 g/L 的 BHT 母液, 备用。3000 r/min 离心 5 min, 收集上述的藻细胞, 用无菌水洗 3 次, 除去培养基, 重悬于不含氮源的 BBM 培养基中, 加入

BHT 母液, 使得培养基中 BHT 的质量浓度分别为 0、1、2 和 3 mg/L(保持各组的乙醇添加量相同)。培养条件为: 12000 lx 持续光照, 培养温度为(28±1)°C, 连续通入 0.04 vvm 的无菌空气, 培养 15 d, 隔天取样, 测定各生理生化指标。

1.3.3 藻细胞生物量和虾青素含量的测定 选用改进过的方法测定诱导培养基中雨生红球藻虾青素的含量(Boussiba *et al.*, 1991)。隔天定时取 5 ml 诱导培养基中的藻液, 5000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 收集藻细胞。加入 2 ml 质量分数为 5% 的 KOH 和体积分数为 30% 的甲醇混合液, 置于 65°C 水浴 15 min 以破坏叶绿素, 3500 r/min 离心弃上清液, 收集沉淀, 水洗 2 次以洗去沉淀中残余的叶绿素, 离心收集沉淀, 加入 5 ml 的 DMSO, 混匀后利用超声破壁, 反复抽提至藻体发白, 5000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 于 490 nm 波长下测定吸光度 $A_{490\text{ nm}}$ 。按以下公式计算虾青素质量浓度:

$$\text{虾青素质量浓度(mg/L)} = (4.5 \times A_{490\text{ nm}} \times V_a) / V_b$$

式中, V_a 为 DMSO 体积(ml); V_b 为藻液体积(ml)。

此外, 每隔 1 d 定期取 10 ml 诱导培养基中的藻液, 离心收集细胞, 冷冻, 干燥, 称重, 细胞生物量和虾青素含量按以下公式计算:

$$\text{细胞生物量(g/L)} = \text{藻粉干重} / \text{藻液体积}$$

$$\text{虾青素含量(mg/g)} = \text{虾青素质量浓度} / \text{细胞生物量}$$

1.3.4 藻细胞油脂含量和脂肪酸组分测定 按照 Yu 等(2012)的方法测定藻细胞中的油脂含量和脂肪酸组成。离心收集各组藻细胞, 冷冻干燥, 称取重 ω_1 的藻体充分研磨, 加入 3 ml 氯仿-甲醇混合液(氯仿: 甲醇=2:1, v/v)提取油脂, 置于 150 r/min 的摇床中 20 min, 2000 × g 离心 10 min, 收集上清液, 重复提取 2~3 次至藻体发白, 将上清液置于管重 ω_2 的 50 ml 离心管中, 39°C 烘箱中干燥, 称重 ω_3 , 油脂含量计算公式如下:

$$\text{油脂含量(\%)} = (\omega_3 - \omega_2) / \omega_1 \times 100$$

向上述含有油脂的离心管中加入 2 ml 硫酸甲醇溶液(硫酸: 甲醇=3:97, v/v)混匀, 70°C 水浴 4 h, 加入 2 ml 正己烷, 转移至进样瓶中, 利用 Agilent 7890 进行脂肪酸 GC-MS 分析, 色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox, 30 mm×250 μm ×0.25 μm), 二阶升温程序: 170°C 维持 0 min, 以 10°C/min 的速度升至 190°C, 维持 1 min; 再以 0.8°C/min 的速度升温至 207°C, 维持 1 min; 进样分流比 40:1, 分流进样 1 μl ; 进样口温度维持在 250°C; 载体为高纯氮气, 以 1 ml/min 流速流入; 质谱条件: 四级杆温度为

150℃, EI 离子源温度为 230℃, 溶剂延迟 2 min; 质谱扫描范围为 50~550 amu。以 NIST08.L 作为数据库, 利用峰面积归一化法进一步计算脂肪酸各组分之间的相对百分含量。

1.3.5 藻细胞中碳水化合物和蛋白含量的测定

采用 Jia 等(2015)的方法测定藻细胞中的碳水化合物, 取 10 mg 冻干藻粉加入 0.5 ml 乙酸, 80℃水浴 20 min, 加入 10 ml 丙酮, 3500 r/min 离心 10 min, 弃上清液。将沉淀重悬于 2.5 ml 的 4 mol/L 三氟乙酸中, 煮沸 4 h, 10000 r/min 离心 3 min。取 20 μl 上清液, 加入硫酸-苯酚-水溶液 900 μl(硫酸:水:苯酚=15 ml:7.5 ml:0.15 g), 煮沸 20 min, 在 490 nm 测吸光度, 用葡萄糖制作标准曲线, 以测定碳水化合物的总含量。

取 10 mg 冻干藻粉, 加入 100 μl 的 1 mol/L NaOH 溶液, 80℃水浴 10 min, 加入 900 μl 蒸馏水, 12000 × g 离心 30 min, 将上清液转移至新的离心管中。重复上述操作 2 次, 合并上清液, 以牛血清蛋白制作标准曲线, 利用 Berges 等(1993)的方法测定总蛋白含量。

1.3.6 测定雨生红球藻虾青素和脂肪酸合成相关酶基因的表达式 本实验使用 Primer 5.0 设计 *dxs*、*bkt*、*kas* 和 *acp* 酶基因的上下游扩增引物(表 1), 扩增后产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后 BLAST 比对, 以此为模板设计荧光定量引物(表 2)。收集藻细胞, 无菌水洗 2 次, 保存于 -80℃ 备用。在液氮中充分研磨藻细胞, 使用 Trizol 法提取总 RNA, 利用逆转录试剂盒 TaKaRa 逆转录合成 cDNA, 以此为模板进行 RT-PCR 扩增, 通过 ABI 7500 荧光定量仪对 *dxs*、*bkt*、*kas* 和 *acp* 基因表达式进行测定, 以 18S (引物: 5'-CGGTCTGCCTCTGGTATG-3'与 5'-GCTTGCTTTGAACACGCT-3') 基因作为内标来调节 RNA 的用量和循环数, 使内标基因在不同浓度诱导下的表达丰度一致。

表 1 酶基因克隆引物
Tab.1 Primers for gene cloning

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
<i>dxs</i> F	ACAACCAGCAGGTGTGCG	58
<i>dxs</i> R	CCGTCTCCGCACTCTTCA	
<i>bkt</i> F	GACCTGCACTGGGAGCACCAC	62
<i>bkt</i> R	GACGTTGGCCACCGCTACTGA	
<i>kas</i> F	AGTGCGGTAATTCAGGTGC	62
<i>kas</i> R	GCTGTAACATTGGTGATGC	
<i>acp</i> F	CAATCCCCACCTACAGCA	59
<i>acp</i> R	CATTACAACGATAGAACACGAA	

表 2 酶基因荧光定量 PCR 引物
Tab.2 Primers for enzyme genes RT-PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
<i>dxs</i> F	GTCTCCGCACTCTTACC	57
<i>dxs</i> R	CCCACCCAGTACAACAAC	
<i>bkt</i> F	CAATCTTGTCAGCATTCCGC	61
<i>bkt</i> R	CAGGAAGCTCATCACATCAGA	
<i>kas</i> F	CACCCCACTCTGAACCAGGA	62
<i>kas</i> R	GACCTCAAACCCGAAGGAG	
<i>acp</i> F	CAGCTCGGCACTGACCTTG	59
<i>acp</i> R	CAAGGGTCAGCTCGAACTTCTC	

1.4 数据处理

实验各组均设置 3 个平行样, 数据处理采用 ANOVA(SPSS 19.0)一步法分析和 Duncan 氏多重范围比较进行分析。最小显著性差异进行多重比较来检验调查不同实验的组间差异, $P < 0.05$ 为具有显著性。

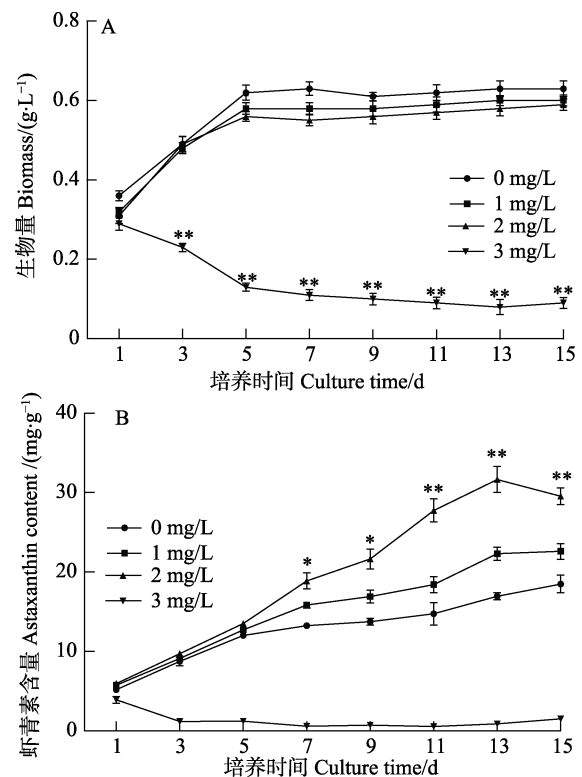


图 1 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响

Fig.1 Effects of BHT on biomass and astaxanthin content of *H. pluvialis* during induction process

*表示组间有显著性差异($P < 0.05$), **表示组间有极显著性差异($P < 0.01$)。下同

* represents significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents highly significant difference between groups.

The same as below

2 结果

2.1 BHT 对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响

如图 1A 所示, 0、1 和 2 mg/L BHT 处理组生物量最大值分别为 0.62、0.58 和 0.56 g/L, 3 mg/L BHT 处理组藻细胞生长明显受到限制。图 1B 显示, 0、1 和 2 mg/L BHT 处理组虾青素含量逐渐升高, 2 mg/L BHT 处理组增加最为显著, 在 13 d 时达到最高 31.66 mg/g, 0 和 1 mg/L BHT 处理组分别为 16.94 和 22.30 mg/g; 3 mg/L BHT 处理组虾青素含量则较低。

2.2 BHT 对雨生红球藻油脂和脂肪酸组分的影响

高光照、缺氮条件下, 0 和 2 mg/L BHT 处理组藻细胞中油脂的变化趋势如图 2 所示。0 和 2 mg/L BHT 处理组油脂含量均逐步上升, 最后趋于稳定; 2 mg/L BHT 处理组在 11 d 时达最高, 占细胞干重的 45.56%, 较对照组(39.06%)提高了 16.6%。

表 3 为第 11 天时 0 和 2 mg/L BHT 处理组脂肪酸组成。培养至 11 d, C16:0、C18:1n9t、C18:2n6c 和 C18:3n6 为脂肪酸的主要组成成分, 占总脂肪酸的 88%以上。2 mg/L BHT 处理组和对照组相比, 脂肪酸各组分含量变化不大, 仅 C18:1n9t 含量略微下降。

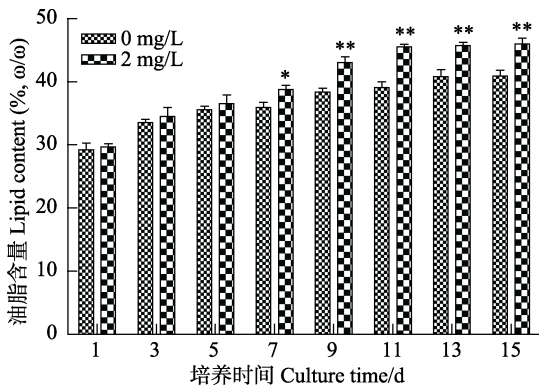


图 2 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻油脂积累的影响

Fig.2 Effects of BHT on lipid content of *H. pluvialis* during induction process

2.3 BHT 对雨生红球藻碳水化合物和蛋白质含量的影响

碳水化合物和蛋白质是藻细胞内重要的生理参数, 本研究检测了在添加 BHT 条件下二者的变化情况。2 mg/L BHT 处理组和对照组的碳水化合物含量均呈现下降趋势, 2 mg/L BHT 处理组从第 9 天开始显著低于对照组, 13 d 时至最低, 为细胞干重的 13.45%, 此时对照组为 16.12%(图 3A); 微藻细胞内蛋白含量总体呈降低趋势, 2 mg/L BHT 在 5 d、7 d

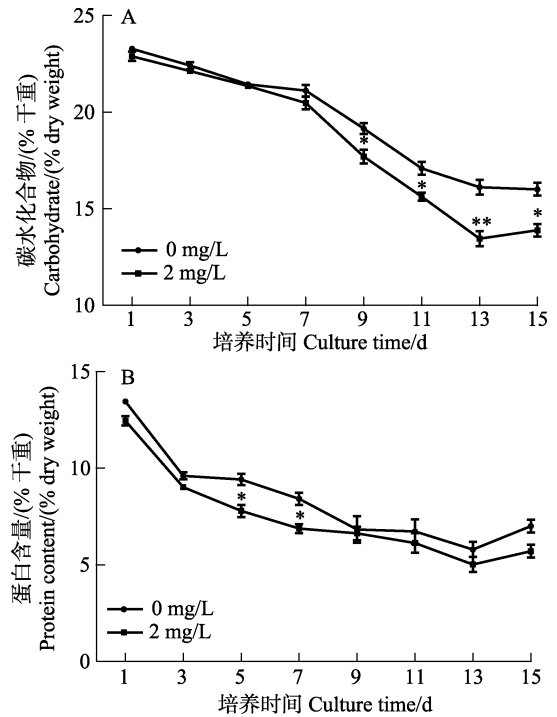


图 3 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻碳水化合物和蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of BHT on carbohydrate and protein content of *H. pluvialis* during induction process

表 3 不同浓度 BHT 对雨生红球藻脂肪酸组成的影响(%)
Tab.3 Effects of BHT on fatty acid profile of *H. pluvialis* during induction process (%)

脂肪酸 Fatty acids	0 mg/L BHT	2 mg/L BHT
C14:0	0.64±0.07	0.85±0.14
C15:0	0.14±0.03	0.17±0.03
C16:0	25.31±0.42	24.94±0.20
C16:1	0.48±0.18	0.53±0.01
C17:0	0.24±0.01	0.27±0.03
C18:0	2.61±0.43	3.31±0.29
C18:1n9t	19.67±0.21	17.49±0.13
C18:2n6c	28.80±0.28	28.96±0.06
C20:0	0.57±0.15	0.46±0.10
C18:3n3	2.67±0.29	2.89±0.61
C20:1n9	0.10±0.01	0.14±0.02
C18:3n6	16.58±0.31	17.41±0.01
C20:2	0.14±0.03	0.13±0.02
C22:0	0.42±0.07	0.34±0.01
C20:3n6	0.14±0.02	0.15±0.01
C20:4n6	0.98±0.04	1.25±0.01
C24:0	0.23±0.03	0.21±0.02
C20:5n3	0.23±0.02	0.32±0.01
单不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acid	20.25±0.15	18.16±0.12
多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acid	49.54±0.41	51.11±0.33
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid	30.16±0.32	30.34±0.28

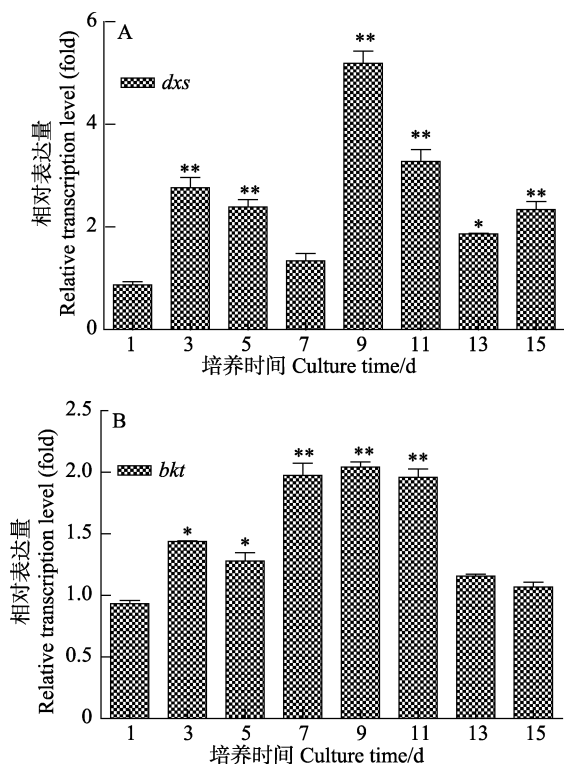


图 4 BHT 对 *dxs* 和 *bkt* 基因表达量的影响
Fig.4 Effects of BHT on the transcriptional expression levels of *dxs* and *bkt* during induction process

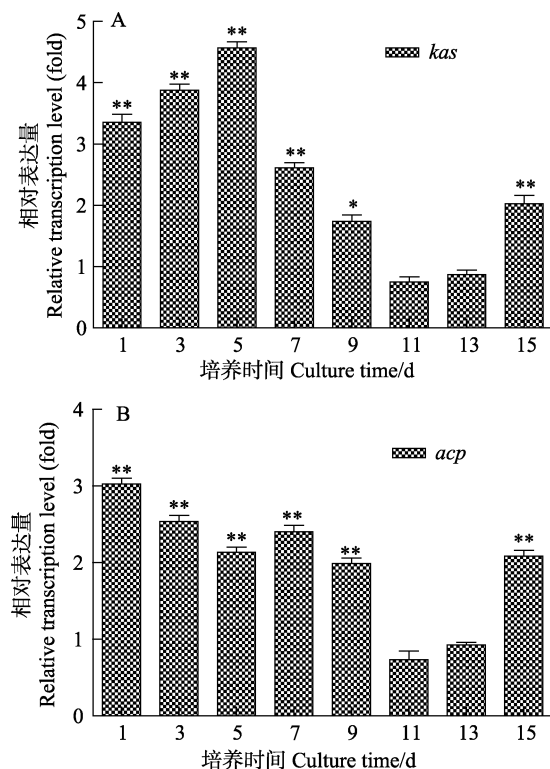


图 5 BHT 对 *kas* 和 *acp* 基因表达量的影响
Fig.5 Effects of BHT on the transcriptional expression levels of *kas* and *acp* during induction process

时显著低于对照组(图 3B)。

2.4 BHT 对雨生红球藻虾青素积累关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 的影响

dxs 和 *bkt* 是虾青素合成途径中的关键酶基因, 图 4 为培养过程中 *dxs* 和 *bkt* 基因的相对表达量变化。2 mg/L BHT 处理组的 *dxs* 基因相对表达量在 3、5、9、11、13 和 15 d 均显著高于对照组, 第 9 天时为对照组的 5.19 倍(图 4A); 与对照组相比, 2 mg/L BHT 处理组 *bkt* 表达量从第 3 天开始显著增加, 第 9 天时达到最高, 为对照组的 2.04 倍, 7 和 11 d 也显著高于对照组, 分别为 1.97 倍和 1.96 倍(图 4B)。

2.5 BHT 对雨生红球藻脂肪酸合成基因 *kas* 和 *acp* 的影响

用 qRT-PCR 方法检测不同诱导时间内, 2 mg/L BHT 诱导组和对照组雨生红球藻脂肪酸合成基因 *kas* 和 *acp* 的表达量(图 5A、图 5B), 2 mg/L BHT 处理组 *kas* 的相对表达量从第 1 天起显著高于对照组, 为对照组的 3.36 倍, 第 5 天达到最高, 为对照组的 4.57 倍; 整个诱导培养期间, 2 mg/L BHT 处理组 *acp* 基因的相对表达量也显著高于对照组。

3 讨论

3.1 培养基中添加 BHT 对雨生红球藻生长、虾青素积累和酶基因表达量的影响

本研究中, 外源添加不同浓度 BHT 的结果显示, 低浓度(1 和 2 mg/L)对雨生红球藻的生物量影响并不显著, 而高浓度(3 mg/L)对生物量影响较大, 对藻细胞有明显的毒害作用。2 mg/L BHT 诱导组的虾青素积累量显著高于其他组; 1 mg/L 的添加剂量组高于对照组, 但效果不如 2 mg/L 的处理组; 3 mg/L 添加量的毒害作用导致虾青素的积累无法进行。BHT 是一种抗氧化剂, 高浓度可能对机体产生促氧化作用(Prooxidant), 从而导致藻细胞死亡。Nanou 等(2010)利用高浓度的 BHT 处理真菌 *Blakeslea trispora* 时发现, BHT 与分子氧相互作用, 产生苯氧自由基和超氧阴离子, 表现出氧化性, 致使细胞死亡; 于威等(2018)研究发现, 利用高浓度抗氧化剂谷胱甘肽处理黄瓜幼苗呈现明显的致毒作用, 这均与本研究结果一致。Wen 等(2015)研究发现, 适宜浓度的乙醇诱导雨生红球藻能促进其虾青素的积累, 达到 25.10 mg/g; 丁巍等(2017)利用胺鲜酯诱导雨生红球藻提高了虾青

素的含量,最高可达 24.94 mg/g,这均低于本研究中虾青素积累量(31.66 mg/g)。

dxs 和 *bkt* 是虾青素合成途径中的关键酶基因,这 2 个基因表达量与虾青素的积累量呈正相关, Gao 等(2012)研究发现,外源添加水杨酸上调了 *bkt* 基因的相对表达量,促进了虾青素的合成。Ding 等(2018)发现,添加褪黑素提高了雨生红球藻细胞 *dxs* 和 *bkt* 基因表达量,同时提高了虾青素的积累量。本研究中,图 4 和图 1 对比可知,基因表达量和虾青素积累之间不具有同步性,虾青素的大量积累滞后于 *dxs* 和 *bkt* 的基因表达量增加。Gao 等(2012)使用水杨酸诱导虾青素积累时发现,虾青素合成关键酶基因分为转录后水平和转录水平基因,即有的基因在转录后上调虾青素生物合成,有的基因在转录时上调虾青素的合成。Zhao 等(2015)也证明了这一结论。

3.2 外源 BHT 对雨生红球藻油脂积累、脂肪酸组成和脂肪酸合成酶基因的影响

利用抗氧化剂作为诱导子来提高生物体内次生代谢产物的含量,逐步成为研究热点。Franz 等(2013)研究发现,添加适宜浓度的没食子酸诱导微藻 *Nannochloropsis salina* 能增加细胞内油脂含量,比对照组提高了 2.17 倍; Li 等(2017)外源添加褪黑素提高了单针藻 *Monoraphidium* sp. QLY-1 中的油脂含量。本研究使用 BHT 作为诱导子,提高了雨生红球藻中油脂的含量,达到细胞干重的 45.56%,高于其他文献报道的微藻油脂含量(Bogen *et al.*, 2013; Holbrook *et al.*, 2014; Shrivastav *et al.*, 2015)。

此外, Che 等(2016)研究发现,外源添加黄腐酸能提高油脂含量,脂肪酸各组分变化不大,这与本研究的结果一致。*acp* 和 *kas* 是脂肪酸合成通路中的关键酶基因,本研究中外源添加 BHT 提高了 *acp* 和 *kas* 的相对表达量,最高为对照组的 3.36 倍和 3.02 倍,促进了脂肪酸的合成。Lei 等(2012)也发现脂肪酸合成的增加往往伴随着 *acp* 和 *kas* 表达量的提高。Shang 等(2016)添加茴香醚诱导雨生红球藻合成虾青素, *acp* 和 *kas* 的相对表达量均升高,提高了脂肪酸含量,与本实验呈现一致结果;油脂积累延迟于基因表达水平的上调,说明 *acp* 和 *kas* 起到了转录后水平的调节作用。

碳水化合物和蛋白质是藻细胞重要的生理指标, Ho 等(2017)发现高盐诱导下, *Chlamydomonas* sp. JSC4 通过降低细胞内淀粉含量增加了脂质积累; Chokshi 等(2017)研究发现,微藻 *Acutodesmus dimorphus* 在缺氮条件下,细胞内的蛋白含量随着培养时间的进行而逐步降低。本研究中, BHT 处理组和对照组的

碳水化合物和蛋白均呈下降趋势, BHT 处理组下降更为显著。因此,在胁迫条件下,雨生红球藻可能通过分解自身的碳水化合物和蛋白来合成油脂和虾青素等代谢产物来提高抗性。

雨生红球藻虾青素的积累与油脂合成紧密相关,脂肪酸在虾青素合成中有两个作用,一是与虾青素酯化,形成虾青素酯,有利于虾青素的合成;另一个是形成脂质体(Lipid bodies, LBs)以贮存虾青素(Zhang *et al.*, 2016)。雨生红球藻中 95%的虾青素与脂肪酸发生酯化反应,形成虾青素酯,储存于富含甘油三酯的脂质体中,这一反应降低了底物的量,减少末端产物抑制作用,促进了虾青素的积累(Chen *et al.*, 2015)。增加脂肪酸的合成,合成的虾青素进入 LBs 后得以分隔,可作为减少末端产物抑制、增加虾青素积累的策略(Zhekisheva *et al.*, 2005)。

在高光照、缺氮条件下,外源添加适宜浓度抗氧化剂褪黑素能够抑制细胞内的活性氧(ROS),增加细胞内抗氧化酶活性和抗氧化物含量,维持细胞内的氧化还原处于平衡状态,促进虾青素和油脂的积累(Zhao *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018)。同样, BHT 作为抗氧化剂,可提高真菌中抗氧化酶活性,从而清除胞内过量 ROS,进而促进 β -胡萝卜素的合成(Nanou *et al.*, 2010)。另一方面, Ding 等(2018)通过外源添加抗氧化剂褪黑素诱导雨生红球藻发现,上调了细胞内一氧化氮(NO)和水杨酸(SA)水平, NO 和 SA 通过一系列级联反应促进了虾青素和脂肪酸的积累; SA 作为植物激素可促进雨生红球藻中虾青素的积累(Gao *et al.*, 2012);添加 NO 供体, SNP 可通过激活胞内抗氧化酶活性,猝灭过量 ROS,进而调控微藻在胁迫下的抗性(Kováčik *et al.*, 2015)。而适量 ROS 可以促进微藻中次级代谢产物的积累(Shi *et al.*, 2017)。因此,外源添加 BHT 可能是通过调控 ROS 和胞内相关信号分子水平,进而促进虾青素和油脂的积累(Zhao *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018; Nanou *et al.*, 2010)。此外, BHT 上调了虾青素和脂肪酸合成途径中关键酶基因的相对表达量,促进了虾青素和脂肪酸的积累。

4 结论

外源添加适宜浓度的 BHT 能促进诱导条件下雨生红球藻中虾青素和油脂的积累。2 mg/L BHT 处理雨生红球藻的效果最佳,虾青素积累量为 31.66 mg/g,是对照组的 1.87 倍,促进了虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 的表达;同时,提高了脂肪酸合成酶基因 *acp* 和 *kas* 表达量,油脂含量增加到干重的 45.56%,比对照组提高了 16.6%;油脂的积累,有利于虾青素

酯的形成, 从而增加了微藻细胞中虾青素的生物合成。

参 考 文 献

- Berges JA, Fisher AE, Harrison PJ. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology*, 1993, 115(2): 187–193
- Bogen C, Klassen V, Wichmann J, *et al.* Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 622–626
- Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 32(7): 1077–1082
- Che RQ, Ding K, Huang L, *et al.* Enhancing biomass and oil accumulation of *Monoraphidium* sp. FXY-10 by combined fulvic acid and two-step cultivation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 67: 161–165
- Chen C, Wu LM, Li YL, *et al.* Morphology of the early age and the pigment occurrence and the effects of different feed additives on the body color of *Plectropomus leopardus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 83–90 [陈超, 吴雷鸣, 李炎璐, 等. 豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*) 早期形态与色素变化及添加剂对其体色的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 83–90]
- Chen G, Wang B, Han D, *et al.* Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Plant Journal*, 2015, 81(1): 95–107
- Chen J, Liu L, Wei D. Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 518–529
- Chokshi K, Pancha I, Ghosh A, *et al.* Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 60
- Ding W, Yu XY, Peng J. Effect of diethyl aminoethyl hexanoate on astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis* LUGU. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(16): 150–153 [丁巍, 余旭亚, 彭俊. 胺鲜酯提高雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* LUGU)虾青素含量的作用. *食品工业科技*, 2017, 38(16): 150–153]
- Ding W, Zhao P, Peng J, *et al.* Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal Research*, 2018, 33: 256–265
- Ebrahimian A, Kariminia HR, Vosoughi M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 2014, 71: 502–508
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, *et al.* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(25): 22901–22909
- Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, *et al.* Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(5): 1053–1062
- Gao Z, Meng C, Chen YC, *et al.* Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(5): 1853–1860
- Gao Z, Meng C, Zhang X, *et al.* Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(4): 225–230
- He L, Liu JZ, Qin SL, *et al.* Identification of an astaxanthin-producing marine yeast strain YS-185 and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 97–101 [何磊, 刘均忠, 秦胜利, 等. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定及发酵条件优化. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 97–101]
- Higuera-Ciajara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(2): 185–196
- Ho SH, Nakanishi A, Kato Y, *et al.* Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. *Scientific reports*, 2017, 7: 45471
- Holbrook GP, Davidson Z, Tatara RA, *et al.* Use of the microalga *Monoraphidium* sp. grown in wastewater as a feedstock for biodiesel: Cultivation and fuel characteristics. *Applied Energy*, 2014, 131: 386–393
- Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, *et al.* Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(6): 1613
- Huang W, Ye J, Zhang J, *et al.* Transcriptome analysis of *Chlorella zofingiensis* to identify genes and their expressions involved in astaxanthin and triacylglycerol biosynthesis. *Algal Research*, 2016, 17: 236–243
- Kováčik J, Klejdus B, Babula P, *et al.* Nitric oxide donor modulates cadmium-induced physiological and metabolic changes in the green alga *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research*, 2015, 8: 45–52
- Lei A, Chen H, Shen G, *et al.* Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for*

- Biofuels, 2012, 5(1): 18
- Li D, Zhao Y, Ding W, *et al.* A strategy for promoting lipid production in green microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 by combined melatonin and photoinduction. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 104–112
- Liu J, Mao X, Zhou W, *et al.* Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 319–327
- Lorenz RT. A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose™ Technical Bulletin*, 1999, 60: 1–12
- Jia J, Han D, Gerken HG, *et al.* Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research*, 2015, 7: 66–77
- Nanou K, Roukas T. Oxidative stress response and morphological changes of *Blakeslea trispora* induced by butylated hydroxytoluene during carotene production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(8): 2415–2423
- Rao AR, Reddy AH, Aradhya SM. Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2010, 4(3): 809–819
- Saha SK, McHugh E, Hayes J, *et al.* Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 118–124
- Shah M, Mahfuzur R, Liang Y, *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 531
- Shang M, Ding W, Zhao Y, *et al.* Enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* using butylated hydroxyanisole. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 199–207
- Shi K, Gao Z, Shi TQ, *et al.* Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 793
- Shrivastav A, Mishra SK, Suh WI, *et al.* Characterization of newly isolated oleaginous microalga *Monoraphidium* sp. for lipid production under different conditions. *Algal Research*, 2015, 12: 289–294
- Wen Z, Liu Z, Hou Y, *et al.* Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 78: 10–17
- Yu W, Xie JM, Teng HW, *et al.* Effects of exogenous glutathione on antioxidant system in leaves of grafted cucumber, stock and scion seedlings under autotoxicity. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(1): 196–207 [于威, 颀建明, 滕汉玮, 等. 外源谷胱甘肽对自毒作用下嫁接黄瓜及砧穗幼苗叶片抗氧化系统的影响. *核农学报*, 2018, 32(1): 196–207]
- Yu X, Zhao P, He C, *et al.* Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 2012, 121: 256–262
- Yuan JP, Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 2000, 68(4): 443–448
- Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin-Goldberg I, *et al.* Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 2002, 38(2): 325–331
- Zhekisheva M, Zarka A, Khozin-Goldberg I, *et al.* Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 2005, 41(4): 819–826
- Zhang M, Mi TZ, Zhen Y, *et al.* Description of fatty acid synthesis pathway based on *Skeletonema marinoi* transcriptome. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(4): 81–93 [张梅, 米铁柱, 甄毓, 等. 基于玛氏骨条藻转录组的脂肪酸合成途径分析. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2018, 48(4): 81–93]
- Zhang Z, Sun D, Mao X, *et al.* The crosstalk between astaxanthin, fatty acids and reactive oxygen species in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, 2016, 19: 178–183
- Zhao L, Xie JY, Huang WC. Study on the synthesis of BHT catalyzed by ionic liquid. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(S2): 272–275 [赵磊, 谢君怡, 黄文才. 咪唑类离子液体催化合成抗氧化剂 BHT. *化工进展*, 2016, 35(S2): 272–275]
- Zhao Y, Li D, Xu JW, *et al.* Melatonin enhances lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions via a multi-level mechanism. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 46–53
- Zhao Y, Shang M, Xu JW, *et al.* Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry*, 2015, 50(12): 2072–2077

Effects of Butylated Hydroxytoluene on Accumulation of Astaxanthin and Lipids in *Haematococcus pluvialis* LUGU

YUE Chenchen¹, YU Xuya¹, ZHAO Yongteng¹, WANG Huiping^{2①}

(1. Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500;

2. Kunming Children's Hospital, Kunming 650228)

Abstract *Haematococcus pluvialis* is a microalga, and this species is economically important since it is a rich source of natural astaxanthin, which is considered a “super anti-oxidant.” The study was conducted using *H. pluvialis* LUGU filtrated from Lugu Lake in Yunnan Province, China. Studies have shown that under stress, the exogenous addition of appropriate concentration of butylated hydroxytoluene (BHT) can effectively promote the accumulation of astaxanthin and increase the content of lipids in the algal cells. The effects of BHT on several traits were investigated under stress conditions (high illumination and nitrogen deficiency), including the impact on growth of algae; the accumulation of astaxanthin; the synthesis of lipids; the composition of fatty acids, carbohydrates and protein; the expression level of the key enzyme gene of astaxanthin; and fatty acid biosynthesis. In this study, the different concentrations of BHT (0, 1, 2, and 3 mg/L) were achieved through single factor experiments in algal cell culture medium. Results from these experiments showed that BHT treatment does not effectively promote the algae growth, but it does affect the accumulation of astaxanthin in algae cells. There was a significant dose effect depending on the BHT treatment applied to *H. pluvialis*. After examining BHT additions of different concentrations, astaxanthin accumulation was determined to be the highest after the 2 mg/L BHT treatment, and it was significantly higher than that resulting from other treatments or the control group ($P < 0.05$). Moreover, astaxanthin accumulation was 1.87 times higher than that in the control group, reaching 31.66 mg/g. The lipid content of the 2 mg/L BHT treatment was 45.56%, which was also higher than that in the control (39.06%). Under these conditions, the expression levels of the key enzyme genes of astaxanthin synthesis, *dxs* and *bkt*, were 5.19 folds and 2.04 folds, respectively, as those of the control, and the expression levels of the key enzyme genes of fatty acid synthesis, *kas* and *acp*, were significantly higher than those of the control ($P < 0.05$), being 4.56 folds and 3.02 folds, respectively, as those of the control. Contrastingly, the carbohydrate and protein contents decreased compared to those of the control group. Overall, our results also show that BHT can increase accumulation of astaxanthin and increase the content of lipids in the algal cells when administered at an appropriate dose.

Key words *Haematococcus pluvialis*; Butylated hydroxytoluene; Astaxanthin; Lipids; Astaxanthin synthesis genes; Fatty acid synthesis genes

① Corresponding author: WANG Huiping, E-mail: 2500016390@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180912002

http://www.ykxjz.cn/

张永刚, 李彬, 王印庚, 王金燕, 廖梅杰, 张正, 宁鲁光, 范瑞用. 刺参养殖池塘中一株植物乳杆菌的分离及其生物学特性. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 154-162

Zhang YG, Li B, Wang YG, Wang JY, Liao MJ, Zhang Z, Ning LG, Fan RY. Screening and characteristic analysis of *Lactobacillus plantarum* from ponds for sea cucumber farming. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 154-162

刺参养殖池塘中一株植物乳杆菌的 分离及其生物学特性*



张永刚^{1,2,3} 李彬^{2,3①} 王印庚^{2,3} 王金燕^{2,3}
廖梅杰^{2,3} 张正^{2,3} 宁鲁光⁴ 范瑞用⁵

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 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. 山东海跃水产科技有限公司 东营 257500; 5. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400)

摘要 2017年5月, 从山东东营刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘底泥中分离获得49株乳酸菌。以刺参“腐皮综合征”的2株致病菌[灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)]为指示菌进行拮抗作用实验, 获得1株具有显著抑菌活性的乳酸菌CLY-5, 对该菌株进行了生理生化实验、16S rDNA序列分析、生长特性及其对刺参的安全性研究。结果显示, 菌株CLY-5对灿烂弧菌和假交替单胞菌具有较好的抑制作用, 且菌株的胞内产物与胞外产物均具有抑菌效果, 抑菌圈分别为20、23 mm和27、38 mm, 胞外产物的拮抗作用优于胞内产物。利用该菌对刺参进行高浓度浸浴测试其安全性, 浓度为 1×10^9 、 1×10^8 和 1×10^7 CFU/ml, 实验期间刺参状态良好, 无死亡现象。16S rDNA序列分析表明, CLY-5与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* NR117813.1)的相似性为100%, 初步鉴定该菌株为植物乳杆菌。菌株CLY-5在30℃~44℃、pH 6~8范围内生长较快, 20 h进入对数生长期, 28~32 h达到生长高峰。筛选的植物乳杆菌具有良好的抑菌能力, 且其生长特性适应刺参池塘的养殖环境, 为刺参疾病的生态防控及乳酸菌资源的开发提供应用数据参考。

关键词 刺参; 腐皮综合征; 灿烂弧菌; 假交替单胞菌; 植物乳杆菌; 抑菌活性

中图分类号 S9174; S968.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0154-09

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016008)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2018GH10)、山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)、威海市海洋经济创新发展示范城市产业链协同创新类项目和山东省自主创新成果转化专项(2013ZHGX2A0801)共同资助[This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS(20603022016008), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2018GH10), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province(2017LZGC010), Industrial Chain Collaborative Innovation Project for Marine Economic Innovation and Development Demonstration in Weihai, and Independent Innovation and Achievements Transformation of Shandong Province (2013ZHGX2A0801)]. 张永刚, E-mail: 2418342572@qq.com

① 通讯作者: 李彬, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-09-12, 收修改稿日期: 2018-10-08

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又称刺参,是营养价值药用价值极高的海珍品,被誉为“海产八珍”之首,主要分布于辽宁、河北、山东沿海。2016年刺参养殖面积达到21.8万 hm^2 ,年产量达到20.4万t(农业部渔业渔政管理局,2017)。然而,随着刺参养殖业的迅速扩展,特别是集约化与规模化养殖技术的推广,病害问题也接踵而至,严重影响了该产业的健康可持续发展。刺参的主要疾病为“腐皮综合征”,其发病率和死亡率高,是制约该养殖业的一大难题。已报道的主要致病菌有假交替单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(王印庚等,2006)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)(张春云等,2006)等。目前,水产动物疾病大多采用抗生素类化学药物控制,长期使用会导致病原菌产生耐药性和养殖环境微生物的生态平衡失调(Estefanía *et al*, 2013)。而乳酸菌既可抑制有害菌的生长,又能改善水质、增强免疫力、促进养殖动物生长,逐渐成为水产健康养殖的研究热点(Chi *et al*, 2014; Wang *et al*, 2015; Zhao *et al*, 2016)。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类可以利用碳水化合物产生大量乳酸且具有拮抗、免疫及营养等作用的细菌的总称,作为一种天然活性益生菌广泛分布于自然界中,在水产、畜禽及食品加工等产业中应用广泛(谯仕彦等,2014;王睿迪等,2018;Navinchandran *et al*, 2014;Khouadja *et al*, 2017;Li *et al*, 2018)。而乳酸菌在刺参养殖的应用研究中,已初步揭示了乳酸菌对刺参生长、免疫及养殖环境的作用。宫魁等(2013)发现,在刺参基础饲料中添加乳酸菌及其代谢产物对刺参肠道菌群平衡、免疫力及生长均具有良好的促进作用。张涛等(2009)利用乳酸菌和芽孢杆菌以不同浓度配比添加到饲料中进行刺参饲养实验,发现对提高刺参的免疫功能有积极作用。然而,关于乳酸菌对刺参病害防控的研究鲜有报道,本研究从刺参养殖池塘底泥中筛选可抑制刺参主要病原菌的乳酸菌,并研究其生长特性,为刺参池塘健康养殖提供优良的乳酸菌株和应用数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 池塘条件 本研究在山东省东营市某刺参养殖场进行,池塘面积约为5.01 hm^2 ,水深为1.5~2 m。水源来自近海海水,刺参密度为20万头/ hm^2 ,规格约为1~2 g/头,春秋季节投喂鼠尾藻、海带等饵料。

1.1.2 样品采集 采样时间为2017年5月,水温为23 $^{\circ}\text{C}$,盐度为29;利用调查船驶到池塘中预先标记好的采样点,使用采泥器在池塘中间的2个点位分

别采集池底底泥的表层物(约5 cm),将其混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.3 培养基 LB培养基和MRS培养基均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的培养与分离 称取底泥样品1 g,使用灭菌生理盐水进行梯度稀释,充分混匀,收集上清液。用灭菌生理盐水再对上清液进行稀释后,涂布MRS平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养24~48 h,进行平板计数、分离和保种,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 拮抗菌的筛选 以刺参“腐皮综合征”2种致病菌灿烂弧菌及假交替单胞菌为指示菌,采用牛津杯法测定分离的乳酸菌对2株致病菌的抑制效果。用接种环刮取少量指示菌,使用灭菌生理盐水稀释后,均匀涂布于牛津杯打孔的LB平板上。同样,用接种环刮取活化24 h的分离菌株,使用灭菌生理盐水稀释到 1×10^8 CFU/ml,取150 μl 置于小孔内,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24~36 h,观察小孔周围抑菌圈情况。最后,选取对2株具有最佳抑菌效果的乳酸菌CLY-5作为候选益生菌,并进一步开展菌株CLY-5胞内、胞外产物抑菌效果比较及对刺参的安全性评价。

1.2.3 菌株胞内、胞外产物的抑菌效果比较

1.2.3.1 胞内及胞外产物的制备 采用MRS液体培养基对乳酸菌CLY-5进行培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min恒温培养24 h。培养液5000 r/min离心10 min,上清液用0.22 μm 微孔滤膜过滤,得到无细胞上清液,即为供试菌胞外产物,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。菌株CLY-5菌泥使用PBS冲洗3次后,用超声波细胞破碎仪进行细胞破碎,得到供试菌胞内产物,随即用于进一步实验。

1.2.3.2 胞内及胞外产物抑菌效果比较 以灿烂弧菌及假交替单胞菌为指示菌,采用牛津杯法分别测定所制备的乳酸菌CLY-5胞内产物和胞外产物对2株致病菌的抑制效果。

1.2.4 菌株对刺参的安全性评价 实验用健康刺参来自山东省青岛瑞滋海珍品发展有限公司,规格为15~20 g/头。刺参在暂养7 d后随机分组,每组20头。实验水槽有效容积为25 L。分实验组和对照组,其中,实验组采用浸浴方式,浸浴浓度为 1×10^7 、 1×10^8 和 1×10^9 CFU/ml,每个组别设3个平行。

实验共进行30 d,实验期间的水温为16 $^{\circ}\text{C}$ ~18 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度为29,保持连续充气,每天饵料按刺参重量的1%投喂,用虹吸法吸取水槽内残饵及粪便,日换水量为总水量的1/5,换水后,在水槽中加入相应浓度菌液。每天观察并记录刺参的活力、体色、摄食、排

便、病征及死亡等情况。

1.2.5 菌株的生理生化鉴定 参照麦氏比浊法制备 0.5 麦氏浊度的菌悬液,以细菌微量检定管进行生理生化指标的测定。参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文等, 1999)进行归类判定。

1.2.6 菌株的 16S rDNA 序列分析 采用北京天根生物细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行细菌 DNA 的提取。利用细菌 16S rDNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTAC-CTTGTTACGACTT-3')对细菌总 DNA 的相应序列进行扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后进行测序。将测序结果通过 Blast 检索程序与 NCBI 基因库中相关序列进行比对,并通过 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.2.7 菌株生长特性研究

1.2.7.1 不同温度条件对菌株生长的影响 参照孔彦卓等(2017),将筛选菌株 CLY-5 接种于已灭菌的 300 ml MRS 液体培养基中,置于 16℃、23℃、30℃、37℃、44℃、51℃、58℃ 细菌振荡培养箱中,180 r/min 恒温培养 24 h,计数,确定菌株的最适温度。

1.2.7.2 不同 pH 条件对菌株生长的影响 参考杜静芳等(2017),用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 将 MRS 液体培养基 pH 分别调至 2、4、6、8、10 和 12,将筛选菌株 CLY-5 接种于不同 pH 的 300 ml MRS 液体培养基中,180 r/min 恒温培养 24 h,计数,确定菌株最适 pH。

1.2.7.3 绘制菌株生长曲线 将乳酸菌 CLY-5 接种于已灭菌的 300 ml MRS 液体培养基中,根据菌株最适生长温度,180 r/min 恒温培养 52 h。培养过程中每间隔 4 h 取 1 次样品,计数,绘制菌株的生长曲线。

2 结果

2.1 拮抗菌的筛选

利用 MRS 培养基对刺参养殖池塘底泥样品中的乳酸菌进行培养、分离与纯化,共获得 49 株乳酸菌,分别编号为 CLY-1~CLY-49。通过对指示菌的拮抗实验,筛选出 1 株具有显著拮抗作用的乳酸菌 CLY-5,该菌株对灿烂弧菌和假交替单胞菌均有良好的抑制作用(图 1)。该菌株形成的群落表面光滑、有光泽、中央隆起、不透明、乳白色或淡黄色、具有酸味。显微镜下呈直或弯杆状,两端呈圆形突起,革兰氏染色阳性,无鞭毛、无芽孢(图 2、图 3)。

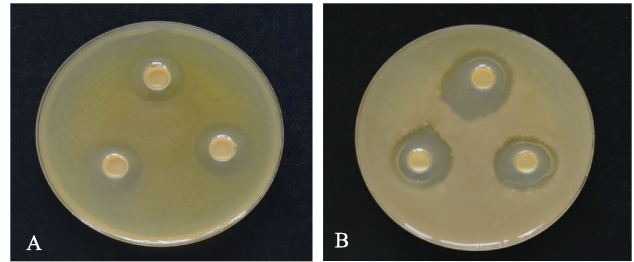


图 1 菌株 CLY-5 对病原菌的抑制作用
Fig.1 Antagonistic activities of strain CLY-5

A: 灿烂弧菌; B: 假交替单胞菌
A: *V. splendidus*; B: *P. nigrifaciens*

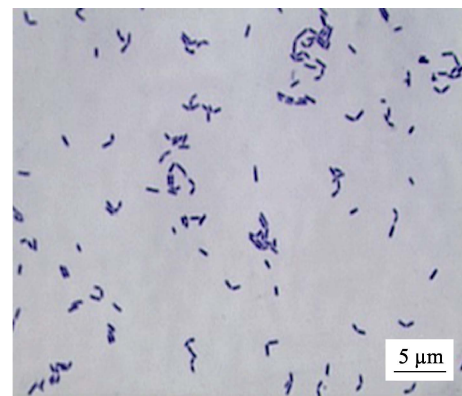


图 2 菌株 CLY-5 的革兰氏染色
Fig.2 Gram's staining of strain CLY-5

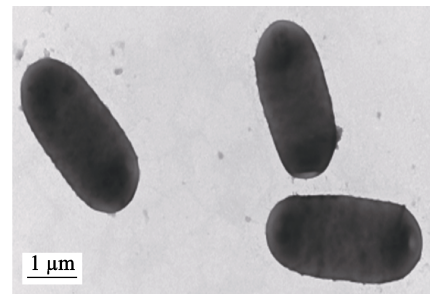


图 3 菌株 CLY-5 的透射电镜
Fig.3 TEM photograph of strain CLY-5

2.2 菌株胞内、胞外产物的抑菌效果比较

由图 4 可以看出,候选菌株 CLY-5 的胞内、胞外产物对指示菌灿烂弧菌和假交替单胞菌均具有较强的抑菌作用,胞内产物对上述 2 种指示菌的抑菌圈分别为 20 和 23 mm,胞外产物对 2 种指示菌的抑菌圈分别为 27 和 38 mm。结果显示,候选菌株的胞外产物对指示菌的拮抗作用明显优于胞内产物。

2.3 安全性实验

通过细菌高浓度胁迫实验测试筛选的乳酸菌

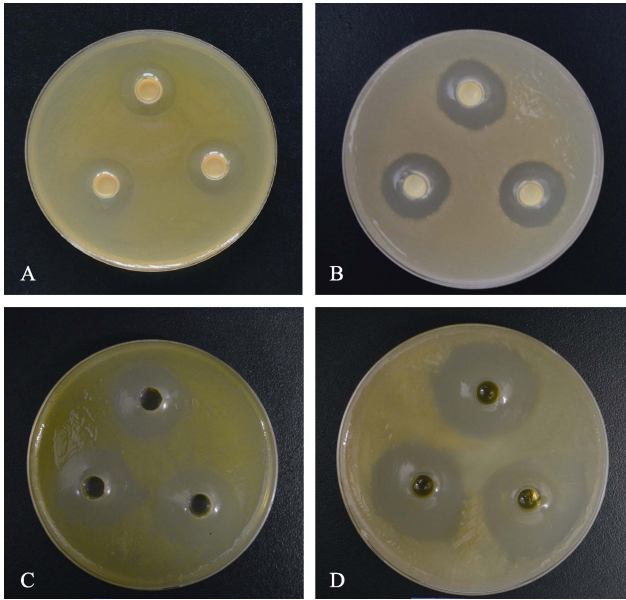


图 4 菌株 CLY-5 胞内、胞外产物对病原菌的抑制作用
Fig.4 Antagonistic activities of intracellular products and extracellular products derived from strain CLY-5

A、B 为菌株 CLY-5 胞内产物对灿烂弧菌、假交替单孢菌的抑制作用；C、D 为菌株 CLY-5 胞外产物对灿烂弧菌、假交替单孢菌的抑制作用

A, B: Effects of antibacterial activity of intracellular products of CLY-5 on *V. splendidus* and *P.nasnigrifaciens*;
C, D: Effects of antibacterial activity of extracellular products of CLY-5 on *V. splendidus* and *P.nasnigrifaciens*

CLY-5 对刺参的安全性(表 1), 浸浴组 1.0×10^7 CFU/ml 在整个实验过程中刺参健康, 活力良好, 摄食正常, 无排脏、发病和死亡现象; 浸浴浓度在 1.0×10^8 和 1.0×10^9 CFU/ml 的条件下, 高浓度胁迫 1 d 后, 分别有 1 和 3 头刺参出现排脏现象, 但无死亡现象。

2.4 生理生化鉴定

通过对菌株 CLY-5 进行生理生化鉴定, 由表 2 可知, 菌株 CLY-5 能分解利用葡萄糖、山梨醇、蜜二糖、木糖、蔗糖和甘露醇; 3% NaCl 尿素酶、3% NaCl、ONPG、苦杏仁苷和丙二酸盐呈阳性, 不液化明胶, 不产生 H_2S 气体, 主要生理生化特征见表 2。参照《常见细菌系统鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》中乳杆菌属的特征, 对菌株 CLY-5 进行分类地位的鉴定, 初步鉴定筛选菌株属于乳杆菌科(Lactobacillaceae)。

2.5 菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

采用通用引物对菌株 CLY-5 的 16S rDNA PCR 扩增产物进行序列测定。使用 Blast 软件对所获得测序结果在 NCBI 数据库进行序列相似性比对分析, 系统发育树如图 5 所示。结果显示, 本研究分离获得的菌株 CLY-5 属于乳杆菌科乳杆菌属(*Lactobacillus*), 与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* NR 117813.1)的相似性为 100%。

表 1 菌株 CLY-5 的安全性实验

Tab.1 Safety testing of strain CLY-5 onto sea cucumber *A. japonicus*

组别 Group	浓度 Concentration (CFU/ml)	胁迫方式 Mode of coercion	排脏数量(头) Evisceration number	死亡数量(头) Dead number
CLY-5	10^7	浸浴 Dipping bath	0	0
CLY-5	10^8	浸浴 Dipping bath	1	0
CLY-5	10^9	浸浴 Dipping bath	3	0
对照组 Control	0	—	0	0

2.6 菌株的生长特性

2.6.1 菌株最适生长温度 菌株 CLY-5 在不同温度下的生长情况如图 6 所示。菌株在 $16^\circ\text{C} \sim 58^\circ\text{C}$ 范围内均可以生长, 在 $16^\circ\text{C} \sim 23^\circ\text{C}$ 范围内生长速度较缓慢, 菌落数没有显著差异, $30^\circ\text{C} \sim 44^\circ\text{C}$ 范围内表现出明显的生长优势; 37°C 时生长速度最快, 菌落数明显高于其他温度组。

2.6.2 不同 pH 条件对菌株 CLY-5 生长的影响 菌株 CLY-5 在不同 pH 条件下的生长情况如图 7 所示。pH 在 2~12 范围内均可以生长, 但菌株在 pH 为 2 和 12 时生长缓慢, pH 为 6 时生长速度最快。

2.6.3 生长曲线 菌株 CLY-5 的生长曲线如图 8

所示。结果显示, CLY-5 在 0~16 h 时生长较缓慢, 20 h 后进入对数生长期, 在 24~32 h 时达到生长高峰, 28 h 时菌落数最高, 达到 2.13×10^{10} CFU/ml, 32 h 后生长速度缓慢下降, 逐渐进入稳定期。

3 讨论

本研究从山东省东营刺参养殖池塘底泥样品中分离获得 49 株乳酸菌, 通过对刺参“腐皮综合征”2 株致病菌的拮抗实验, 获得 1 株具有显著抑菌活性的菌株 CLY-5, 通过对其生理生化及 16S rDNA 序列分析, 该菌株鉴定为植物乳杆菌。植物乳杆菌因具有良好的益生菌特性, 其报道较多(Lee *et al.*, 2010; Jiang

表2 菌株 CLY-5 的生理生化特征
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of strain CLY-5

生化项目 Biochemical items	CLY-5	生化项目 Biochemical items	CLY-5
无盐胰胨水 No salt tryptone water	-	鼠李糖 Rhamnose	-
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl Tryptone water	-	蜜二糖 Melibiose	+
6% NaCl 胰胨水 6% NaCl Tryptone water	-	3% NaCl ONPG	+
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl Tryptone water	-	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl Urease	+
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl Glucose	+	木糖 Xylose	+
3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl Hydrothion produce	-	3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl Ornithine decarboxylase	-
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl Mannitol	+	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl Lysine decarboxylase	-
3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabinose	-	3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl Arginine dihydrolase	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl Lactose	-	Kovacs 试剂 Kovacs reagent	-
山梨醇 Sorbitol	+	3% NaCl MR-VP	-
苦杏仁苷 Amygdalin	+	3% NaCl 明胶 3% NaCl Gelatine	-
肌醇 Inositol	-	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	-
丙二酸盐 Malonate	+	3% NaCl 蔗糖 3% NaCl Sucrose	+
氧化酶产生 Oxidase strips	-	半固体琼脂 Semi-solid agar	-

注：+表示阳性，-表示阴性

Note: + means positive reaction, - means negative reaction

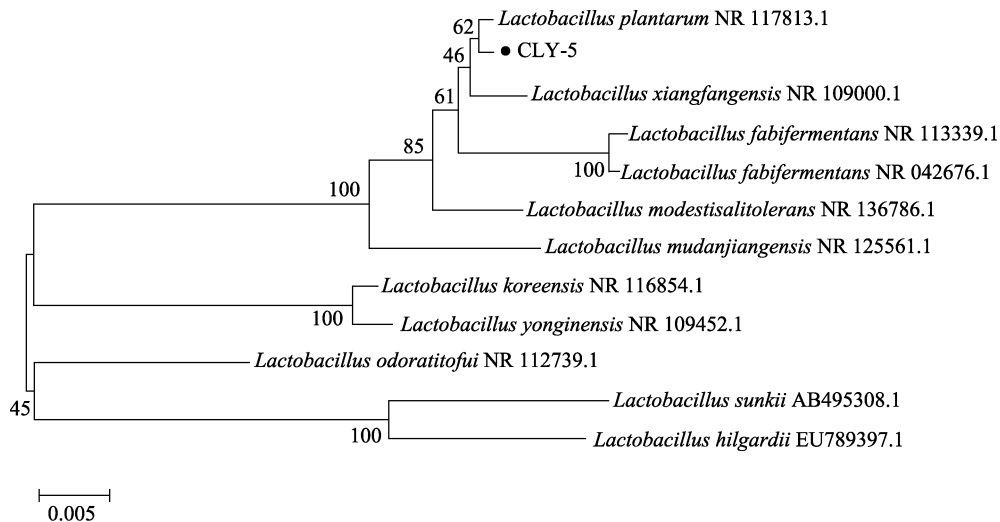


图5 基于16S rDNA序列的菌株 CLY-5 系统发育树
Fig.5 Clustering results of strain CLY-5 based on 16S rDNA sequence

et al, 2016; 李存玉等, 2017; 韩墨等, 2018)。但从刺参养殖池塘中分离且对“腐皮综合征”致病菌具有抑制作用的植物乳杆菌尚未见报道。

乳酸菌广泛分布于动物肠道中,能够抑制肠道内致病菌的生长繁殖,并与肠粘膜免疫系统间相互作用,维持肠道内的微生态平衡,使用乳酸菌逐渐成为预防动物疾病的一项重要措施(Balcázar et al, 2008)。目前,关于乳酸菌抑菌作用机理的研究较多。Cai 等(1998)证实了乳酸菌的抑菌物质为乳酸;Lash 等(2005)

研究发现,植物乳杆菌 ATCC8014 的胞外产物对多种革兰氏阳性和阴性细菌的生长具有抑制作用,且发现起到抑制作用的物质是植物乳杆菌分泌的一种细菌素。本研究也发现,植物乳杆菌 CLY-5 的胞内、胞外产物对刺参腐皮综合征 2 株致病菌(假交替单胞菌和灿烂弧菌)均具有显著抑菌活性,且胞外产物抑菌活性优于胞内产物。下一步将针对具有抑制作用的胞外产物进行成分分析和鉴定,阐明胞外产物的抑菌机理。

温度、pH 是影响乳酸菌生长的重要因素,探究

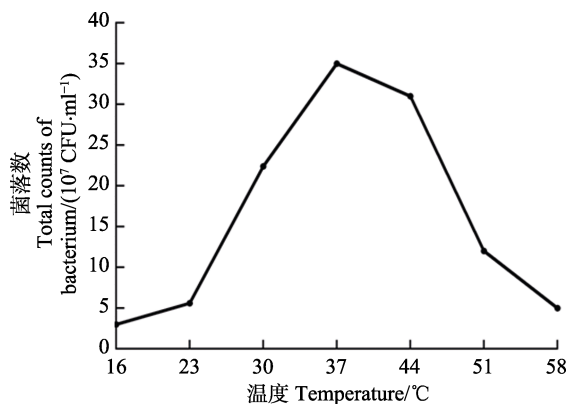


图 6 不同温度下菌株 CLY-5 的生长情况

Fig.6 Growth of strain CLY-5 at different temperature

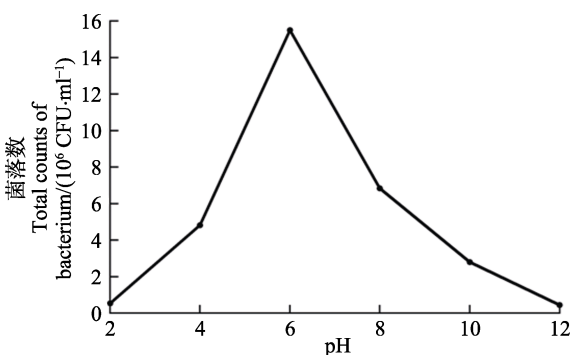


图 7 不同 pH 对菌株 CLY-5 生长的影响

Fig.7 Effect of different pH on the growth of strain CLY-5

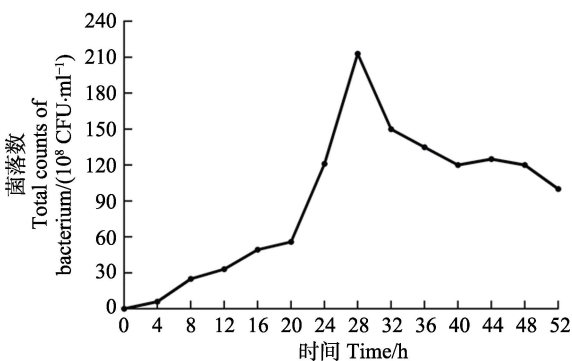


图 8 菌株 CLY-5 的生长曲线

Fig.8 Growth curve of strain CLY-5

乳酸菌的生物学特性对掌握其最适培养条件具有重要意义,可为其发酵生产提供理论依据。本研究筛选的植物乳杆菌 CLY-5 最适生长温度为 37℃,最适 pH 为 6,20 h 后进入对数生长期,28 h 时生长进入高峰期,活菌数量可达 2.13×10^{10} CFU/ml。本研究结果与杜斌等(2018)对植物乳杆菌 CJY1-1 的生物学特性研究结论相似。曲磊等(2018)研究 1 株鱼源植物乳杆菌 C₂0015 的生物学特性发现,菌株在 10 h 开始进入生长稳定期,20 h 时细菌数达到最大值 3.6×10^9 CFU/ml,50℃时,C₂0015 活菌数下降不明显,其生物学特性

与本研究结果有一定差异。菌株 CLY-5 与 C₂0015 相比,前者进入对数生长期虽然时间较晚,但在生长高峰期时菌量远远高于后者。从生物学特性来看,植物乳杆菌 CLY-5 的发酵可在温度、酸碱度较大阈值范围内进行,进入高峰期快,且高峰期活菌数量大,适宜进行规模化生产和产品开发。

益生菌的安全性和合理性使用引起研究学者的高度重视,一些益生菌的过量使用会引发水产动物出现病症,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可引起斑节对虾(*Penaeus monodon*)细菌性白斑综合征(Wang *et al*, 2000);蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)可引起刺参“腐皮综合征”及凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)白斑病(骆艺文等, 2009; Velmurugan *et al*, 2015)。目前,尚未发现关于乳酸菌造成水产养殖动物发病的报道。本研究筛选的植物乳杆菌 CLY-5 以 1.0×10^7 CFU/ml 浸浴健康刺参,供试刺参在 30 d 时均无发病体征和死亡现象,刺参健康、摄食正常、活力良好。虽然,乳酸菌浸浴浓度为 1.0×10^8 和 1.0×10^9 CFU/ml 实验组少量刺参个体出现了不同程度的排脏现象,这可能是刺参在高浓度乳酸菌胁迫下出现的应激反应。关于植物乳杆菌在水产养殖动物的应用方面,Talpur 等(2013)在远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)幼蟹养殖水体中添加浓度为 5.0×10^6 CFU/ml 的植物乳杆菌,可以显著提高幼蟹的成活率及蛋白酶和淀粉酶活性,同时可以改善养殖水质。刘长军(2018)在罗非鱼饲料中添加浓度为 1.0×10^7 CFU/ml 的植物乳杆菌,可显著提高罗非鱼的增重率和特定生长率。Suzer 等(2008)在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)仔鱼水体中加入含植物乳杆菌的复合乳酸菌,可提高仔鱼的生长性能及消化酶活性。对植物乳杆菌 CLY-5 进行了刺参大水面池塘养殖应用发现,其对刺参池塘水质具有良好调控作用,同时对刺参生长也有良好的促进作用(另文报道)。初步的养殖实践显示,将植物乳杆菌 CLY-5 发酵生产后泼洒到刺参养殖池水中,对刺参是安全的。然而,我国刺参养殖以池塘养殖为主,这种开放式养殖模式的废水大多数是直接排放入海,大量使用植物乳杆菌作为水产微生态制剂是否对其他海水养殖种类、浅海生态环境及菌群结构产生影响,还需进一步研究探讨。

综上所述,植物乳杆菌 CLY-5 具有对外界适应能力强、生长温度范围广、抑菌能力强,且该菌株对刺参是安全的。今后将进一步对植物乳杆菌 CLY-5 进行深入研究,探索其对刺参生长、生殖、免疫和养殖池塘菌群结构的影响,开展水域生态环境的安全性评价,为水产动物乳酸菌类微生态制剂的规模化及商品化推广奠定基础。

参 考 文 献

- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, *et al.* Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 2008, 278(1-4): 188-191
- Cai Y, Benno Y, Nakase T, *et al.* Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1998, 44(5): 311-316
- Chi C, Liu JY, Fei SZ, *et al.* Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 367-373
- Dong XZ, Cai MY. Common bacteria system identification manual. Beijing: Science Press, 2001, 45-65 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 45-65]
- Du B, Wu WN, Wang JY, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of lactic acid bacteria from Gaeml traditional preserved fish. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(7): 185-188 [杜斌, 吴文能, 王继玥, 等. 侗族传统腌鱼中乳酸菌的分离鉴定与生物学特性. 江苏农业科学, 2018, 46(7): 185-188]
- Du JF, Miao LH, Ma HH, *et al.* Screening and identification of lactic acid bacteria with antagonistic *Vibrio parahaemolyticus* derived from freshwater fish intestinal. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(5): 168-175 [杜静芳, 缪璐欢, 马欢欢, 等. 淡水鱼肠道中拮抗副溶血弧菌乳酸菌的筛选及鉴定. 中国食品学报, 2017, 17(5): 168-175]
- Estefanía MA, Beatriz GS, Carlos A, *et al.* Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 1-22
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fishery statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2017 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]
- Gong K, Wang BJ, Liu M, *et al.* The influence of lactic acid bacteria and metabolites on intestinal microflora and nonspecific immunity of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Marine Sciences*, 2013, 37(7): 7-12 [宫魁, 王宝杰, 刘梅, 等. 乳酸菌及其代谢产物对刺参幼体肠道菌群和非特异性免疫的影响. 海洋科学, 2013, 37(7): 7-12]
- Han M, Wang Y, Yang ZP, *et al.* Screening of lactic acid bacteria in traditional yoghurt of Inner Mongolia and evaluation of its benefit *in vitro*. *Food Research and Development*, 2018, 39(1): 152-156 [韩墨, 王燕, 杨志鹏, 等. 内蒙古传统酸奶乳酸菌的筛选及体外益生效果评价. 食品研究与开发, 2018, 39(1): 152-156]
- Jiang ML, Zhang F, Wan CX, *et al.* Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 1736-1746
- Khouadja S, Haddaji N, Hanchi M, *et al.* Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics for *Vibrio parahaemolyticus* depuration in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1885-1894
- Kong YZ, Yin LB, Lei ZM, *et al.* Study on isolation and characterization of high acid-producing lactic acid bacteria. *China Food Additives*, 2017(9): 88-94 [孔彦卓, 尹乐斌, 雷志明, 等. 一株高产酸乳酸菌的分离鉴定及生物学特性研究. 中国食品添加剂, 2017(9): 88-94]
- Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014). *Food Microbiology*, 2005, 22(2-3): 199-204.
- Lee HI, Kim MH, Kim KY, *et al.* Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*, 2010, 16(5): 522-526
- Li C, Ren Y, Jiang S, *et al.* Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 69-75
- Li CJ. The effect of *Lactobacillus plantarum* 08.923 on *Oreochromis niloticus* gut mucosal immunity and growth performance. *Feed Industry*, 2018, 39(12): 43-48 [刘长军. 植物乳杆菌对尼罗罗非鱼的肠道黏膜免疫调节及生长性能的影响. 饲料工业, 2018, 39(12): 43-48]
- Li CY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Isolation, culture, and identification of two strains of probiotics and their effects on water quality control. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 120-127 [李存玉, 柳学周, 徐永江, 等. 两株有益菌的分离、培养、鉴定及其水质调控效果评价. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 120-127]
- Ling DW, Dong XZ. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods. Beijing: China Light Industry Press, 1999, 130-137 [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, 130-137]
- Luo YW, Hao ZK, Wang YG, *et al.* A *Bacillus cereus* causing "skin ulcer syndrome" of sea cucumber. *Fisheries Science and Technology Information*, 2009, 36(2): 60-63 [骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽胞杆菌. 水产科技情报, 2009, 36(2): 60-63]
- NavinChandran M, Iyapparaj P, Moovendhan S, *et al.* Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 36: 38-45
- Qiao SY, Hou CL, Zeng XF. Regulation and mechanism of lactic acid bacteria on porcine intestinal barrier function. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(10): 3052-3063 [譙

- 仕彦, 侯成立, 曾祥芳. 乳酸菌对猪肠道屏障功能的调节作用及其机制. 动物营养学报, 2014, 26(10): 3052-3063]
- Qu L, Kang YH, Sun WW, *et al.* Research on some biological characteristics of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from fish. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(5): 181-184 [曲磊, 康元环, 孙武文, 等. 一株鱼源植物乳杆菌的部分生物学特性研究. 黑龙江畜牧兽医, 2018(5): 181-184]
- Suzer C, Coban D, Kamaci HO, *et al.* *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 2008, 280(1-4): 140-145
- Talpur AD, Ikhwanuddin M, Abdullah MDD, *et al.* Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. Aquaculture, 2013, 416-417: 173-178
- Velmurugan S, Palanikumar P, Velayuthani P, *et al.* Bacterial white patch disease caused by *Bacillus cereus*, a new emerging disease in semi-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 2015, 444(3): 49-54
- Wang JH, Zhao LQ, Liu JF, *et al.* Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 43(5): 330-336
- Wang RD, Liu SN, Wang Y, *et al.* Analysis on quality characteristics and dominant strains of dried salted Spanish mackerel. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 141-147 [王睿迪, 刘胜男, 王玉, 等. 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 YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610-616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610-616]
- Wang YG, Lee KL, Najiah M, *et al.* A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 41(1): 9-18
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118-123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123]
- Zhang T, Bai L, Li L, *et al.* Effect of different combinations of probiotics on digestibility and immunity index in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(S1): 64-68 [张涛, 白岚, 李蕾, 等. 不同添加量的益生菌组合对仿刺参消化和免疫指标的影响. 大连水产学院学报, 2009, 24(S1): 64-68]
- Zhao YC, Yuan L, Wan JL, *et al.* Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 49: 237-242

(编辑 马璀艳)

Screening and Characteristic Analysis of *Lactobacillus plantarum* from Ponds for Sea Cucumber Farming

ZHANG Yonggang^{1,2,3}, LI Bin^{2,3①}, WANG Yingeng^{2,3}, WANG Jinyan^{2,3},
LIAO Meijie^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, NING Luguang⁴, FAN Ruiyong⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 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. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071; 4. Shandong Haiyue Aquatic Science and Technology Co. Ltd, Dongying 257500; 5. Qingdao Ruizhi Seafood Development Co. Ltd, Qingdao 266400)

Abstract Forty-nine lactic acid bacteria strains were isolated from sediment samples from cultured ponds of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) in Dongying, Shandong Province, in May 2017. First, antagonistic bacterial experiments were conducted using *Vibrio splendidus* and *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, which are the main pathogenic bacteria of “skin ulcer syndrome” for sea cucumbers, and a lactic acid bacteria CLY-5, which has demonstrated significant bacteriostatic activity. Next, physiological and biochemical experiments and a similarity analysis of 16S rDNA sequences as well as the growth character of CLY-5 were carried out. A safety experiment for sea cucumbers was also performed. The results revealed that CLY-5 strain successfully inhibited *V. splendidus* and *P. nigrifaciens*. Meanwhile, the strain’s intracellular and extracellular products effectively inhibited *V. splendidus* and *P. nigrifaciens*, as demonstrated by inhibition zone diameters of 20 mm, 23 mm, and 27 mm, 38 mm, respectively, with extracellular products showing superior performance compared with intracellular products. Dipping bath concentrations were set to 1×10^9 , 1×10^8 , and 1×10^7 CFU/ml to test the safety of CLY-5 for sea cucumbers. During the experiment, all sea cucumbers were in good conditions. Based on the 16S rDNA sequence analysis, strain CLY-5 was determined to be identical to *Lactobacillus plantarum* NR117813.1. In addition, strain CLY-5 exhibited superior growth at 30°C~44°C and salinities of 6 to 8. Moreover, CLY-5 came into a logarithmic growth phase after 20 h of cultivation and reached peak growth after 28~32 h. In summary, strain CLY-5 could be used to reduce the occurrence of sea cucumber disease and is also suitable for pond culture environment. These results provide a basis for ecological prevention strategies in disease control, and should prove useful in the development and utilization of lactic acid bacteria.

Key words *Apostichopus japonicus*; Skin ulcer syndrome; *Vibrio splendidus*; *Pseudoalteromonas nigrifaciens*; *Lactobacillus plantarum*; Antagonistic activity

① Corresponding author: LI Bin, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190220001

http://www.yykxjz.cn/

赵文飞, 李喆, 黄小芳, 张杨, 丁君, 常亚青. 杂色角孔海胆形态学观察、亲缘关系及性腺营养成分分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 163-172

Zhao WF, Li Z, Huang XF, Zhang Y, Ding J, Chang YQ. Morphological observation, relationship and nutritional composition analysis of gonadal of *Salmacis sphaeroides variegata*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 163-172

杂色角孔海胆形态学观察、亲缘关系及性腺营养成分分析*



赵文飞 李喆 黄小芳 张杨 丁君^① 常亚青^①

(大连海洋大学 农业农村部北方海水养殖重点实验室 大连 116023)

摘要 本研究以杂色角孔海胆(*Salmacis sphaeroides variegata*)为研究材料,观察其形态,基于线粒体16S rDNA基因部分序列分析杂色角孔海胆与其他棘皮动物的亲缘关系,同时分析杂色角孔海胆性腺中的营养成分,为杂色角孔海胆种质改良和资源评估积累数据。结果显示,杂色角孔海胆的主要形态特征具有口器较小,每个步带板的外缘有3~4个小的圆形凹孔,管足壁内的骨片为C形。通过Mega 5.0对其他棘皮动物和得到的杂色角孔海胆的线粒体16S rDNA基因部分序列进行比较,基于距离法(NJ)和最大似然法(MP)分别构建系统树。结果显示,杂色角孔海胆与疏棘角孔海胆(*Salmacis bicolor rarispina*)的亲缘关系最近,其次是刻肋海胆属的3种海胆;杂色角孔海胆性腺中水分为86.1%,灰分为3.0%,粗脂肪为2.0%,蛋白质为8.01%;杂色角孔海胆性腺中的氨基酸种类共有16种,总含量为38.71 g/100 g, EAA/TAA为36.99%, EAA/NEAA为71.84%, DAA/TAA为37.17%;脂肪酸共检测到15种,含量最高的是棕榈酸C16:0、硬脂酸C18:0、EPA C20:5和花生四烯酸C20:4,含量最低的为二高- γ -亚麻酸C20:3,较其他海胆,其DHA含量较高。研究结果将为杂色角孔海胆的生物学研究提供基本资料,可用于经济海胆开发应用,同时也可为远缘杂交育种及经济海胆的种质鉴定提供理论依据。

关键词 杂色角孔海胆;形态学;性腺营养成分;线粒体;16S rDNA

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0163-10

海胆属于棘皮动物门(Echinodermata)、游在亚门(Eleutherozoa)、海胆纲(Echinoidea),是常见的一类海洋无脊椎动物,具有较高的食用、药用和科研价值。全世界现存的海胆大约有850种,已被较好利用的经济种类不超过30种,可食用型海胆仅10余种。目前,我国主要的经济海胆种类有球海胆科的中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)和光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*);长海胆科的紫海胆(*Helicidaris crassispina*);

疣海胆科的海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)和毒棘海胆科的白棘三列海胆(*Tripneustes gratilla*)(常亚青等,2004;左然涛等,2016)。

杂色角孔海胆(*Salmacis sphaeroides variegata*)隶属棘皮动物门、海胆纲、拱齿目、刻肋海胆科、角孔海胆属,是我国南海普遍种。海胆的性腺部分可食用,在亚洲、地中海国家以及智利等西半球国家被认为是一种珍贵的美味。亚太地区的人们多年来也一直使用海胆性腺作为改善一般身体状况、治疗多种疾病的药

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0901601)资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901601)]. 赵文飞, E-mail: 2895741046@qq.com

① 通讯作者: 丁君, 研究员, E-mail: dingjun1119@dlo.edu.cn; 常亚青, 教授, E-mail: yqchang@dlo.edu.cn

收稿日期: 2019-02-20, 收修改稿日期: 2019-04-25

物。杂色角孔海胆在海南或南海地方百姓食用的人较少,在香港有人食用杂色角孔海胆(Chen *et al*, 2010)。目前角孔海胆属的海胆均未得到较好的开发,其中角孔海胆属包括 3 个种:模式角孔海胆、条纹角孔海胆、杂色角孔海胆(刘瑞玉, 2008)。有关杂色角孔海胆生物学方面的研究主要集中在发育生物学方面, Rahman 等(2014、2016)研究了杂色角孔海胆个体发育过程, Subramaniam (1934)发现人工养殖条件下杂色角孔海胆最适合以红藻为食, 付婉莹(2015)观察了杂色角孔海胆棘的显微结构,而在系统发育学和性腺营养成分组成方面的研究较少。随着生物技术的发展, 16S rDNA 在水产动物中的分类应用研究越来越重要, 已经广泛应用于各种水生生物的分类研究, 对水产养殖业的发展起到了重要的作用(周先文等, 2009)。

本研究对杂色角孔海胆开展形态学观察并测定其线粒体 DNA 16S rDNA 部分基因序列, 分析与其他棘皮动物亲缘关系的远近, 同时对杂色角孔海胆性腺营养成分进行分析。研究结果为角孔海胆属的生物学研究提供基础, 为进一步开发利用角孔海胆属的海胆提供信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用杂色角孔海胆样品于 2018 年 8 月采自海南三亚市。取鲜活海胆的性腺、管足及口器, 迅速投入液氮中冷冻后, -80°C 保存以供后续进行性腺营养成分测定和线粒体 DNA 16S rDNA 部分基因序列分析。海胆壳用海水浸泡 3 d, 待其表面的棘全部脱落, 再用清水冲洗干净, 晾干保存用于海胆形态观察, 同时对海胆的壳性状和性腺性状进行测量。

1.2 实验方法

1.2.1 形态学观察 对 10 个海胆壳进行测定, 测定了 22 个性状。使用数显电子游标卡尺(Mahr 16ER, 精确度 0.01 mm)分别测量壳长、壳宽、壳高、口径、步带(赤道部)宽、间步带(赤道部)宽、顶系长、顶系宽、口器高、口器宽。用电子天平(G&GJJ100, 精确度 0.01 g)测量分别测量体重、壳干重、口器重、性腺重。性腺颜色用分光色差仪 CM-2600d/2500d 测定。采用 Nikon DS100 数码相机拍照。

1.2.2 线粒体 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增及序列测定 采用生工 Ezup 柱式动物组织基因组 DNA 抽提试剂盒提取海胆管足中的 DNA。16S rDNA 扩增引物序列为: F: 5'-CGCCTGTTTAACAAAACAT-3', R: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATG-3' (Gao *et al*,

2003)。反应总体积为 50 μl , 其中 20~50 ng/ μl 模板 DNA 2 μl 、10 μmol 引物 F 2 μl 、10 μmol 引物 R 2 μl 、10 mmol/L dNTP(mix)2 μl 、10 \times Taq Buffer 5 μl 、5 U/ μl Taq 酶 0.5 μl 、ddH₂O 补足至 50 μl 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s 后进行 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 修复延伸 5~8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物取 5 μl , 用 1%琼脂糖凝胶电泳观察, 电泳参数为 150 V, 100 mA, 20 min。PCR 产物回收纯化, 将纯化后的产物进行测序。

采用 MEGA 5.0 软件分析序列的碱基组成以及它们的遗传距离, 按照 Kimura 双参数法计算物种间的 DNA 序列差异及种间遗传距离。调取 GenBank 中其他棘皮动物 16S rDNA 序列(表 1), 采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)分别构建系统发育树, 各分支的置信度采用重抽样法(Boot-strap), 通过 1000 次循环评估系统发育树的可靠性。

1.2.3 性腺营养成分测定 性腺水分含量测定参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》; 粗灰分含量测定参照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》; 粗蛋白质含量测定参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》; 粗脂肪含量测定参照 GB 5009.6-2016; 氨基酸含量测定参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》, 将样品经盐酸水解后利用氨基酸自动分析仪测定 16 种氨基酸, 采用分光光度法测定色氨酸的含量; 脂肪酸含量测定参照 GB 5009.168-2016《食品中脂肪酸的测定》, 样品经过甲酯化后利用气相色谱进行分析, 根据出峰时间定性、峰面积定量来测定脂肪酸含量。

2 结果与分析

2.1 海胆形态特征

杂色角孔海胆 10 个个体的测量数据经整理分析, 22 个外部形态可度量特征的变化范围和平均值见表 2。步带(赤道部)宽和间步带(赤道部)宽的平均值为 10.99、25.74, 步带区宽约为间步带的 2/5~1/2。口径/壳长的平均值为 0.28。

2.1.1 外部形态特征 杂色角孔海胆体色为灰橄榄色, 壳从呈低半球形到高圆锥形(图 1A)。口面平坦且稍向内凹, 围口部明显凹陷, 略呈五角形(图 1B), 反面较隆起。步带区由反口面至口面逐渐展宽, 步带区与间步带区幅宽不等, 赤道部以上步带区宽约为间步带的 2/5~1/2, 两区隆起程度不同, 因此海胆壳外形自口面观接近于圆形。步带区每个板上有 1 个大疣,

表 1 用于系统分析的棘皮物种
Tab.1 Species used for the phylogenetic analysis

物种 Species	GenBank 注册号 GenBank accession No.
哈氏刻肋海胆 <i>Temnopleurus hardwickii</i>	JN128612.1-JN128614.1
细雕刻肋海胆 <i>Temnopleurus toreumaticus</i>	JN128615.1-JN128618.1
芮氏刻肋海胆 <i>Temnopleurus reevesii</i>	JQ065692.1-JQ065693.1
光棘球海胆 <i>S. nudus</i>	JQ322582.1
中间球海胆 <i>S. intermedius</i>	JQ322581.1
马粪海胆 <i>H. pulcherrimus</i>	JQ322572.1-JQ322574.1
紫球海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	X12631.1
疏棘角孔海胆 <i>Salmacis bicolor rarispina</i>	KU302104.1
海刺猬 <i>G. crenularis</i>	KX638403.1
白棘三列海胆 <i>T. gratilla</i>	AB154279.1
糙刺参 <i>Stichopus horrens</i>	KY933776.1-KY933782.1
绿刺参 <i>Stichopus chloronotus</i>	AY388422.1
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	AY852282.1-AY852283.1
海燕 <i>Patiria pectinifera</i>	D63717.1
长棘海星 <i>Acanthaster planci</i>	AB084570.1

表 2 杂色角孔海胆形态性状的变化范围和平均值
Tab.2 Variation range and mean value of morphological characters of *S. sphaeroides variegata*

形态性状 Morphological characters	变化范围 Range	平均值 Average
步带板数 Plate of ambulacrum	40~50	43.62
间步带板数 Plate of interambulacrum	27~31	28.00
壳长 Shell length (mm)	55.65~63.83	59.96
壳宽 Shell width (mm)	55.52~65.58	60.25
壳高 Shell height (mm)	34.94~38.27	36.41
步带(赤道部)宽 Maximum width of the ambulacrum (mm)	10.03~13.58	10.99
间步带(赤道部)宽 Maximum width of the interambulacrum (mm)	23.69~27.07	25.74
顶系长 Apical system length (mm)	9.72~11.71	10.82
顶系宽 Apical system width (mm)	9.80~13.03	11.39
口径 Diameter of the peristome(mm)	15.99~17.94	16.97
口器高 Diameter height (mm)	13.09~16.37	14.97
口器宽 Diameter device width (mm)	13.45~17.24	15.27
口器重 Diameter value (g)	1.30~1.96	1.76
体重 Weight (g)	49.9~77.27	64.78
壳干重 Dry weight of shell (g)	5.68~12.38	8.32
性腺重 Gonadal weight (g)	3.61~5.60	4.69
亮度值 L Brightness values of L	38.73~44.48	41.98
红度值 a Red value of a	13.30~16.91	15.09
黄度值 b Yellow value of b	19.48~26.11	23.28
亮橙黄色差 ΔE_1 Bright orange yellow difference delta E_1	53.74~59.76	55.89
亮黄色差 ΔE_2 Bright yellow difference delta E_2	45.05~71.27	54.06
口径/壳长 Diameter/Shell length	0.27~0.30	0.28

在步带排列为—列;板内侧有 1 个中疣,与大疣平行排为—列;大疣上方及两侧分布着一些小疣。间步带板在赤道部以上每个板上有 1 个大疣,排列为—列;

板的外侧有个 1 中疣,平行于大疣排列。间步带赤道部以下,各个板上有 3 个疣排列为—横行。顶系较小,被小棘所掩盖,与围肛部相连接,眼板不接触围肛部,

各生殖板上分布着许多疣。大棘一般为绿色，带有深色横带，围口部的大棘略带紫色，中棘大多为赤褐色。反口面的大棘比较尖细，口面大棘稍长，末端扁成刃形。壳表面颜色不均匀，变化较为明显，反口面呈暗

绿色或暗灰色，口面颜色较浅多为淡灰色或淡绿色甚至近白色，颜色从反口面向口面逐渐变浅。管足孔每3对排列为一弧，各个步带板的外缘有3~4个小的圆形凹孔(图1C)。

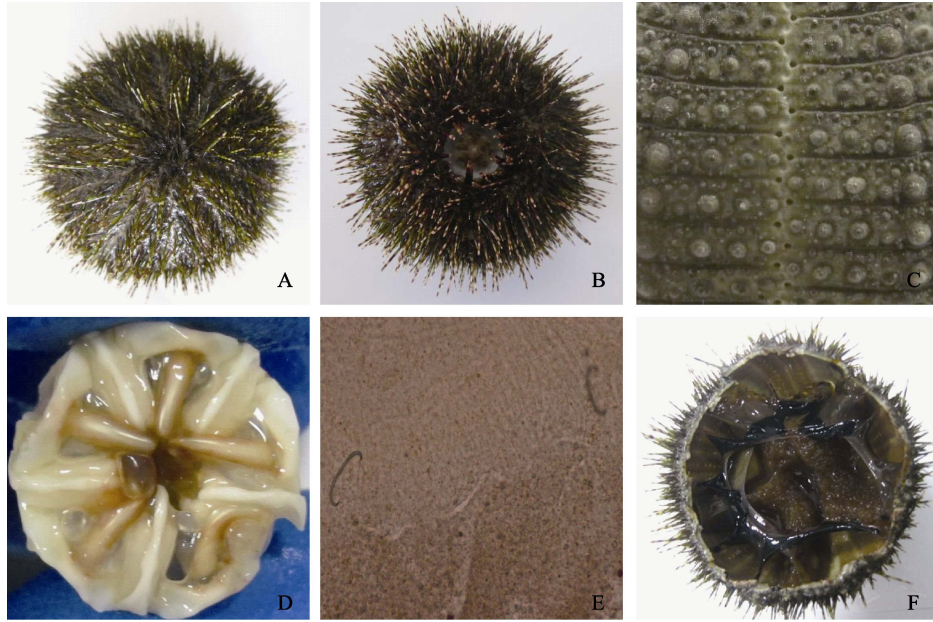


图1 杂色角孔海胆的图片

Fig.1 Pictures of *S. sphaeroides variegata*

A: 反口面; B: 口面; C: 顶系; D: 圆形凹孔; E: 口器; F: 骨片

A: Aboral surface; B: Surface; C: Apical system; D: Circular pit; E: Diameter; F: Ossicle

2.1.2 内部构造特征 本次测量的口径与壳长的比值为0.27~0.30，口位于腹面的正中围口膜的中央部，口器的5个大型齿顶露于口外。口器由5个尖锐的大齿、5个大齿骨、若干个小齿骨组成，齿骨之间有肌肉束相连(图1D)。管足壁内的骨片为C形(图1E)。杂色角孔海胆的体腔隔膜较为坚硬，将体腔分隔成若干部分，分别形成食道腔、围肛腔、生殖腔等(图1F)。食道腔位于围口部内侧，口器周围。围肛腔在顶系的内侧，生殖腔偏向于反口面的各个间步带的区域。

2.2 杂色角孔海胆与其他棘皮动物亲缘关系

2.2.1 线粒体DNA 16S rDNA的PCR结果及序列

DNA模板琼脂糖电泳结果显示DNA条带完整、清晰、无杂带，PCR扩增的片段位于200~500 bp。PCR产物直接测序得到杂色角孔海胆的16S rDNA基因片段长度为444 bp(Genbank登陆号为MK723850)。该序列的A、T、C、G的含量分别为33.8%、27.7%、18.0%和20.5%；A+T及C+G的含量为61.5%和38.5%。

2.2.2 基于16S rDNA序列构建杂色角孔海胆的系统发育树 采用MEGA 5.0软件构建基于NJ法和MP

法分别构建系统进化树(图2和图3)。基于2种方法构建的系统进化树基本一致，聚类分析结果为：杂色角孔海胆和疏棘角孔海胆聚为一支，再与芮氏刻肋海胆、哈氏刻肋海胆、细雕刻肋海胆聚为一个亚群，然后是海刺猬、白棘三列海胆，再与马粪海胆、中间球海胆、光棘球海胆和紫球海胆聚为一支，与海星纲的长棘海星、海燕和海参纲的糙刺参、绿刺参及刺参较远。

用MEGA 5.0软件计算16种棘皮动物间的遗传距离(表3)。由表3可见，在16S rDNA水平上各种间的遗传距离为0.04~0.68。其中，光棘球海胆和马粪海胆、光棘球海胆和中间球海胆、杂色角孔海胆和疏棘角孔海胆间距离最小，均为0.04；海燕和糙海参距离最远，为0.68，表现为最大的遗传距离。

2.3 性腺营养成分测定结果

2.3.1 一般营养成分测定结果 杂色角孔海胆性腺中的水分含量为86.1%，灰分为3.0%，粗脂肪为2.0%，蛋白质为8.01%。

2.3.2 性腺氨基酸测定 杂色角孔海胆性腺中的氨基酸种类齐全，共有16种(表4)，总含量为

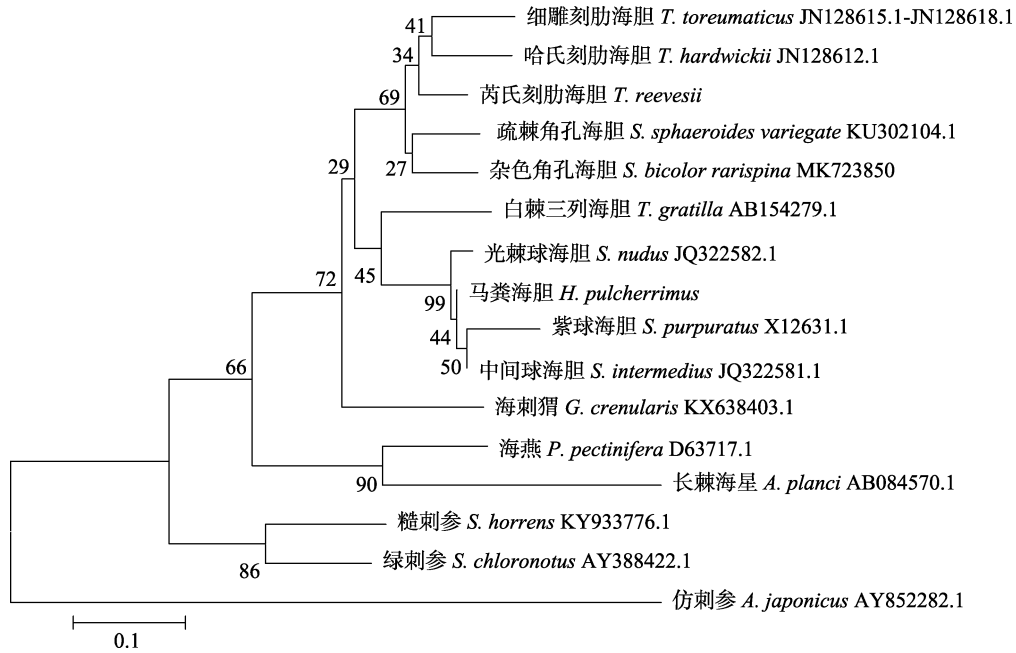


图 2 16 种棘皮动物的 16S rDNA 基因片段的 NJ 系统树
Fig.2 NJ tree of 16S rDNA gene fragments in 16 echinoderms

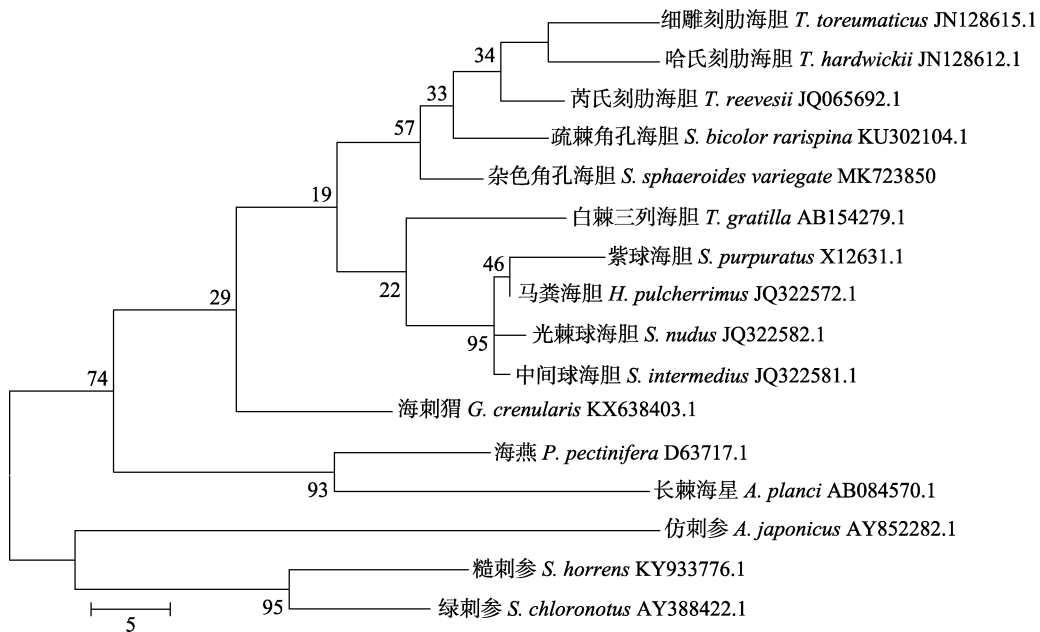


图 3 16 种棘皮动物的 16S rDNA 基因片段的 MP 系统树
Fig.3 MP system tree of 16S rDNA gene fragments in 16 echinoderms

38.71 g/100 g, 必需氨基酸(EAA)含量为14.32 g/100 g; 非必需氨基酸(NEAA)含量为19.93 g/100 g, 半必需氨基酸(CEAA)含量为4.46 g/100 g。其中, 必需氨基酸含量占氨基酸总量(EAA/TAA)的36.99%, 必需氨基酸与非必需氨基酸的比值(EAA/NEAA)为71.84%。杂色角孔海胆的呈味氨基酸(DAA)含量为14.39%, 占总氨基酸含量的37.17%。

根据联合国粮农组织和世界卫生组织(FAO/WHO)

的建议(Vinay *et al*, 2008), 按照每克氮中氨基酸评分标准模式(Amino Acid Score, AAS)、化学评分(Chemical Score, CS)以及必需氨基酸指数(Essential Amino Acid Index, EAA)进行比较对杂色角孔海胆性腺进行相应的营养评价(见表5)。性腺中必需氨基酸中含量最高的是赖氨酸; 非必需氨基酸中含量最高的是甘氨酸, 从AAS和CS中得出第一限制氨基酸是苯丙氨酸和酪氨酸, 第二限制氨基酸是蛋氨酸和胱氨酸, EAAI值为34.51。

2.3.3 性腺脂肪酸含量测定 杂色角孔海胆性腺中脂肪酸种类较丰富,共检测到16种(表6),总含量为8600.20 mg/kg。杂色角孔海胆性腺中脂肪酸含量最高的依此是棕榈酸C_{16:0}、硬脂酸C_{18:0}、EPA C_{20:5}、花生

四烯酸C_{20:4},杂色角孔海胆的n-3 PUFA/n-6 PUFA比值为0.79。5种饱和脂肪酸、2种单不饱和脂肪酸、9种多不饱和脂肪酸分别占总脂肪酸的47.5%、4.9%、47.6%,饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸多不饱和脂肪酸

表3 16种棘皮动物16S rDNA基因片段的遗传距离
Tab.3 Genetic distance of 16S rDNA gene fragments between 16 echinoderms

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1																
2	0.27															
3	0.14	0.30														
4	0.11	0.36	0.12													
5	0.28	0.39	0.34	0.34												
6	0.26	0.41	0.31	0.34	0.07											
7	0.28	0.41	0.33	0.34	0.06	0.04										
8	0.34	0.58	0.38	0.38	0.35	0.34	0.32									
9	0.37	0.44	0.39	0.38	0.44	0.38	0.38	0.37								
10	0.51	0.40	0.50	0.45	0.47	0.45	0.43	0.41	0.41							
11	0.31	0.39	0.29	0.31	0.45	0.39	0.40	0.27	0.36	0.20						
12	0.44	0.29	0.37	0.43	0.45	0.58	0.53	0.56	0.45	0.45	0.46					
13	0.21	0.25	0.25	0.21	0.24	0.22	0.24	0.34	0.36	0.40	0.32	0.49				
14	0.06	0.32	0.07	0.11	0.30	0.28	0.30	0.33	0.38	0.56	0.31	0.42	0.22			
15	0.48	0.33	0.55	0.48	0.53	0.51	0.48	0.51	0.40	0.17	0.26	0.45	0.42	0.56		
16	0.12	0.32	0.09	0.09	0.32	0.31	0.31	0.30	0.38	0.48	0.25	0.43	0.19	0.09	0.50	

注: 1. 细雕刻肋海胆; 2. 芮氏刻肋海胆; 3. 光棘球海胆; 4. 中间球海胆; 5. 马粪海胆; 6. 紫球海胆; 7. 海刺猬; 8. 糙刺参; 9. 仿刺参; 10. 长棘海星; 11. 白棘三列海胆; 12. 杂色角孔海胆; 13. 疏棘角孔海胆; 14. 海燕; 15. 绿刺参; 16. 哈氏刻肋海胆

Note: 1. *T. toreumaticus*; 2. *T. reevesii*; 3. *S. nudus*; 4. *S. intermedius*; 5. *H. pulcherrimus*; 6. *S. purpuratus*; 7. *G. crenularis*; 8. *S. horrens*; 9. *A. japonicus*; 10. *A. planci*; 11. *T. gratilla*; 12. *S. sphaeroides variegata*; 13. *S. bicolor rarispina*; 14. *P. pectinifera*; 15. *S. chloronotus*; 16. *T. hardwickii*

表4 杂色角孔海胆的氨基酸组成(湿重, g/100 g)
Tab.4 Amino acid composition of *S. sphaeroides variegata* (Wet weight, g/100 g)

氨基酸 Amino acid	含量 Content	氨基酸 Amino acid	含量 Content
天门冬氨酸 Trp**	3.02	赖氨酸 Lys*	3.88
苏氨酸 Thr*	1.87	组氨酸 His***	0.86
丝氨酸 Ser**	1.73	精氨酸 Arg***	3.60
谷氨酸 Glu ^{a*} *	3.96	氨基酸总量 Total amino acids (TAA)	38.71
脯氨酸 Pro**	1.44	必需氨基酸 Essential amino acids(EAA)	14.32
甘氨酸 Gly ^{a**}	5.90	非必需氨基酸 Non-essential amino acids (NEAA)	19.93
丙氨酸 Ala ^{a**}	2.59	半必需氨基酸 Semi-essential amino acids(CEAA)	4.46
缬氨酸 Val ^{a*}	1.94	鲜味氨基酸 Delicious amino acid(DAA)	14.39
蛋氨酸 Met*	1.01	EAA/NEAA	71.85
异亮氨酸 Ile*	1.65	EAA/TAA	36.99
亮氨酸 Leu*	2.66	DAA/TAA	37.17
酪氨酸 Tyr**	1.29		

注: *为必需氨基酸; **为非必需氨基酸; ***为半必需氨基酸; a为鲜味氨基酸

Note: *: Essential amino acids (EAA); **: Non-essential amino acids (NEAA); ***: Semi-essential amino acids (CEAA); a: Delicious amino acid (DAA)

表 5 必需氨基酸质量评价
Tab.5 Evaluation of EAA compositions of *S. sphaeroides variegata* (mg/g N)

氨基酸 Amino acid	FAO/WHO FAO/WHO standard	鸡蛋蛋白标准 Egg protein standard	氨基酸评分标准模式 Amino Acid Score(AAS)	化学评分 Chemical Score(CS)	必需氨基酸指数 Essential Amino Acid Index(EAA)
苏氨酸 Thr	250	292	0.60	0.51	148.92
缬氨酸 Val	310	411	0.51	0.38	156.18
异亮氨酸 Ile	250	331	0.53	0.42	139.02
亮氨酸 Leu	440	534	0.48	0.40	213.60
苯丙 + 酪氨酸 Phe+Tyr	380	565	0.27*	0.18*	101.70
蛋 + 胱氨酸 Met+Cys	220	386	0.37**	0.21**	81.06
赖氨酸 Lys	340	441	0.91	0.71	313.11
色氨酸 Trp	60	106	4.03	0.23	24.38
必需氨基酸指数(EAAI) Essential amino acid index			34.51		

注: *为第一限制氨基酸; **为第二限制氨基酸

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

分别以C_{16:0}、C_{20:2}、EPA C_{20:5}为主。杂色角孔海胆的DHA含量占总脂肪酸含量的4.7%。

3 讨论

3.1 杂色角孔海胆外观形态及系统发育分析

杂色角孔海胆的口器较小, 杂色角孔海胆的口径/壳长为 0.28, 低于马粪海胆(0.31~0.33) (刘成龙等, 2015)、细雕刻肋海胆(0.324)、哈氏刻肋海胆(0.301)以及芮氏刻肋海胆(0.337), 这说明杂色角孔海胆的口器与其他几种海胆相比较小。体腔隔膜较为坚硬, 这是不同于其他海胆的特征之一。每个步带板的外缘有3~4个小的圆形凹孔, 这是角孔海胆属的海胆特有的形态特征。管足孔每3对排列为弧, 这与刻肋海胆中其他几种海胆管足孔的排列方式是一致的。张文峰(2011)研究发现细雕刻肋海胆棘上有深色横带, 而其他海胆没有。这与杂色角孔海胆的特征相同, 说明杂色角孔海胆与刻肋海胆属亲缘关系较近。在张文峰(2011)的研究中发现赤道部以上步带区宽约为间步带的1/2, 但本研究发现这一数值小于1/2。对于这一差异的产生, 很有可能是观察设备、样品来源及海胆大小不同造成的。

本研究通过16S rDNA基因片段的系统发育分析表明杂色角孔海胆与疏棘角孔海胆的亲缘关系最近, 同属于角孔海胆属, 其次是与刻肋海胆的哈氏刻肋海胆、芮氏刻肋海胆和细雕刻肋海胆亲缘关系最近, 与疣海胆科、毒棘海胆科、球海胆科和长海胆科的关系较远, 但它们都属于海胆纲, 与海星纲和海参纲的亲缘关系最远。这与Lee等(2003)应用COI和NDI得到的结论相一致, 说明杂色角孔海胆与刻肋海胆属同属

表 6 杂色角孔海胆的脂肪酸组成(湿重, mg/kg)
Tab.6 Fatty acid composition of *S. sphaeroides variegata* (Wet weight, mg/kg)

脂肪酸 Fatty acid	含量 Content
豆蔻酸 C14:0	656.00
十五碳酸 C15:0	132.00
棕榈酸 C16:0	2140.00
棕榈油酸 C16:1(n-7)	517.00
硬脂酸 C18:0	1010.00
油酸 C18:1(n-9)	432.00
亚油酸 C18:2(n-6)	272.00
γ-亚麻酸 C18:3(n-6)	401.00
顺-11-二十碳一烯酸 C20:1	150.00
顺, 顺-11, 14-二十碳二烯酸 C20:2	269.00
山嵛酸 C22:0	149.00
二高-γ-亚麻酸 C20:3(n-6)	96.20
顺-13-二十二碳一烯酸(芥酸)C22:1(n-9)	497.00
花生四烯酸 C20:4(n-6)	712.00
EPA C20:5(n-3)	763.00
DHA C22:6(n-3)	405.00
总脂肪酸 Total fatty acids	8600.20
饱和脂肪酸总量 Saturated fatty acid(SFAs)	4087.00
多不饱和脂肪酸总量 Polyunsaturated fatty acid(PUFAs)	4095.20
单不饱和脂肪酸总量 Monounsaturated fatty acid(MUFAs)	419.00
n-3 PUFAs	1168.00
n-6 PUFAs	1481.20
n-3/n-6	0.79

一个科。这一结果和曾晓起等(2012)研究中利用16S rDNA和COI基因片段进行的聚类分析结果是一致的。传统意义上的分类都认为杂色角孔海胆隶属刻肋

海胆科、角孔海胆属(张凤瀛等, 1964), 这与本研究综合形态学和16S rDNA基因片段系统发育分析两方面得到的结果是一致的。

3.2 杂色角孔海胆性腺营养成分分析

杂色角孔海胆性腺中蛋白质含量为8.01%, 低于光棘球海胆(13.46%)、马粪海胆(13.30%) (徐华等, 2018)和中间球海胆(9.66%~14.55%) (丁君等, 2011)、罗氏海盘车(*Asterias rollestoni*) (16.6%) (曹吉超等, 1995)和陶氏太阳海星(*Solaster dawsoni* Verrill) (17.2%) (滕瑜等, 2016), 但高于刺参(3.74%~4.43%) (韩华, 2011)和蓬莱玉参(5.25%) (刘长琳等, 2015)。杂色角孔海胆粗脂肪含量为2.0%, 高于刺参(0.60%~1.00%)和蓬莱玉参(0.23%) (刘长琳等, 2015), 而低于光棘球海胆(3.29±0.21)% (徐华等, 2018)、马粪海胆(3.45±0.24)% (徐华等, 2018)、罗氏海盘车(11.4%) (曹吉超等, 1995)和陶氏太阳海星(11.8%) (滕瑜等, 2016), 由此可见, 杂色角孔海胆的蛋白质和脂肪均高于刺参和蓬莱玉参。

杂色角孔海胆黄中的氨基酸种类齐全, 共有16种。杂色角孔海胆性腺中氨基酸中含量较高的是甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸。氨基酸组成的重要性主要体现在营养和风味2个方面(徐华等, 2018)。本研究中杂色角孔海胆性腺中EAA/TAA为36.99%, 从人类理想营养需求角度来讲, 杂色角孔海胆作为蛋白来源是比较理想的, 必需氨基酸占总氨基酸的比例符合WHO/FAO理想蛋白源的要求(必需氨基酸含量40%) (徐清云等, 2017), 低于中间球海胆(34.01%~39.42%)、光棘球海胆(38.80%)、马粪海胆(39.91%)。EAA/NEAA为71.84%, 高于FAO/WHO理想模式对EAA/NEAA的要求(60%以上), 远远高于紫海胆(60.62%)、光棘球海胆(63.39%)、马粪海胆(65.50%) (徐华等, 2018)。研究表明, 赖氨酸可以改善蛋白质的消化吸收, 食用海胆性腺能弥补机体中的赖氨酸, 从而加快人体对于食物中蛋白质的消化吸收; 谷氨酸有益于改进和维持脑功能。从风味层面看, 甘氨酸和丙氨酸起甜味作用, 缬氨酸起苦味作用, 谷氨酸起甘鲜作用。杂色角孔海胆性腺中DAA/TAA为37.17%, 略高于紫海胆(36.19%)、马粪海胆(36.21%), 但比光棘球海胆(40.51%)和中间球海胆(38.14%~51.84%)低。杂色角孔海胆中的谷氨酸、甘氨酸为含量最丰富的氨基酸, 为海胆黄的鲜甜可口奠定基础。因此在医学和营养学上都有很高的研究价值。

丁君等(2011)发现光棘球海胆和海刺猬性腺中主要的多不饱和脂肪酸是 C_{20:5}, 饱和脂肪酸以 C_{16:0} 为

主, 杂色角孔海胆中这 2 种脂肪酸同样占据主导地位。杂色角孔海胆的 n-3/n-6 为 0.79, 远高于 FAO/WHO 推荐的 n-3/n-6 日常膳食比值 0.1~0.2。本研究结果发现, 杂色角孔海胆中 EPA 和 DHA 的含量较高, 特别是 DHA 的含量显著高于我国主要养殖品种中间球海胆。有研究表明, 血小板磷脂中 n-3/n-6 比例越低, 冠状动脉心脏病致死的几率越大, 而 EPA 和 DHA 具有降炎的作用, 杂色角孔海胆中较高的 EPA 和 DHA 含量可预防冠状动脉心脏病(Wang *et al*, 2016)。杂色角孔海胆性腺的蛋白质含量丰富, 氨基酸种类多、比例合理, 脂质含量高且富含 EPA 和 DHA 等多不饱和脂肪酸, 具有较高的营养价值和保健功能。

本研究通过观察杂色角孔海胆的形态, 以线粒体 16S rDNA 基因部分序列为标记, 分析其与其他棘皮动物的亲缘关系, 研究结果为角孔海胆属的生物学研究提供基础。除此之外, 对杂色角孔海胆的性腺营养成分进行测定分析, 研究表明, 海胆性腺具有较高的营养价值和保健功能, 对杂色角孔海胆的综合开发利用具有很大的意义。

参 考 文 献

- Cao JC, Li H, Zhang TM, *et al*. An analysis of inorganic elements, amino acids in the genital gland of *Asterias rollestoni* Bell. Chinese Journal of Marine Drugs, 1995(1): 7-8 [曹吉超, 李华, 张天民, 等. 海星类动物的应用研究. II 罗氏海盘车生殖腺中无机元素及氨基酸分析. 中国海洋药物, 1995(1): 7-8]
- Chang YQ, Ding J, Song J, *et al*. Biological research and cultivation of sea cucumber and sea urchin. Beijing: Ocean Press, 2004 [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004]
- Chen GQ, Xiang WZ, Lau CC, *et al*. A comparative analysis of lipid and carotenoid composition of the gonads of *Anthocidaris crassispina*, *Diadema setosum* and *Salmacis sphaeroides*. Food Chemistry, 2010, 120(4): 973-977
- Ding J, Chang YQ, Hao ZL, *et al*. Comparative studies on urchin gonad fatty acid composition and β -carotene content in north China sea section. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(3): 122-128 [丁君, 常亚青, 郝振林, 等. 北方海区经济海胆性腺脂肪酸组成与 β -胡萝卜素含量的比较研究. 中国农业科技导报, 2011, 13(3): 122-128]
- Fu WY. The study on microstructure of spines from four sea urchins and phylogenetic based on complete mitochondrial genome. Master's Thesis of Chinese Ocean University, 2015, 1-84 [付婉莹. 四种海胆棘的显微结构和基于线粒体基因组全序列的系统发育学研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2015, 1-84]

- Gao TX, Li J, Wang QY, *et al.* Sequence analysis on mitochondrial 16S rDNA gene in *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(5): 359–364
- Han H. Analysis and evaluation of nutritive composition in body walls for different age *Apostichopus japonicus* (Selenka). Marine Environmental Science, 2011, 30(3): 404–408 [韩华. 不同年龄刺参体壁营养成分分析及评价. 海洋环境科学, 2011, 30(3): 404–408]
- Lee KZ, Sommer RJ. Operon structure and trans-splicing in the nematode *Pristionchus pacificus*. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(12): 2097–2103
- Liu CL, Wang YG, Qin B, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient composition in the body wall of Penglai sea cucumber (*Apostichopus* sp.). Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(5): 111–118 [刘长琳, 王有廷, 秦搏, 等. 蓬莱玉参 (*Apostichopus* sp.) 体壁的营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 111–118]
- Liu CL, Zeng XQ. A comparative study on the morphological characteristics of *Hemicentrotus pulcherrimus* from different populations. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2015, 45(4): 40–45 [刘成龙, 曾晓起. 马粪海胆不同地区群体形态学比较研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(4): 40–45]
- Liu RY. Marine life in China. Beijing: Science Press, 2008 [刘瑞玉. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 2008]
- Rahman MA, Yusoff FM, Arshad A, *et al.* Embryonic, larval, and early juvenile development of the tropical sea urchin, *Salmacis sphaeroides* (Echinodermata: Echinoidea). Scientific World Journal, 2014, 2012(4): 1–9
- Rahman MA, Yusoff FM, Arshad A, *et al.* Growth and survival of the tropical sea urchin, *Salmacis sphaeroides* fed with different macroalgae in captive rearing condition. Journal of Environmental Biology, 2016, 37(4): 855–862
- Subramaniam MK. The oogenesis of *Salmacis bicolor* (Agassiz) with a suggestion as to the function of Golgi bodies. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B, 1934, 1(6): 291–317
- Teng Y, Yuan DS, Wang DS, *et al.* Nutritional evaluation on *Solaster dawsoni* Verrill. Agricultural Products Processing, 2016(1): 37–39 [滕瑜, 苑德顺, 王东升, 等. 陶氏太阳海星的营养评价. 农产品加工, 2016(1): 37–39]
- Vinay BJ, Kanya TCS. Effect of detoxification on the functional and nutritional quality of proteins of karanja seed meal. Food Chemistry, 2008, 106(1): 77–84
- Wang L, Manson JAE, Rautiainen S, *et al.* A prospective study of erythrocyte polyunsaturated fatty acid, weight gain, and risk of becoming overweight or obese in middle-aged and older women. European Journal of Nutrition, 2016, 55(2): 687–697
- Xu H, Wang YP, Yang DM, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components of two kinds of sea urchin gonads. Acta Nutrimenta Sinica, 2018, 40(3): 307–309 [徐华, 王云鹏, 杨德孟, 等. 两种海胆性腺营养成分分析及评价. 营养学报, 2018, 40(3): 307–309]
- Xu QY, Pan N, Wu JN, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition of sea urchin (*Anthocidaris crassispina*). Fishery Modernization, 2017, 44(2): 50–55 [徐清云, 潘南, 吴靖娜, 等. 紫海胆黄基本营养成分的分析与评价. 渔业现代化, 2017, 44(2): 50–55]
- Zeng XQ, Zhang WF, Gao TX. Molecular phylogenetics of genus *Temnopleurus* based on 16S rRNA and COI sequences. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2012, 42(6): 47–51 [曾晓起, 张文峰, 高天翔. 基于线粒体 16S rDNA 与 COI 基因序列的刻肋海胆属系统发育研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(6): 47–51]
- Zhang FY, Wu BL, Cheng LR. Animal atlas of China: Echinodermata. Beijing: Science Press, 1964, 74–101 [张凤瀛, 吴宝铃, 程丽仁. 中国动物图谱: 棘皮动物. 北京: 科学出版社, 1964, 74–101]
- Zhang WF. Studies on the morphology and genetics of genetics of *Temnopleurus* and the taxonomy of temnopleuridae inshore water of China sea. Master's Thesis of Chinese Ocean University, 2011, 50–51 [张文峰. 3 种刻肋海胆的形态学与遗传学及中国刻肋海胆科分类学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 50–51]
- Zhou XW, Wang XQ, Ma X. 16S rRNA gene and its application in the classification of aquatic animals. Fisheries of Heilongjiang, 2009(2): 12–13 [周先文, 王晓清, 马晓. 16S rRNA 基因及其在水产动物分类研究中的应用. 黑龙江水产, 2009(2): 12–13]
- Zuo RT, Hou SQ, Chang YQ, *et al.* Research advance of nutritional physiology in sea urchins: A review. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(4): 463–468 [左然涛, 侯受权, 常亚青, 等. 海胆营养生理研究进展. 大连海洋大学学报, 2016, 31(4): 463–468]

Morphological Observation, Relationship and Nutritional Composition Analysis of Gonadal of *Salmacis sphaeroides variegata*

ZHAO Wenfei, LI Zhe, HUANG Xiaofang, ZHANG Yang, DING Jun^①, CHANG Yaqing^①

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract In this study, *Salmacis sphaeroides variegata* was used as the research material to observe its morphology. Based on mitochondrial 16S rDNA gene partial sequencing, the genetic relationship between *S. sphaeroides variegata* and other echinoderms was analyzed. The nutritional composition of *S. sphaeroides variegata* gonad was analyzed to accumulate a mass of data for germplasm improvement and resource evaluation of *S. sphaeroides variegata*. The results showed that the main morphological characteristics of the *S. sphaeroides variegata* were as follows: the apical system was small, the outer edge of each step band plate had 3~4 small circular pits, and the bone fragment in the wall of the pedicle foot was C-shaped. The mitochondrial 16S rDNA gene sequences of other echinoderms and that obtained from *S. sphaeroides variegata* were compared by Mega 5.0, and the phylogenetic trees were constructed based on distance method (NJ) and maximum likelihood method (MP). The results showed that the *S. sphaeroides variegata* was closely related to the *Salmacis bicolor*, followed by the three species of sea urchins, the Temnopleuridae. An amount of water 86.1%, ash 3.0%, crude fat 2.0% and protein 8.01% was found in the sex glands of *S. sphaeroides variegata*. There were 16 kinds of amino acids in the sex glands of *S. sphaeroides variegata*, the total amino acid content was 38.71 g/100 g, EAA/TAA was 36.99%, EAA/NEAA was 71.84%, and DAA/TAA was 37.17%. A total of 15 fatty acids were detected, with the highest content being palmitic acid C16:0, stearic acid C18:0, EPA C20:5 and arachidonic acid C20:4, and the lowest content was that of C20:3. *S. sphaeroides variegata* showed a higher content of DHA than in other sea urchins. The results will provide basic data for the biological study of *S. sphaeroides variegata* and can be used for the development and application of sea urchin of economic value, as well as provide a theoretical basis for distant hybridization breeding and the germplasm identification of economically viable sea urchins.

Key words *Salmacis sphaeroides variegata*; Morphology; Gonadal nutrition; Mitochondria; 16S rDNA

① Corresponding author: DING Jun, E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn; CHANG Yaqing, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180906001

http://www.yykxjz.cn/

熊钢, 周先文, 马晓, 曾丹, 陈贞年, 康骊, 王晓清. 中华鳖 *GHITM* cDNA 基因克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 173-179

Xiong G, Zhou XW, Ma X, Zeng D, Chen ZN, Kang L, Wang XQ. Molecular cloning and expression analysis of *GHITM* cDNA in *Trionyx sinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 173-179

中华鳖 *GHITM* cDNA 基因克隆及表达分析*

熊 钢^{1,2} 周先文² 马 晓³
曾 丹² 陈贞年² 康 骊¹ 王晓清^{2①}



(1. 湖南生物机电职业技术学院动物科技系 长沙 410127;

2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128; 3. 河南师范大学水产学院 新乡 453007)

摘要 为研究 *GHITM* 基因在中华鳖(*Trionyx sinensis*)胚胎发育及生长中的作用, 本研究通过 RT-PCR 和 RACE 方法获得了中华鳖 *GHITM* 全长 cDNA 序列; 采用实时荧光定量 PCR 对 *GHITM* mRNA 组织表达及不同温度孵化胚胎发育过程中的表达特性进行分析。结果显示, 中华鳖 *GHITM* cDNA 序列长度为 2650 bp, 开放阅读框为 1050 bp, 5'非编码区为 123 bp, 3'非编码区为 1477 bp, 编码 349 个氨基酸, 编码蛋白的等电点为 10.01, 分子量为 37.12 kDa。*GHITM* 编码氨基酸序列由胞外区、跨膜区和胞内区组成, 7 个跨膜域组成跨膜区。*GHITM* 编码氨基酸序列的同源性分析显示, 中华鳖与锦龟(*Chrysemys picta bellii*)和绿海龟(*Chelonia mydas*)同属一个分支, 3 种鳄鱼构成一个分支, 7 种鸟类形成一个分支。实时荧光定量检测显示, *GHITM* 基因在肝脏、肌肉和脑垂体中的表达水平较高, 显著高于心脏、性腺、肠、肾脏和脾脏组织($P<0.05$); 50 g 左右和 500 g 左右雄性个体肝脏中的 *GHITM* 基因表达量显著高于雌性个体($P<0.05$); 低温胁迫孵化能显著抑制胚胎肝脏中 *GHITM* 基因的表达($P<0.05$)。上述研究结果表明, *GHITM* 基因与中华鳖生长和胚胎发育密切相关, 其在中华鳖胚胎中的表达受孵化温度调节。本研究为探讨中华鳖胚胎发育和生长提供理论依据。

关键词 中华鳖; *GHITM*; 基因克隆; 胚胎发育; 组织表达

中图分类号 S917; Q575; Q492 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0173-07

生长激素诱导的跨膜蛋白(Growth-hormone inducible transmembrane protein, *GHITM*)是在研究转基因(Growth-hormone antagonist, *GHA*)小鼠的差异表达基因时被首次发现(Li *et al.*, 2001)。*GHITM* 蛋白(Reimers *et al.*, 2007)的氨基酸序列其 C 末端的特殊结构域, 将其归类为 Bax 抑制蛋白类似家族新成员, BI-1 家族(Bax inhibitory protein-like family)在细胞内质网中高表达,

并且参与细胞的程序性细胞死亡。这些家族成员在哺乳动物中保守存在, 都是定位于细胞膜上且具有 6~7 个典型跨膜结构域的高疏水性蛋白(罗少杰等, 2016), 在软体动物仿刺参(*Apostichopus japonicus*) (高杨等, 2014)和马氏珠母贝(*Pinctada martensi*) (罗少杰等, 2016)中有 8 个跨膜结构, 因而得名生长激素诱导的跨膜蛋白。

* 国家自然科学基金(31672640)、湖南省自然科学基金(2017JJ3134; 2016NK2115)和湖南省教育厅基金项目(17C0935)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672640), Natural Science Foundation of Hunan Province(2017JJ3134; 2016NK2115), and Scientific Research Fund of Hunan Province Education Department(17C0935)]. 熊 钢, E-mail: xionggang709@126.com

① 通讯作者: 王晓清, 教授, E-mail: wangxiao8258@126.com

收稿日期: 2018-09-06, 收修改稿日期: 2018-10-21

GHITM 蛋白在氧自由基对抗衰老的机制中发挥作用,与动物的年龄、生长相关(Knapp *et al*, 1994)。GHITM 在小鼠胚胎和成人组织以及哺乳动物组织中普遍存在表达,在小鼠胚胎发育过程中大量表达,胚胎分裂对 GHITM 表达量至关重要(Yoshida *et al*, 2006)。GHITM 在日本血吸虫(*Schistosoma japonicum* Katsurada) (熊涛等, 2012)童虫时期表达量高,推测其在生长发育中发挥作用。

为探讨中华鳖胚胎发育和生长,本研究采用 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 扩增法获得中华鳖 *GHITM* cDNA 的全长序列,并采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 *GHITM* 基因的组织表达情况,及不同孵化温度对胚胎处理的研究,旨在为进一步探讨中华鳖 *GHITM* 基因的生物学功能及作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从湖南省岳阳市临湘中华鳖养殖场采集同批次 50 g 左右和 500 g 左右的中华鳖雌雄个体各 3 个,取其肌肉、肝脏、脑垂体、肠道、心脏、脾脏和性腺组织。中华鳖受精卵取自湖南省常德柳叶湖河州甲鱼生态

养殖基地, 24℃、30℃和 34℃恒温孵化,取 15~17 期、20~22 期和破壳期胚胎肝脏组织,各组织放入 1.5 ml 离心管中,于液氮中冷冻后, -80℃保存。

1.2 主要药品与试剂

RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)、柱式胶回收试剂盒和凝胶回收试剂盒购于 Omega, cDNA 逆转录试剂盒、DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0、纯化试剂盒和 TdT 酶购自大连宝生物工程(TaKaRa)公司, PCR 反应酶-2×EasyTaq PCR SuperMix (北京全式金生物)、SYBR Green real time PCR Mix 购自 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物合成 从 GenBank 中下载相近物种的 *GHITM* 基因序列,在基因保守区内用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,引物由上海铂尚生物科技有限公司(以下简称铂尚生物)合成,引物序列见表 1。

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 用 RNA 提取试剂盒(Omega)提取总 RNA,加入 30 μl Rnase-free 水, 60℃孵化溶解 RNA 沉淀, -20℃保存备用。以提取的总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒操作说明逆转录成第一条 cDNA 链。

表 1 中华鳖 *GHITM* cDNA 序列扩增及 RT-PCR 用引物
Tab.1 Primers used for cloning of *GHITM* cDNA and RT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
GHITM1 ⁺	AGGAATACTCATTGAATCAGTAGCAT	中间片段 1 扩增
GHITM1 ⁻	GGGTCATATTTTGCCACTCCAT	
GHITM2 ⁺	CTGTAGCAGTTTATGGTGGATTGAT	中间片段 2 扩增
GHITM2 ⁻	GCCAAAACACACATTATAGCCCAAA	
GHITMN5'	CCATCTTCCCATCTGGTCAACTT	5'巢式 PCR
GHITMN3'	AGCCCTGCTTACTAAAACCTCGACTT	3'巢式 PCR
3'RACE Olig(T)-Adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT	3'端扩增
3'RACE Adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	3'端扩增
5'RACE Olig(T)-Adaptor	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	5'端扩增
5'RACE Adaptor	GACTCGAGTCGACATCG	5'端扩增
Real-GHITM ⁺	CACAGCAGGAATTGTAGGA	荧光定量引物
Real-GHITM ⁻	CACAGCAGGAATTGTAGGA	
GAPDH ⁺	CCCATTCATTGGCCTCAACTAC	内参引物
GAPDH ⁻	CCCCACTTGTTGTTAGCAGGAT	

1.3.3 *GHITM* cDNA 中间片段扩增和克隆 以引物 GHITM1⁺和 GHITM1⁻ 扩增 *GHITM* 基因中间片段 1; GHITM2⁺和 GHITM2⁻ 扩增 *GHITM* 基因中间片段 2; PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 52℃

30 s, 72℃ 60 s, 共 33 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳、切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

1.3.4 *GHITM* cDNA 3'端和 5'端片段扩增和克隆

3'端片段扩增和克隆: 扩增采用 *GHITM2*⁺、*GHITMN3*'、3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor 引物, 作为巢式 PCR 引物, *GHITMN3*'是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且 *GHITMN3*'在 *GHITM2*⁺的下游; 3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3' RACE Adaptor 是 1 对通用引物。反转录时, 用 3' RACE Olig(T)-Adaptor 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)用于 mRNA 反转录; 扩增时, 采用 *GHITM2*⁺和 3' RACE Adaptor 进行第 1 次 PCR: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 20 个循环; 72℃ 延伸 10 min。产物稀释 50 倍后, 用 *GHITMN3*'和 3' RACE Adaptor 进行巢式 PCR, 反应条件同上。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳, 将出现的条带切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

5'端片段扩增和克隆: 扩增采用 *GHITM1*⁻、*GHITMN5*'、5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor 引物, *GHITMN5*'为根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且 *GHITMN5*'在 *GHITM1*⁻的上游; 5'RACE Olig(T)- Adaptor 和 5'RACE Adaptor 为 1 对通用引物。首先, 用特异性引物 *GHITM1*⁻代替反转录试剂盒中的 Olig(T), 在 *Mulv* 逆转录酶作用下合成 cDNA 第一链, 用 DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 (Code: DV807A) 纯化试剂盒将 cDNA 纯化。然后, 在纯化产物 cDNA 3'端加 1 个 Poly(A) 尾巴。取纯化 cDNA 10.0 μ l, 5 \times TdT buffer 10 μ l, 0.1% BSA 5.0 μ l, dATP (10 mmol/L) 2.5 μ l, TdT 酶 1.0 μ l, H₂O 21.5 μ l, 37℃ 保温 30 min 后 80℃ 10 min, 产物用 H₂O 稀释为 0.5 ml 后 -20℃ 保存备用。最后用 *GHITM1*⁻和 5'RACE Olig(T)-Adaptor 进行第 1 次 PCR: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30s, 72℃ 60 s, 共 20 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 产物稀释 50 倍后再用 *GHITMN5*'和 5' RACE Adaptor 进行巢式 PCR, 反应条件同上。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳, 将出现的条带切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

1.3.5 测序结果分析 测序结果在美国基因库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 主要使用 DNAMAN 生物软件、开放阅读框 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), 蛋白质理化性质预测使用 ProtParam

(<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件, 信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、CLC Main workbench 软件和 SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/interactive/>) 在线进行分析。应用 MEGA 6.06 (Librado *et al.*, 2009) 软件, 采用邻位相接法 (NJ 法) 构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

1.3.6 基因发育及组织表达检测 按 1.3.3 方法获得中华鳖心脏、肝脏、肌肉、性腺、肠、肾脏、脑垂体、脾脏和胚胎肝组织 cDNA, 每个组织取 3 个平行样, 其中, 雌雄中华鳖胚胎用本课题组筛选的中华鳖性染色体 PCR 引物进行鉴定, 50 g 左右和 500 g 左右中华鳖雌雄采用解剖肉眼观察筛选。用荧光定量引物 Real-*GHITM* 和内参引物 *GAPDH* 对各组织进行基因表达检测。对荧光定量数据采用 *GHITM* 基因相对内参 *GAPDH* 基因表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 进行计算。实验结果采用 SPSS 17.0 进行 ANOVA 单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *GHITM* cDNA 克隆及序列分析

以中华鳖肝脏 RNA 为模板, 用特异性引物扩增获得 *GHITM* cDNA, 全长为 2650 bp (基因号: MH557794), 包括包含 123 bp 的 5'非编码区序列、1 477 bp 的 3'非编码区序列、长度为 1050 bp 开放阅读框, 编码 349 个氨基酸 (图 1), 编码蛋白的等电点为 10.01, 分子量为 37.12 kDa。

2.2 基因编码氨基酸序列生物信息分析

利用 SignalP 软件对 *GHITM* 基因编码氨基酸序列预测无明显信号肽。编码蛋白功能域预测发现, *GHITM* 基因编码氨基酸序列为典型的 7 个跨膜结构蛋白 (图 2)。从第 121 个氨基酸开始跨膜, 由 20 个氨基酸组成的第 4 个跨膜结构域长度最短, 由 31 个氨基酸组成的第 7 个跨膜结构域长度最长。

2.3 系统进化树分析

在 GenBank 中对中华鳖 *GHITM* 基因 BLAST 获得锦龟 (*Chrysemys picta bellii*, XP_005294095.1)、墨西哥箱龟 (*Terrapene mexicana triunguis*, XM_024209991)、绿海龟 (*Chelonia mydas*, XP_007067303.1)、湾鳄 (*porosus*, XM_019555975)、扬子鳄 (*Alligator sinensis*, XP_006029557.1)、密西西比鳄 (*Alligator*

```

CTCAGCTCTGCCCGCGC 18
GGCTTCCCCGTGACCGTTTTGCGGAGTGACGCACAATTTGTGCTGGCACACAGCGCGGGTGTGCGGTGGCGCGCTGGCGAGGAATACTCATTGAATCAGTAGC 123
ATGCTGGCAGCAAGATTAGTGTGTCTACGGACTGCCATGCCGGAGTCTCCGCTCTGCATTTTCACGGGCTTCCCAACTTTGAGGAATCCAGCATAAAAGCA 228
M L A A R L V C L R T L P C R S L R P A F S R V F P T L R N S S I K A 35
AATCAATGACCCCTGCAACCTAACAGGGGTATGCCTCCAAAGCAAAAATGGGAGTTCGGCGAGGAAGAACTGATCAAGAAAATAAAAAGCAGCTTTTGAGCCA 333
N Q W T L Q P N Q G Y A S K A K M G V R R G R T D Q E I K K A A F E P 70
CCAATGAAACTGCATTAAAGTTGACCAGATCGGAAGATGGATTGTCTGGACGGCTGCTCTGGTCTTGGACCTCTGTGTTATATGGAATCGGAATGTC 438
A M E T A F K V D Q M G R W I V A G G A A V G L G A L C Y Y G M G M S 107
AATGAGATTGGACCCATTGAAAAAGCTGTTATTTGGCCCTCAGTATGTGAAGACCGAATCCGTTCTACCTACATGATTTTGCAGGAAGTGTGGTTTGCAGCA 543
N E I G A I E K A V I W P Q Y Y K D R I R S T Y M Y F A G S V G L T A 140
CTGTCTGCTGTAGCAGTCACTAGATCGCCCTGCACTCATGAGCCCTATGATGAGGGTCTTGGCTGGCAATTTGGTCAACTTTTGCAGCTATGATGGTGTGGG 648
L S A V A V S R S P A L M S L M M R G S W L A I G A T F A A M I G A G 175
ATACTGGTACGCTAATCTATGAAGCTAATCTGGTCTAAACCTTGCCTGATGCTTATCATGAGGACTCATGGTGGCTGGTGGCTCCATGACCTTG 753
I L V R S I S Y E G N P G A K H L A W M L H A G V M G A V V A P L T L 210
TTGGTGGTCTCTGCTAATCAGACCTGCTTGTACACAGCAGGAATTTGAGGAGTCTCTCAACTGTGGCCATGTCCGCAAGTCAAAAGTTTCTGAACATG 858
L G G P L L I R A A W Y T A G I V G G L S T V A M C A P S E K F L N M 240
GGAGGACCACTTGGATAGGCCCTGGCCCTTGTTTGGCTTCTTCACTGGATCTATGTTCTGCTCCTACATCTGCATTGGAGCAGGGCTGATTTCTGTAGCA 963
G G P L G V G L G L V L A S S V G S M F L P P T S A F G A G L Y S V A 280
GTTTATGGTGGATTGCTGTTGGCATGTTCTTCTGTATGACACACAAAAAGTTATCAAAAGTGCAGAGACACCCCACTTTCAGTATATGGATGGCAAAA 1068
V Y G G L I L F G M F L L Y D T Q K V I K R A E T H P V S V Y G V A K 315
TATGACCCATTAACTCGTGTATGGTATCTACATGGATACACTTAACATCTTATCCGGTGGCCACCATGCTTGGCATTGGTGGAGTAAACAGGAGAAATGA 1173
Y D P I N S C M G I Y M D T L N I F I R V A T M L G I G G S N R R K * 349
ATGAGATTTTCTTTCAACCATCTGATATTTCAACCAACTCTGCTGCTAGAGAGTATGCCTAGTAAAAAGTTAACTGGTGTACAAGCAGCTGTCATGATA 1278
CATCAAAAGTTTACGCACTTCAATATTATTATAAAGTGTTTCTGTACAACATGACTCTCAAGGATGCATTAACCTAATTTCTCATGTGAACAGGCCATATTTAAA 1383
TTGCAGTGAACCACTTGTACATAAATTTGATCATCACAATGAGAGAAAATATATTCAGTAAATATATTTCTAAAATTTAGTAAACAAAACTGAATCAGCTGCTTC 1488
ACTGAAAGCTTTGACATCATTATCTGGACTATCACTTCTGTGCTACCATCATGCAATAAAAAATAAACTAATCCCTGAATGTAGAATCAAGTATACAG 1593
AAAGGGCAGATGAAACCTCGACACTGATACTGGAATACGGAACCTTATGCTTAAACAAAGTGTGGTGTGACTGAAAGCCATTGCTGCTCTTTGATGGCCCTTG 1698
TGAACACAGAGAAACAAAGCCCTTGGAAAGCAGTGTGGCACTGTAACCAAGCTTGTACTCTTACTGTGTATTTGCTCTGTGGGTAGATAAAACTTCAGC 1803
ACTTTTCTGAGGACACTTGAAGAGTTAGTGTTCAGTGTGGCTGTAACGTTTCCAACATCCTTATGTTCTGTTCTGTTATTTGCCTTTCACCTGAACTTTGGGAA 2013
CATCAAACTATTGAGTGTGGTTCAGAACCAAAAATAAATTTGGGCTATAATGTGTGTTTGGCATATAAAAAACAACAGCTTTTAAAAATATTGAAATCAAC 2118
TAAGTTGTGTTGGTGGTATGAGCTTGCAGTGACCACTGCAACTCTGCACTAATGAGTGTACTGGAACAGCGGGAAGGCAAACTCATTTTGTGTTTT 2223
TTTGACCTGTGTTCCAGGCCCCAGAACCAAGGACGTTGGCCGGTAATCCTTTAGCTCTTACCAAAATTACTTCGGTAAAAATGGTATTTTCTGACCATATTT 2328
AACAAAAGTCCCTCATTAAATGTTGATGTTGAATTTCTACAACATATGTTCAATTTTATAAATACCATGCTTGATTTGTCAAATGCACGTTTATAAGATGGATAA 2433
CAGGTAAGCCTGTGAAAAATTTGGCCACAGCTAATTTTGGAAATCCTTATAGTAAATGAGGCTTATGTAACACTGTTGTACTCAATCTAGTATTAGTTGG 2538
CAAAAATCAAACTCCTCAGTTGAGAAAATTTATTTATCCTTTCATCTGATTTGTGCTATGCTGTATCCTGAGTCTGAAACAATAAATCCAAAACAGCAAAA 2643
AAAAAAA 2650

```

图 1 中华鳖 GHITM cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotides and deduced amino acids sequence of *T. sinensis* of GHITM

下画线表示跨膜结构域

Underline represents the transmembrane domain

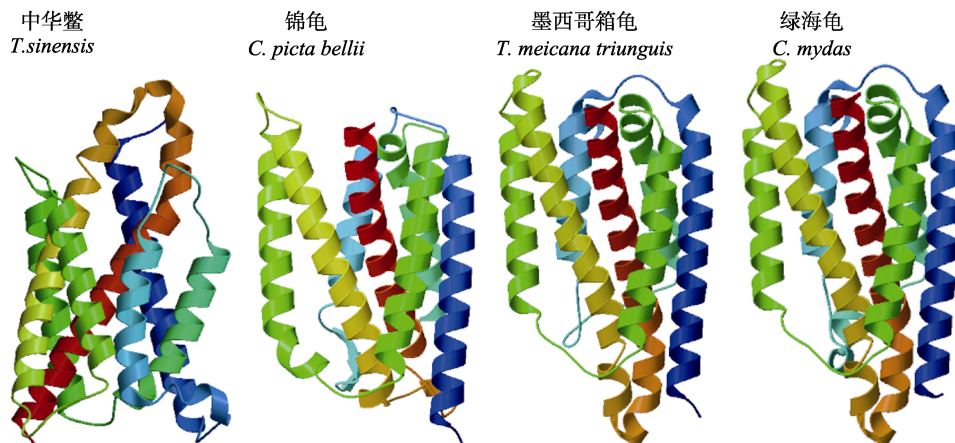


图 2 GHITM 编码蛋白功能域预测

Fig.2 Prediction of protein functional domains of GHITM

mississippiensis, XP_006270235.1)、非洲鸵鸟(*Struthio camelus australis*, XM_009685550)、褐几维鸟(*Apteryx australis mantelli*, XM_013961508)、日鵉(*Eurypyga helias*, XM_010148176)、暴雪鸢(*Fulmarus glacialis*, XM_009578185)、鵉 鸫(*Leptosomus discolor*, XM_009958645)、日本冠鵉(*Nipponia nippon*, XM_009465931)和帝企鵉(*Aptenodytes forsteri*, XM_019473032)物种的 *GHITM* 基因。利用 MEGA 6.06 软件对 14 个物种 *GHITM* 基因编码氨基酸序列进行比对并构建 NJ 系统进化树分析, 结果显示, 鳖科的中华鳖与龟科的锦龟和海龟科的绿海龟亲缘关系最近, 同属一个分支, 泽龟科的墨西哥箱龟独立在一支, 湾鳄、扬子鳄和密西西比鳄 3 种鳄鱼构成一分支, 7 种鸟类形成一分支。

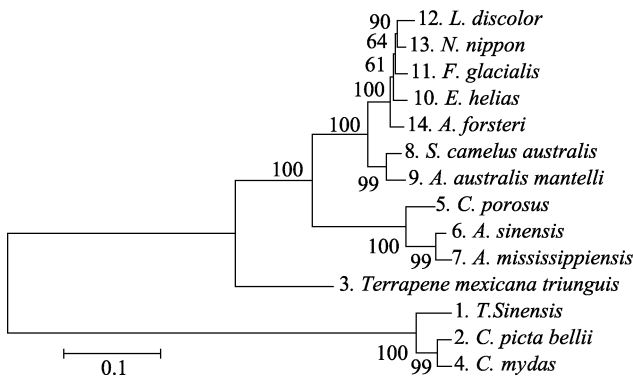


图 3 利用 MEGA 6.06 软件构建的基于 *GHITM* 基因所编码氨基酸序列的 NJ 系统进化树
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on *GHITM* amino acid sequences by MEGA 6.06

2.4 *GHITM* 基因的组织表达特性及胚胎发育阶段变化

采用相对实时定量 PCR 检测 *GHITM* mRNA 的组织表达特性, 结果显示, *GHITM* 基因在 500 g 左右中华鳖的肝脏、肌肉和脑垂体中表达水平较高, 显著高于心脏、性腺、肠、肾脏和脾脏组织($P < 0.05$), 在性腺中表达量最低, 且精巢与卵巢的表达量差异不显著($P > 0.05$); 50 g 左右和 500 g 左右雄性中华鳖肝脏中表达量显著高于雌性($P < 0.05$); 采用 30℃ 孵化的中华鳖胚胎性别决定期和分化期的雄性胚胎肝脏表达量不显著高于雌性($P > 0.05$), 在胚胎破壳时, 雌性个体肝脏组织不显著高于雄性($P > 0.05$); 经 24℃ 低温胁迫孵化处理胚胎肝脏能显著降低表达量($P < 0.05$), 34℃ 高温胁迫孵化处理不能显著增加表达量($P > 0.05$)。

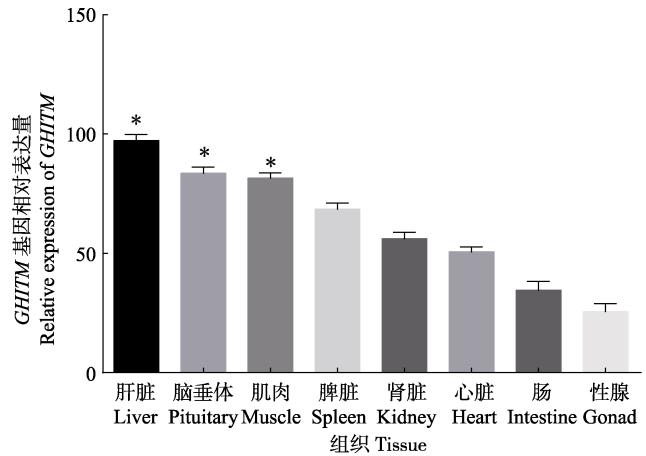


图 4 中华鳖组织 *GHITM* 基因相对表达量
Fig.4 The relative expression of *GHITM* gene in different tissues of *T. sinensis*

“*”代表组织间差异显著($n=3, P < 0.05$), 下同
“*”represents significant difference between groups ($n=3, P < 0.05$). The same as below

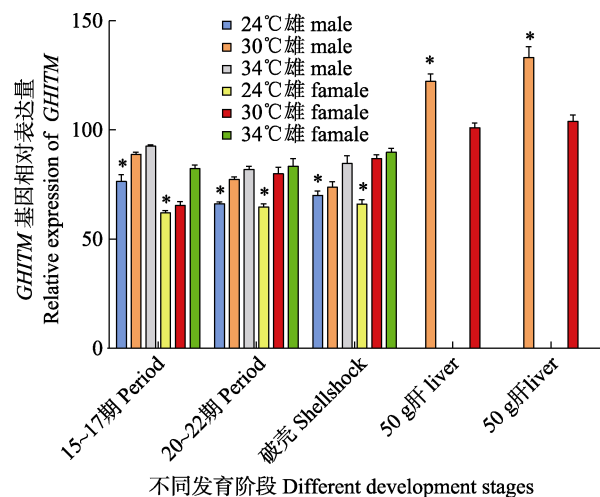


图 5 中华鳖肝脏 *GHITM* 基因相对表达量
Fig.5 Expression of *GHITM* gene in liver of *T. sinensis*

3 讨论

GHITM 在调节 GH 功能、胚胎发育、脂肪代谢和免疫等许多方面有重要功能。人类 Bax 抑制因子和 BI-1 蛋白在跨膜区有 6~7 个跨膜域, 在进化过程中是一个保守且具有复杂结构的蛋白, 主要存在于胞浆中, 作为细胞损伤和刺激的传感器等(Reimers *et al*, 2007)。本研究中的 4 种鳖龟 *GHITM* 蛋白跨膜结构域均为 7 个, 其 *GHITM* 基因编码氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树与物种传统分类地位一致。

GHITM 在动物生长及能量代谢方面具有重要作用。*GHITM* 表达量与小鼠胚胎分裂关系紧密(Yoshida *et al*, 2006)。在生长方面, 鸡 *GHITM* 有调控生长的

作用,是 B 淋巴细胞的特异性基因之一(Koskela *et al.*, 2003)。*GHITM* 介导生长激素/胰岛素样生长因子 1 轴(GH/IGF1)对动物中枢神经系统的神经保护作用(Baudet *et al.*, 2008)。罗非鱼的 *GHITM* (Qiang *et al.*, 2017)在小分子 RNA(miR-1338-5p)的调节下参与干扰生长激素(GH)-生长激素受体(GHT)-胰岛素样生长因子(IGF)信号通路,参与罗非鱼的生长和发育。中华鳖雌雄个体在生长过程中存在差异,雄性中华鳖生长速度显著高于雌性(马晓等, 2015)。本研究选取快速生长阶段中的 50 g 左右和 500 g 左右中华鳖为研究材料,结果表明,500 g 左右中华鳖 *GHITM* 基因在肝脏中表达量高于 50 g 左右中华鳖,据此推断, *GHITM* 基因参与了中华鳖生长调节。

此外, *GHITM* (Henke *et al.*, 2011)通过细胞内钙内稳态维持线粒体的正常结构。LPS 刺激诱导仿刺参体腔细胞发现 *GHITM*(高杨等, 2014)参与了仿刺参抗细菌感染和天然免疫防御反应。本研究发现,脾脏中 *GHITM* 有较高的表达量,其是否参与中华鳖的免疫尚需进一步研究。

GHITM 在小鼠(Li *et al.*, 2001)的胚胎发育过程中,含量不断增加,且在心、肝、肌、胃、肾、脑中均表达量较高。东方蜜蜂(*Apis cerana*)的 *GHITM* 能够协同 PGDR 参与蜕皮和变态过程,在工蜂幼虫中 *GHITM* 基因表达随日龄稳定增长,而蜂王蛹中该基因的表达模式为先下降后上升(龚志文等, 2016)。半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)GH/IGF- I 轴(徐永江等, 2017)对卵巢发育具有重要的调控作用。在中华鳖胚胎发育阶段,孵化温度与孵化性别(巫旗生等, 2011)和胚胎重量存在相关性。本研究中,低温孵化处理对中华鳖胚胎 *GHITM* 基因表达量有显著抑制作用,高温孵化处理对其表达有上调作用,而在胚胎发育性别分化期(20~22 期)*GHITM* 基因表达量有所下降,这表明 *GHITM* 参与了中华鳖胚胎发育,但 *GHITM* 是否协同中华鳖性别调控还需进一步证实。综上所述,本研究是鳖龟类 *GHITM* 基因研究的首次报道,为进一步研究中华鳖胚胎发育和生长提供理论依据。

参 考 文 献

- Baudet ML, Hassanali Z, Sawicki G, *et al.* Growth hormone action in the developing neural retina: A proteomic analysis. *Proteomics*, 2008, 8(2): 389-401
- Gao Y, Wang SN, Ye SG, *et al.* Cloning and LPS - induced expression analysis of *ghitm* gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 543-549 [高杨, 王胜男, 叶仕根, 等. 仿刺参 *ghitm* 基因的克隆及 LPS 诱导后的表达分析. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 543-549]
- Gong ZW, Fan Y, Yang MH, *et al.* Growth-hormone inducible transmembrane protein (*GHITM*) expression in different developmental stages of honeybee (*Apis cerana*). *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2016, 31(1): 81-86 [龚志文, 樊莹, 杨明华, 等. 生长激素诱导的跨膜蛋白基因(*GHITM*) 在东方蜜蜂(*Apis cerana*) 幼虫不同发育阶段的相对表达分析. 云南农业大学学报(自然科学版), 2016, 31(1): 81-86]
- Henke N, Lisak DA, Schneider L, *et al.* The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 251-260
- Knapp JR, Chen WY, Turner ND, *et al.* Growth patterns and body composition of transgenic mice expressing mutated bovine somatotropin genes. *Journal of Animal Science*, 1994, 72(11): 2812-2819
- Koskela K, Kohonen P, Nieminen P, *et al.* Insight into lymphoid development by gene expression profiling of avian B cells. *Immunogenetics*, 2003, 55(6): 412-422
- Li Y, Kelder B, Kopchick J, *et al.* Identification, isolation, and cloning of growth hormone (GH)-inducible interscapular brown adipose complementary deoxyribonucleic acid from GH antagonist mice. *Endocrinology*, 2001, 142(7): 2937-2945
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452
- Luo SJ, Chen WY, Yang CY, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of growth-hormone inducible transmembrane protein gene (*GHITM*) from *Pinctada martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8): 1973-1980 [罗少杰, 陈伟耀, 杨创业, 等. 马氏珠母贝生长激素诱导跨膜蛋白基因 *GHITM* 克隆与表达分析. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 1973-1980]
- Ma X, Wang XQ, Xiong G, *et al.* Effect of morphological traits on body weight of female and male *Pelodiscus sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 93-97 [马晓, 王晓清, 熊钢, 等. 不同日龄池塘养殖中华鳖形态性状对体重的影响. 淡水渔业, 2015, 45(1): 93-97]
- Qiang J, Bao JW, Li HX, *et al.* miR-1338-5p modulates growth hormone secretion and glucose utilization by regulating *ghitm* in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 998
- Reimers K, Choi CY, Bucan V, *et al.* The growth-hormone inducible transmembrane protein (*GHITM*) belongs to the Bax inhibitory protein-like family. *International Journal of Biological Sciences*, 2007, 3(7): 471-476
- Wu QS, Wang XQ, Zeng YY, *et al.* Influence on sexual differentiation in *Trionyx sinensis* by temperature. *Feed*

Review, 2011, 42(2): 42–44 [巫旗生, 王晓清, 曾亚英, 等. 孵化温度对中华鳖性别分化的影响. 饲料博览, 2011, 42(2): 42–44]

Xiong T, Liu R, Zhao QP, *et al.* Cloning and expression of the transmembrane protein (GHITM) gene of *Schistosoma japonicum Katsurada*. Chinese Journal of Microcirculation, 2012, 22(4): 87 [熊涛, 刘榕, 赵琴平, 等. 日本血吸虫生长激素诱导的跨膜蛋白(GHITM)基因克隆与表达. 微循环学杂志, 2012, 22(4): 87]

Xu YJ, Liu XZ, Shi Y, *et al.* Physiological role of GH/IGF-I axis

in ovarian development of *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 73–80 [徐永江, 柳学周, 石莹, 等. GH/IGF- I 轴对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 卵巢发育的调控作用. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 73–80]

Yoshida T, Nagata S, Kataoka H. GHITM is an ortholog of the *Bombyx mori* prothoracic gland-derived receptor (PGDR) that is ubiquitously expressed in mammalian cells and requires an N-terminal signal sequence for expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 341(1): 13–18

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Analysis of *GHITM* cDNA in *Trionyx sinensis*

XIONG Gang^{1,2}, ZHOU Xianwen², MA Xiao³, ZENG Dan²,
CHEN Zhennian², KANG Li¹, WANG Xiaoqing^{2①}

(1. Department of Animal Science and Technology, Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127;

2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

Abstract In this study, we obtained the full-length cDNA of the *GHITM* gene from *Trionyx sinensis* for the first time using the RACE (rapid-amplification of cDNA ends) method. The full-length cDNA sequence was 2650 bp, including a 123 bp 5'-UTR, 1477 bp 3'-UTR, and 1050 bp open reading frame (ORF) that encoded 349 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of this peptide was 10.01, and the molecular mass was 37.12 kDa. The amino acid sequence was composed of the extracellular region, the transmembrane region, and the intracellular region. The transmembrane region was composed of 7 transmembrane domains. The phylogenetic analysis of the amino acid sequences showed that *T. sinensis*, *Chrysemys picta bellii*, and *Chelonia mydas* belonged to the same branch, the three species of crocodiles formed a branch, and birds formed another branch. The expression of *GHITM* in different tissues was also analyzed with quantitative real-time PCR. The results showed that *GHITM* was expressed in all the tested tissues, including the liver, pituitary, muscle, spleen, kidney, heart, intestine, and gonad, with the high expression observed in the liver, muscle, and pituitary. At the specifications of 50 g and 500 g, the expression of *GHITM* was significantly higher in the liver of males than females ($P < 0.05$). Low temperature incubation can inhibit the expression of *GHITM* in fetal embryos ($P < 0.05$). The results indicated that *GHITM* was related to the growth and embryo development of *T. sinensis*.

Key words *Trionyx sinensis*; *GHITM*; Gene cloning; Embryonic development; Tissue expression

① Corresponding author: WANG Xiaoqing, E-mail: wangxiao8258@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180907002

http://www.yykxjz.cn/

曲梦, 江艳华, 李凤铃, 姚琳, 逢凤娇, 王联珠, 翟毓秀. 装甲 RNA 在牡蛎中诺如病毒 4 种 RNA 提取方法比较研究中的应用. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 180-185

Qu M, Jiang YH, Li FL, Yao L, Pang FJ, Wang LZ, Zhai YX. Application of armored RNA to compare four norovirus RNA extraction methods in oysters. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 180-185

装甲 RNA 在牡蛎中诺如病毒 4 种 RNA 提取方法比较研究中的应用*



曲 梦 江艳华 李凤铃 姚 琳^① 逢凤娇 王联珠 翟毓秀

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室 青岛 266071)

摘要 RNA 提取是诺如病毒检测的关键步骤, 而目前贝类中诺如病毒 RNA 提取、检测方法的比较与评价常囿于缺乏量值明确、无生物安全隐患的标准样品作为参考依据。本研究将前期制备的 G II 型诺如病毒装甲 RNA (3.0×10^{10} 拷贝) 作为标准样品, 人工污染牡蛎 (*Ostrea gigas tnumb*) 消化腺匀浆物, 用 4 种常见 RNA 提取方法: TRIzol 试剂、Viral RNA Kit、High Pure Viral Nucleic Acid Kit、柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒, 分别提取 RNA, 经实时荧光 RT-PCR 检测后, 利用标准曲线进行定量分析, 分别计算 4 种方法对装甲 RNA 的回收率。结果显示, 对于匀浆样本, TRIzol 法对装甲 RNA 的回收率最高 ($6.80 \pm 0.89\%$), 显著高于 Viral RNA Kit ($4.51 \pm 2.28\%$), 二者的回收率又显著高于 High Pure Viral Nucleic Acid Kit ($0.24 \pm 0.05\%$) 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒 ($0.11 \pm 0.02\%$) ($P < 0.05$); 对于冻干样本, Viral RNA Kit 对装甲 RNA 的回收率最高 ($8.71 \pm 0.17\%$), 显著高于 TRIzol 试剂 ($7.12 \pm 0.64\%$), 二者的回收率又显著高于 High Pure Viral Nucleic Acid Kit ($0.33 \pm 0.12\%$) 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒 ($0.06 \pm 0.01\%$) ($P < 0.05$)。研究表明, TRIzol 试剂与 Viral RNA Kit 对牡蛎消化腺样本中人工添加的装甲 RNA 均有良好的回收效果, 同时也提示装甲 RNA 可作为一种良好的标准样品用于不同 RNA 提取试剂盒方法的评价与比较研究。

关键词 诺如病毒; 装甲 RNA; 牡蛎; RNA 提取方法; 比较

中图分类号 Q33 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0180-06

人类各年龄段的非菌性胃肠炎中约有 95% 是由诺如病毒 (Norovirus, NoVs) 引起的 (Ma *et al*, 2014)。我国是全球 15 个腹泻病高负担国家之一, NoVs 在我国腹泻病例中的检出率在 11.6%~59.52% 之间 (阎岩等, 2013; 余建兴等, 2015; 陈莉莉等, 2018), 食物污染是

NoVs 传播的最主要途径, NoVs 成为影响我国食品安全与公共卫生的重要病原。研究表明, 多数 NoVs 疫情的暴发都与生食受污染牡蛎等贝类有关 (Westrell *et al*, 2010)。牡蛎属于双壳滤食性生物, 其内脏中存在 NoVs 受体及其合成酶 (Le *et al*, 2006; 姜薇等,

* 国家重点研发计划 (2017YFC1600703)、科技部科技基础性工作专项 (2013FY113300) 和现代农业产业技术体系 (CARS-47) 共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600703); Special Program for Science and Technology Basic Research of the Ministry of Science and Technology China (2013FY113300); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Found, CAFS (2016HY-ZD11); China Aquaculture Research System (CARS-47)]. 曲 梦, E-mail: 1874213448@qq.com

^① 通讯作者: 姚 琳, 副研究员, E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-09-07, 收修改稿日期: 2018-10-31

2014; 姚琳等, 2016), 牡蛎滤食海水中有有机碎屑、微藻(任黎华等, 2013), 极易将水体中污染的 NoVs 特异性富集于体内, 因此被认为是引起 NoVs 食源性感染的高风险食品之一(Persson *et al*, 2018)。

实时荧光 RT-PCR 目前是 NoVs 检测的主要方法, 而 RNA 提取是 NoVs 检测的基础, RNA 的纯度、浓度及 RT-PCR 抑制物的多少对检测结果影响很大, 如何提取高质量的 RNA 是检测的关键(Tan *et al*, 2009)。不同方法在 RNA 提取效率及对抑制物的去除效果方面有所差别, 并最终影响检测结果(江涛等, 2017)。选择合适的提取方法, 可从源头上最大程度避免 NoVs 检测结果的假阴性, 确保检测结果的科学性和可靠性。由于 NoVs 无法按照传统方法进行体外培养, 因此在比较或评价不同提取方法时, 多数研究者用阳性 NoVs 腹泻样本或替代病毒—鼠诺如病毒添加到空白样本中(Uhrbrand *et al*, 2017; Kanwar *et al*, 2018)模拟实际样本, 前者病毒含量不一且存在严重生物安全隐患, 后者要经过繁琐的细胞培养与病毒含量测定。针对上述问题, 近年来有研究开发出装甲 RNA 技术, 即将检测靶标 RNA 包装在噬菌体病毒样颗粒内, 一方面利用噬菌体衣壳蛋白保护易降解的 RNA, 另一方面病毒样颗粒高度模拟了病毒粒子结构, 在提取、裂解等环节展示出与天然病毒的相似性(Pan *et al*, 2012), 成为目前广泛应用的 RNA 病毒检测质控品。

本课题组前期建立了基于 Q β 噬菌体的装甲 RNA 制备平台(张奇等, 2017), 制备了多批内含 NoVs 检测靶标的装甲 RNA。本研究将上述装甲 RNA 作为量值明确的标准样品添加到牡蛎内脏匀浆物中, 以此模拟污染样本来比较 TRIzol 试剂等 4 种主要 RNA 提取方法对内脏匀浆物中装甲 RNA 的回收率, 旨在筛选一种适合牡蛎中 NoVs RNA 提取的方法, 同时探讨装甲 RNA 作为量值明确的标准样品用于方法比较研究的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RNA 提取试剂 TRIzol[®]购自 Life 公司; RNA 提取试剂盒 Viral RNA Kit 购自 OMEGA 公司, High Pure Viral Nucleic Acid Kit 购自 Roche 公司, 柱式病毒 RNA_{OUT} 购自北京 TIANDZ 基因科技有限公司; One Step PrimeScript[™] RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司; 无水乙醇、异丙醇、氯仿等试剂均为分析纯。G II 型诺如病毒装甲 RNA 由本实验室制备、定量(3.0×10^8 拷贝/ μ l)。参照 GB 4789.42-2016《食

品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成检测 G II 型 NoVs 所需的引物、探针, 名称及序列见表 1。实时荧光定量 PCR 仪为美国 Roche 公司 LightCycler 2.0。

表 1 引物、探针信息
Tab.1 Information of primers and probe

引物与探针 Primers and probe	序列 Sequence(5'~3')
QNIF2	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACA
QNIFs(Probe)	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMARA

注: R=A/G; W=A/T; FAM=羧基荧光素; TAMARA=羧基四甲基罗丹明

Note: R=A/G; W=A/T; FAM=Carboxyfluorescein; TAMARA= Carboxytetramethylrhodamine

1.2 样品制备

将实验室收集的、经实时荧光 RT-PCR 检测 G II 型诺如病毒呈阴性的牡蛎消化腺样品混合并匀浆, 分装至 48 支 15 ml 无酶离心管中, 每管 2.0 g, 分别添加 3.0×10^{10} 拷贝的装甲 RNA, 充分混匀, 室温放置 1 h, 制成牡蛎消化腺人工污染匀浆样品; 从中随机取 24 管样品逐一称重后真空冷冻干燥, 制成消化腺人工污染冻干样品, 冻干后再次逐一称重, 检测前根据每管失水的量加入相应重量的 RNase-free H₂O 复水, 涡旋混匀。

1.3 病毒 RNA 提取

按照说明书分别用 TRIzol 试剂、High Pure Viral Nucleic Acid Kit、柱式病毒 RNA_{OUT}、Viral RNA Kit 提取 1.2 中制备的人工污染样品。每种样品提取 5 次。

1.4 实时荧光 RT-PCR

用 TaKaRa One Step Primescript[™] RT-PCR kit 对提取的 RNA 进行实时荧光 RT-PCR 检测, 反应体系和循环参数如下: 2 \times one step RT-PCR Buffer III 10 μ l, TaKaRa Ex Taq HS(5 U/ μ l) 0.4 μ l, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ l, QNIF2(10 μ mol/L)、COG2R(10 μ mol/L) 各 0.3 μ l, QNIFs(10 μ mol/L)0.4 μ l, RNA 2.0 μ l, RNase-free H₂O 6.2 μ l; 以 RNase-free H₂O 为模板设置空白对照, 以诺如病毒检测阴性且未添加装甲 RNA 的牡蛎内脏作为阴性对照。循环参数为 42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 sec; 95 $^{\circ}$ C 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 20 sec, 40 个循环。每份样品的 RNA 平行测 3 次, 记录 C_t 值。

1.5 回收率计算

利用本实验室前期建立的 G II 型诺如病毒装甲 RNA 定量用标准曲线 $y=-3.562x+37.938$ (张奇等, 2017), 计算各样品中装甲 RNA 的拷贝数。根据不同的提取方法与样本类型, 分别计算装甲 RNA 的回收率。计算公式: 装甲 RNA 回收率 = 提取出的装甲 RNA 拷贝数 / 添加到样品中的装甲 RNA 拷贝数 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学分析

将匀浆样品与冻干样品经 4 种不同提取方法提取 RNA 检测得到的 C_t 值和装甲 RNA 回收率采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著。 C_t 值和回收率的分布用 GraphPad Prism 6.0 分析与绘图。

2 结果

2.1 4 种提取方法所得 RNA 的 C_t 值分析

在牡蛎内脏匀浆物中添加 3.0×10^{10} 拷贝 G II 型诺如病毒装甲 RNA, 经 4 种方法提取后的 RNA 进行实时荧光 RT-PCR 检测, 所得 C_t 值统计后见表 2, C_t 值分布经 GraphPad Prism 6.0 处理, 见图 1。对于匀浆样品, TRIzol 法所提取的 RNA 得到的 C_t 值最小, 其次是 Viral RNA Kit, 二者差异性显著 ($P < 0.05$), High Pure Viral Nucleic Acid Kit 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒的 C_t 值较大, 二者之间差异不显著, 但与 TRIzol 法与 Viral RNA Kit 相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。对于冻干样品, TRIzol 法与 Viral RNA Kit 的 C_t 值均很小, 二者差异性不显著 ($P > 0.05$), High Pure Viral Nucleic Acid Kit 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒的 C_t 值仍较大,

表 2 实时荧光 RT-PCR 分析 4 种提取方法所得 RNA 的 C_t 值 ($X \pm SD$)

Tab.2 C_t values of RNA obtained from 4 extraction methods analyzed with realtime RT-PCR ($X \pm SD$)

提取方法 Extraction methods	C_t 值 C_t values	
	匀浆样品 Homogenate sample	冻干样品 Freeze-dried sample
TRIzol 法	24.12 \pm 0.20 ^a	24.04 \pm 0.14 ^a
Viral RNA Kit	25.33 \pm 0.70 ^b	24.17 \pm 0.03 ^a
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	30.03 \pm 0.28 ^c	29.66 \pm 0.72 ^b
柱式病毒 RNA _{OUT}	30.46 \pm 0.21 ^c	31.54 \pm 0.38 ^b

注: 同列数据中相同上标字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下同

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different ($P > 0.05$), the same as below

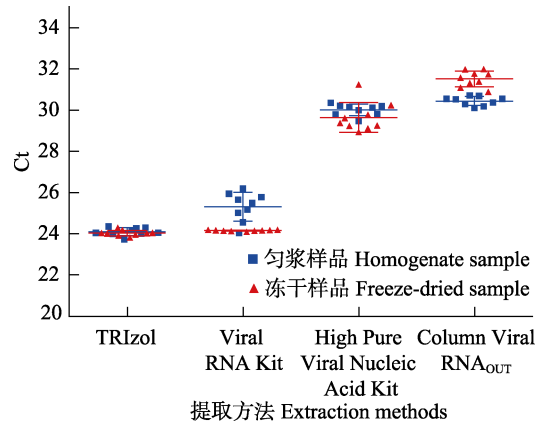


图 1 4 种 RNA 提取方法对应 C_t 值的分布
Fig.1 Scatter diagram for C_t values of RNA obtained from 4 extraction methods

二者之间差异不显著, 但与 TRIzol 法与 Viral RNA Kit 相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 4 种 RNA 提取方法对装甲 RNA 回收率分析

将 4 种 RNA 提取方法所得 C_t 值代入标准曲线计算出 2.0 μ l RNA 所含的装甲 RNA 拷贝数, 再根据不同试剂盒的提取流程, 最终计算出 4 种提取方法对添加的装甲 RNA 的回收率, 结果见表 3。所得装甲 RNA 的回收率经 GraphPad Prism 6.0 分析后, 结果见图 2。对于匀浆样品, TRIzol 法的回收率最高, 其次是 Viral RNA Kit, 二者差异性显著 ($P < 0.05$), 但均能达到 GB 4789.42-2016 中关于回收率应大于 1% 的要求, High Pure Viral Nucleic Acid Kit 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒的回收率均很低, 二者之间差异不显著, 但与 TRIzol 法与 Viral RNA Kit 相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。对于冻干样品, Viral RNA Kit 的回收率最高, 其次是 TRIzol 法均超过 2%, 二者差异性不显著 ($P > 0.05$), High Pure Viral Nucleic Acid Kit 与柱式病毒 RNA_{OUT}

表 3 4 种 RNA 提取方法对装甲 RNA 的回收率 ($X \pm SD, n=5, \%$)

Tab.3 Recovery of 4 RNA extraction methods for armored RNA ($X \pm SD, n=5, \%$)

提取方法 Extraction methods	回收率 Recovery efficiencies	
	匀浆样品 Homogenate sample	冻干样品 Freeze-dried sample
TRIzol 法	6.80 \pm 0.89 ^a	7.12 \pm 0.64 ^a
Viral RNA Kit	4.51 \pm 2.28 ^b	8.71 \pm 0.17 ^b
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	0.24 \pm 0.05 ^c	0.33 \pm 0.12 ^c
柱式病毒 RNA _{OUT}	0.11 \pm 0.02 ^c	0.06 \pm 0.01 ^c

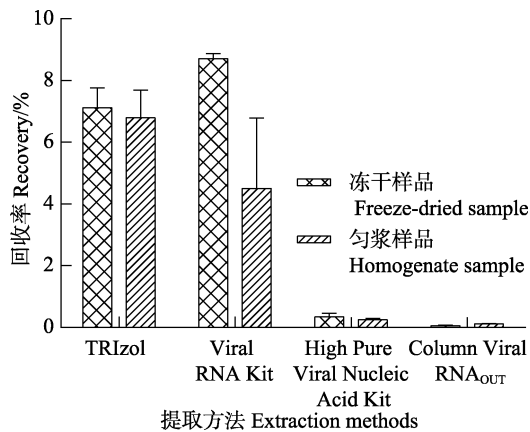


图 2 4 种 RNA 提取方法对装甲 RNA 的回收率

Fig.2 Recovery of 4 RNA extraction methods for armored RNA

试剂盒的回收率很低,二者之间差异不显著,但与 Viral RNA Kit 与 TRIzol 法相比,差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

NoVs 是世界范围内的一种重要食源性病毒,是引起人类急性胃肠炎的主要病原。牡蛎因其自身生物学特性成为 NoVs 传播的重要载体之一,实时荧光 RT-PCR 目前是检测 NoVs 的“金标准”,然而受污染牡蛎自身存在大量 RT-PCR 抑制物、NoVs 含量低、基因分型多等因素影响,其检测难度高于常见 RNA 病毒,提高检测方法的灵敏度和病毒回收率是各国学者一直关注的问题(Francoise *et al*, 2009)。部分提取方法对目标 RNA 的提取效率低、对样本中存在的 RT-PCR 抑制物去除效果不好、扩增前 RNA 出现降解等问题往往造成检测结果的假阴性(Das *et al*, 2011)。因此,比较病毒 RNA 提取方法成为优化、筛选 NoVs 检测方法的重点之一。虽然 NoVs 目前已可以基于干细胞转化出的肠上皮细胞进行人工培养(Ettayebi *et al*, 2016),但对实验条件与经验有严格的要求,短期内很难在大多从事应用性基础研究的实验室开展,因此在提取方法比较研究中,多数学者仍使用含病毒的临床腹泻样本和鼠诺如病毒等作为质控品添加到阴性样品中,但存在难以获得、量值不均一、生物安全隐患等不足。

本实验室前期基于 Q β 噬菌体制备平台,成功制备了内含 G II 型 NoVs 检测靶标的装甲 RNA,证实其均匀性和稳定性良好,拷贝数高,可实现对 NoVs 核酸检测中的 RNA 提取、反转录、扩增等过程的定性、定量质量控制和评估(Villanova *et al*, 2007; 张奇, 2017)。由于牡蛎中的 NoVs 主要集中在消化腺,因此,本研究将牡蛎消化腺匀浆物与 NoVs 装甲 RNA 混匀

后室温孵育,该人工污染的方法与用活牡蛎自然富集诺如病毒相比,简单有效,并且具有量值明确便于定量评估、可批量制备重复实验等多种优点。将人工污染后的样品分别以 TRIzol 法、High Pure Viral Nucleic Acid Kit、柱式病毒 RNA_{OUT}、Viral RNA Kit 4 种提取方法提取病毒 RNA,依据本实验室建立的 G II 型诺如病毒标准曲线分析了不同提取方法对不同状态样品中装甲 RNA 的回收率,研究结果表明,无论是匀浆样品还是冻干样品,本研究涉及的 4 种 RNA 提取方法的回收效率相差较大。

有研究分别用磁珠法和 TRIzol 法提取血清样品中丙型肝炎病毒 RNA,发现磁珠法提取的 RNA 更适用于血清样品中丙型肝炎病毒的检测(范公忍等, 2015)。Zhang 等(2015)比较了 TRIzol、异硫氰酸胍和二氧化硅纳米颗粒对丙型肝炎病毒 RNA 的提取效率,发现二氧化硅纳米颗粒的提取效率最高。上述研究结果中,TRIzol 法并没有显示出明显的优势,可能是这些研究中的血清样品与本研究中的消化腺样品基质的差异,导致了本研究与上述研究结果的不同。

以二氧化硅或其衍生材料为基础的固相吸附技术是目前大多柱式提取试剂盒的核心技术,可以特异性地吸附 RNA,样本中的蛋白质、脂质等其他组分可通过高盐缓冲液去除,然后用低盐缓冲液从二氧化硅材料中洗脱 RNA,能较为有效地去除抑制物(Zhang *et al*, 2015; Xu *et al*, 2017),但在提取 RNA 的总量上与传统的 TRIzol 法、异硫氰酸胍方法相比,相差较大。不同试剂盒离心柱的二氧化硅材料及尺寸(小体积或大体积)等因素的差异或许是导致试剂盒提取效率不同的原因之一。此外,High Pure Viral Nucleic Acid Kit 与柱式病毒 RNA_{OUT} 试剂盒可以破坏较为分散的细胞并高效地暴露 RNA,可能更适合血液、血浆、细胞培养物等样品;另外,High Pure Viral Nucleic Acid Kit 使用过程中需要添加 Poly(A),可特异性结合病毒基因组 RNA,以增强后期纯化柱对病毒基因组的吸附作用,然而牡蛎样品盐分高,多糖等抑制物较多,很可能弱化了这一步骤的实际效果,从而最终导致该试剂盒对牡蛎消化腺样本中添加的装甲 RNA 回收率较低。与这 2 种试剂盒相比,Viral RNA Kit 的裂解液等避免使用抑制 RT-PCR 的试剂,在操作上要求不高,处理步骤少,减少过度操作, RNA 降解程度低,RT-PCR 抑制物残留量少,该试剂盒较适用于牡蛎组织样品。

此外,考虑到保存期等因素,目前生物基质标准样品大多数为冻干样品,为了探讨样品冷冻干燥后,是否会影响 RNA 的提取,本研究还分析了 4 种方法

对冻干样品的提取效果, TRIzol 法与 Viral RNA Kit 的回收率与匀浆样品相比无明显差异, 一方面表明这 2 种方法对样本状态适用性的多样化, 另一方面, 与新鲜样品相比, 冻干样品脱水彻底, 可在常温条件下长时间保存, 已有研究表明, 冻干可延长单纯装甲 RNA 稳定性(Stevenson *et al.*, 2008), 本研究进一步表明, 在牡蛎内脏这样高盐、富含多糖的复杂基质样本中, 冻干对装甲 RNA 的回收、检测等没有影响, 从而为今后研制诸如病毒装甲 RNA 牡蛎内脏基质冻干标准样品提供了研究基础。

参 考 文 献

- Chen LL, Chen J, Liao NB. Epidemiological characteristics of Norovirus infectious diarrhea in Zhejiang Province from 2014 to 2016. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*. 2018, 28(7): 863–866 [陈莉莉, 陈江, 廖宁波. 2014 年-2016 年浙江省诺如病毒感染性腹泻流行病学特征分析. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(7): 863–866]
- Das A, Beckham TR, McIntosh MT. Comparison of methods for improved RNA extraction from blood for early detection of Classical swine fever virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23(4): 727–735
- Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 2016, 353(6306): 1387–1393
- Francoise SG, Parnaudeau S, Schaeffer J, *et al.* Detection and quantitation of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 618–624
- Fan GR, Chen TB, Li B, *et al.* Comparison of effects between two kinds of nucleic acid extraction method for detecting HCV RNA and their application. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2015, 12(1): 48–50 [范公忍, 陈天宝, 李冰, 等. 两种核酸提取方法对丙型肝炎病毒 RNA 检测效果的比较及应用评价. *检验医学与临床*, 2015, 12(1): 48–50]
- Jiang W, Yao L, Jiang YH, *et al.* Molecular cloning and expression of FUT2-like gene in the Oyster (*Crassostrea gigas*). *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 70–75 [姜薇, 姚琳, 江艳华, 等. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 FUT2 基因的克隆与组织表达. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 70–75]
- Jiang T, Han CH, Zhang HY, *et al.* The detection of Noroviruses in oysters sold in Beijing by using Taqman-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assays and quantitative analysis. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(2): 126–130 [江涛, 韩春卉, 张宏元, 等. 北京市市售牡蛎中诺如病毒核酸检测及定量分析. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(2): 126–130]
- Ma Y, Duan Y, Wei Y, *et al.* Heat shock protein 70 enhances mucosal immunity against human norovirus when coexpressed from a vesicular stomatitis virus vector. *Journal of Virology*, 2014, 88(9): 5122–5137
- Kanwar N, Hassan F, Barclay L, *et al.* Evaluation of RIDA[®]; GENE norovirus GI/GII real time RT-PCR using stool specimens collected from children and adults with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 2018, 104:1–4
- Le Guyader F, Loisy F, Atmar RL, *et al.* Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(6): 931–936
- Pan Y, Zhang Y, Jia T, *et al.* Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *FEBS Journal*, 2012, 279(7): 1198–1208
- Persson S, Eriksson R, Lowther J, *et al.* Comparison between RT droplet digital PCR and RT real-time PCR for quantification of noroviruses in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 284: 73–83
- Ren LH, Zhang JH, Fang JG, *et al.* A study on the daily rhythm of respiration, excretion and calcification in oysters. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34 (1): 75–81 [任黎华, 张继红, 方建光, 等. 长牡蛎呼吸、排泄及钙化的日节律研究. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 75–81]
- Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2008, 150(1–2): 73–76
- Tan SC, Chin YB. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 2009(3): 1–10
- Uhrbrand K, Koponen IK, Schultz AC, *et al.* Evaluation of air samplers and filter materials for collection and recovery of airborne norovirus. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 124(4): 990–1000
- Villanova GV, Gardiol D, Taborda MA, *et al.* Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(11): 3555
- Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, *et al.* Norovirus out breaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveillance*, 2010, 15(12): 1–4
- Xu R, Shieh YC, Stewart DS. Comparison of RNA extraction kits for the purification and detection of an enteric virus surrogate on green onions via RT-PCR methods. *Journal of Virological* 2017, 239: 61–68
- Yan Y, Wu Y, Guo J, *et al.* Sentinel surveillance and gene analysis of acute gastroenteritis norovirus in Guizhou province in 2011. *Chinese Journal of Virology*, 2013 (1): 51–55 [阎岩, 吴悦, 郭军, 等. 贵州省 2011 年急性胃肠炎诺如病毒的哨点监测及其基因特征分析. *病毒学报*, 2013(1): 51–55]
- Yao L, Jiang YH, Li FL, *et al.* Codon Optimization and prokaryotic expression of α -1 and 2-fucosyltransferase in Oyster (*Crassostrea gigas*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 74–79 [姚琳, 江艳华, 李凤铃, 等. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 α -1,2-岩藻糖基转移酶的密码子

- 优化与原核表达. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 74–79]
- Yu JX, Lai SJ, Wang X, *et al.* Analysis of epidemic characteristics of Norovirus from 2009 to 2013 in 27 provinces (municipalities and autonomous regions) of China. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2015, 36(3): 199–204 [余建兴, 赖圣杰, 王鑫, 等. 中国 27 省(市、自治区) 2009–2013 年门诊腹泻病例诺如病毒流行特征分析. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(3): 199–204]
- Zhang Q, Yao L, Jiang YH, *et al.* Development of Armored RNA reference material of Norovirus based on Qbeta bacteriophage. *China Biotechnology*, 2018, 38(1): 42–50 [张奇, 姚琳, 江艳华, 等. 基于 Qbeta 噬菌体装甲 RNA 技术的诺如病毒 RNA 标准参考样品的研制. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(1): 42–50]
- Zhang B, Chen K, Ni E. Comparison of three methods for extraction of HCV RNA in sera collected from individuals with hyperlipidemia, hyperbilirubinemia and hyperglobulinemia. *Journal of Virological Methods*, 2015, 212: 44–46

(编辑 江润林)

Application of Armored RNA to Compare Four Norovirus RNA Extraction Methods in Oysters

QU Meng, JIANG Yanhua, LI Fengling, YAO Lin^①, PANG Fengjiao, WANG Lianzhu, ZHAI Yuxiu
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

Abstract Norovirus (NoVs) is the most prevalent worldwide foodborne pathogen and causes acute viral gastroenteritis. NoVs are transmitted mainly via the fecal–oral route and by person-to-person contact. It is thought that the majority of NoVs infections are caused by the consumption of contaminated food; the ingestion of contaminated oysters is the primary cause of foodborne NoVs infection since oyster digestive diverticula accumulate viral particles from seawater via filter feeding. Real time RT-PCR is commonly used to detect NoVs RNA in oysters; however, these assays are often hampered by the low viral titer in oysters and PCR inhibition due to matrix carryover during RNA extraction. Extraction is a critical step for obtaining sufficient high-quality viral RNA for amplification; however, studies comparing and evaluating NoVs RNA extraction and detection methods in shellfish are often limited by the lack of standard samples with clear quantitative values and a lack of biosafety hazards. In this study, four RNA extraction methods (TRIzol reagent, Viral RNA Kit, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, and Column Virus RNA_{OUT} Kit) were used on oyster digestive gland homogenate samples and artificial freeze-dried samples contaminated with NoVs armored RNA (3.0×10^{10} copies/sample) as a reference material. RNA extracted by the four methods was analyzed by real time RT-PCR and quantified using previously established standard curves. For the homogenized samples, the TRIzol method had the highest recovery rate ($6.8 \pm 0.89\%$) and was significantly higher than that by the Viral RNA Kit ($4.51 \pm 2.28\%$). The recovery rates of these two methods were both significantly higher than those by the High Pure Viral Nucleic Acid Kit ($0.24 \pm 0.05\%$) and Column Virus RNA_{OUT} kit [$(0.11 \pm 0.02)\%$, $P < 0.05$]. For the freeze-dried samples, the Viral RNA Kit had the highest recovery rate ($8.71 \pm 0.17\%$) and was significantly higher than that by the TRIzol method ($7.12 \pm 0.64\%$). The recovery rates of these two methods were both significantly higher than those of the High Pure Viral Nucleic Acid Kit ($0.33 \pm 0.12\%$) and Column Virus RNA_{OUT} kit [$(0.06 \pm 0.01)\%$, $P < 0.05$]. This study indicated that the TRIzol method and Viral RNA Kit could extract target RNA from oyster digestive gland homogenate samples with an ideal recovery rate; moreover, armored RNA could serve as a good reference material for comparing RNA extraction methods.

Key words Norovirus; Armored RNA; Oyster; RNA extraction method; Comparison

① Corresponding author: YAO Lin, E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190115001

http://www.yykyxjz.cn/

邹朝阳, 赵峰, 王志, 欧帅, 王轰, 李国栋, 周德庆. 大菱鲆不同部位营养与质构品质分析评价. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 186-195

Zou ZY, Zhao F, Wang Z, Ou S, Wang H, Li GD, Zhou DQ. Analysis and evaluation of nutrition and texture quality in different parts of turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 186-195

大菱鲆不同部位营养与质构品质分析评价*

邹朝阳^{1,2} 赵峰¹ 王志¹ 欧帅^{1,2}
王轰³ 李国栋⁴ 周德庆^{1①}



(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药物与生物制品功能实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 3. 蓬莱汇洋食品有限公司 烟台 264000; 4. 青岛益和兴食品有限公司 青岛 266000)

摘要 以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为研究对象,系统比较分析了其背部、腹部、胸腔部、尾部、裙边和鱼皮的基本营养成分、胶原蛋白含量、氨基酸与脂肪酸组成及质构特性,并进行了营养价值评价,获得了大菱鲆各部位营养与质构品质的基础数据。研究结果显示,不同部位的粗蛋白含量存在差异,鱼皮中含量最高为29.04%,而裙边含量最低为12.99%,与其他部位肌肉差异均极显著($P<0.01$)。背部、腹部、胸腔部和尾部的粗蛋白含量分别为18.76%、18.96%、17.91%和18.39%;裙边粗脂肪含量最高达17.47%,脂肪酸种类最多为27种,并且含量达318.09 mg/g,多不饱和脂肪酸的含量为其他部位的3.90~6.76倍,其中亚油酸含量最高(107.26 mg/g),其次为DHA(64.39 mg/g)和EPA(26.61 mg/g);鱼皮中胶原蛋白含量达224.69 mg/g,显著高于其余部位($P<0.01$),可作为制备胶原蛋白的原料。各部位中均检测出18种氨基酸,背部、腹部、胸腔部、尾部和裙边中第一限制性氨基酸均为Met+Cys,而在鱼皮中第一限制性氨基酸为Trp;另外,大菱鲆除鱼皮之外,其余各部位氨基酸组成均符合FAO/WHO参考模式标准;通过质构特性分析,发现胸腔部肌肉的硬度、咀嚼性和弹性显著高于其余部位($P<0.05$),口感更佳。

关键词 大菱鲆; 不同部位; 营养; 质构; 品质; 评价

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0186-10

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 英文名为Turbot, 在中国被音译为“多宝鱼”, 俗称欧洲比目鱼, 广泛分布于大西洋东侧欧洲沿岸, 主要集中在英国北海, 另有少量分布在黑海和地中海沿岸。我国于1992年首次从英国引进大菱鲆, 并在山东试养成功,

经过多年的繁育及推广, 现已成为我国北方沿海重要的养殖经济鱼种之一, 养殖区域已遍布山东半岛、辽东半岛及渤海湾地区, 并向江苏、浙江、福建等南部沿海省份延伸(雷霖霖等, 2008)。2017年我国鲆鱼类养殖总产量达到10.62万t(徐乐俊等, 2018)。

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2016HY-ZD0801)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016002)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0801), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016002)]. 邹朝阳, E-mail: zouzhaoyang32@163.com

① 通讯作者: 周德庆, 研究员, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-01-15, 收修改稿日期: 2019-02-25

大菱鲆是国际上公认的高价值食用鱼类,但我国大菱鲆加工率低、产品种类单一,主要以鲜销或初加工为主,同时在加工过程中,会产生大量的副产物(包括鱼皮、鱼骨、裙边及鱼鳍等),目前这些副产物主要用来生产鱼粉,尚未对其中有价值的营养和活性成分进行充分利用,导致大菱鲆的整体价值不高,产业效益偏低。已有相关研究主要集中在养殖环境(曾霖等, 2013; Ham *et al.*, 2003)、养殖时间(王彩理等, 2012)、饵料(Altundag *et al.*, 2014; 代伟伟等, 2015; Zhang *et al.*, 2013)以及宰后处理(李敬等, 2016; 李婷婷等, 2014)等因素对大菱鲆单一品质的影响,对其不同部位肌肉的营养品质特性系统研究较少,因此亟需有针对性的对大菱鲆不同部位的营养价值和品质进行深入研究。充分了解大菱鲆营养和品质特性不仅可以为消费者提供营养学基础资料,也有利于根据其相关特性进行精深加工,开发独具特色的系列产品,提高产品附加值,促进大菱鲆产业健康发展。本文对大菱鲆不同部位组织(背部、腹部、胸腔部、尾部、裙边和鱼皮)营养品质特性进行系统的研究,以期为大菱鲆分割加工以及精深加工提供基础数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜活大菱鲆,体重为(1.0±0.2) kg/条,购于青岛卓越海洋养殖基地。

NaOH、K₂SO₄、H₃BO₃、浓盐酸、甲醇、乙醇、石油醚、Tris、KCl(分析纯),国药集团化学试剂有限公司; 17种氨基酸混合标准品、色氨酸标准品、35种脂肪酸混合标准品、内标十九烷酸甲酯,美国Sigma公司。

DHG-9140A电热恒温鼓风干燥箱、SXL-1008程控箱式电炉,上海精宏实验设备有限公司; HH-4数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司; JK9830自动凯氏定氮仪,济南精锐分析仪器有限公司; UV1102 II 紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司; ThermoFisher Trace1310 ISQ气相色谱质谱联用仪、ThermoFisher U3000液相色谱仪,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大菱鲆样品前处理 取鲜活大菱鲆放血宰杀,去内脏后清洗干净,用刀沿大菱鲆背部和腹部脊柱方向从头到尾划开后,将鱼骨两边鱼片取下,在尾

部鱼肉和鱼皮分界处用刀割开,将鱼皮慢慢剥离,剔除鱼皮上残留的碎肉,然后按照图 1 进行分割,取背部、腹部、胸腔部、尾部、裙边和鱼皮备用。

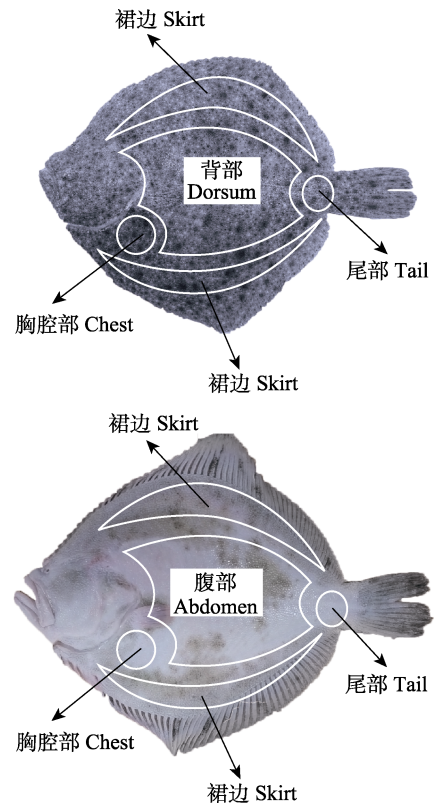


图 1 大菱鲆分割示意图
Fig.1 Segmentation of turbot

1.2.2 基本营养成分的测定 水分的测定参照国家食品安全标准 GB 5009.3-2016,直接干燥法;粗蛋白的测定参照 GB 5009.5-2016,凯氏定氮法;粗脂肪的测定参照 GB 5009.6-2016,索氏抽提法;灰分的测定参照 GB 5009.4-2016,550℃马弗炉灼烧法;每组样品做 3 个平行。

1.2.3 胶原蛋白含量的测定 参照 GB/T 9695.23-2008 测定鱼肉中的羟脯氨酸含量,鱼肉胶原蛋白的含量为羟脯氨酸的含量乘以 7.25(Goll *et al.*, 1963),每组样品做 3 个平行。

1.2.4 质构的测定 参照林婉玲等(2013)的方法略作修改。将样品切成 2 cm×2 cm×1 cm 规格,分别对背部、腹部、胸腔部和尾部进行上机测定,每组样品做 6 个平行。

1.2.5 氨基酸的测定 参照 GB 5009.124-2016 中的盐酸水解法测定除色氨酸外的 17 种氨基酸。在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值。

色氨酸的测定:称取适量鱼肉于10 ml水解管中,加入1.5 ml 5 mol/L的LiOH,通入高纯氮气,拧紧瓶盖,110℃水解16 h。取出冷却后,用6 mol/L盐酸进行中和,定容至50 ml,过0.22 μm滤膜后上机检测。在重复性条件下获得的2次独立测定结果的算术平均值。

色谱条件 色谱柱: C₁₈(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.00±0.05)=10: 90; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μl; 柱温: 32℃; 紫外检测波长: 280 nm。

1.2.6 脂肪酸的测定 分别取80 mg鱼肉于15 ml离心管中,加入2 ml 5%盐酸甲醇溶液,3 ml 氯仿甲醇溶液(体积比1: 1)以及100 μl 十九烷酸甲酯内标,85℃水浴1 h,冷却至室温后,加入1 ml 正己烷,震荡2 min,静置萃取1 h。取上清液100 μl,用正己烷定容到1 ml。过0.45 μm滤膜后上机检测。在重复性条件下获得的2次独立测定结果的算术平均值。

色谱条件 色谱柱: TG-5MS(30.00 m×0.25 mm×0.25 μm); 升温程序: 80℃保持1 min,以10℃/min的速率升温至200℃,继续以5℃/min的速率升温至250℃,最后以2℃/min的速率升到270℃,保持3 min; 进样口温度: 290℃; 载气流速: 1.2 ml/min; 不分流进样,开阀时间1 min; 进样体积: 1 μl。

质谱条件 离子源温度: 280℃; 传输线温度: 280℃; 溶剂延迟时间: 5 min; 扫描范围: 30~400 amu; 离子源: EI源70 eV。

1.2.7 蛋白质营养价值评价 根据FAO/WHO建议的氨基酸评分标准模式和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白的氨基酸模式(姜启兴等,2014; 赵亭亭等,2018),分别按公式(2)~(4)计算氨基酸评分(Amino acid score, AAS)、化学评分(Chemical score, CS)和必需氨基酸指数(Essential amino acid index, EAAI)。

$$AAS = \frac{\text{试验蛋白质氨基酸含量(mg/gN)}}{\text{FAO/WHO评分模式氨基酸含量(mg/gN)}} \quad (2)$$

$$CS = \frac{\text{试验蛋白质氨基酸含量(mg/gN)}}{\text{鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/gN)}} \quad (3)$$

$$EAAI = \left(\frac{100a}{ae} \times \frac{100b}{be} \times \frac{100c}{ce} \times \dots \times \frac{100j}{je} \right)^{1/n} \quad (4)$$

公式(4)中: n 为必需氨基酸个数; a 、 b 、 c ... j 为样品蛋白质的必需氨基酸含量; ae 、 be 、 ce ... je 为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量。

1.3 数据分析

采用SPSS 18.0和origin 8.5软件对数据统计分析和作图,数据分析采用方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析, $P>0.05$ 为差异性不显著, $P<0.05$ 为差异性显著, $P<0.01$ 为差异性极显著。

2 结果与讨论

2.1 大菱鲆不同部位的基本营养成分

由表1可知,大菱鲆各部位总重占体重的53.76%,其中背部所占比例最高为16.95%,然后依次为腹部、鱼皮、裙边、胸腔部和尾部,分别为14.84%、9.62%、6.26%、3.43%和2.66%。从表1中还可以看出,大菱鲆不同部位的基本营养成分含量不同,整体来说,背部、腹部、胸腔部与尾部的成分比较接近,而裙边和鱼皮与其他部位成分差别较大。就粗蛋白而言,鱼皮的含量最高,为29.14%,然后依次为腹部(18.96%)、背部(18.76%)、尾部(18.39%)、胸腔部(17.91%)和裙边(12.99%)。裙边的粗脂肪含量为17.47%,明显高于其他部位($P<0.01$),为其他部位的3.38~14.2倍,这是大菱鲆裙边口感爽滑,口味香醇的主要原因。鱼皮中粗脂肪含量也较高,为5.17%,远高于鲛鱈鱼(*Lophius litulon*)皮(0.37%) (陈小娥等,2007)、军曹鱼(*Rachycentron*

表1 大菱鲆不同部位占体重比例和基本营养成分(湿重, %)

Tab.1 Proportion in body weight and essential nutrients of different parts of turbot (Wet weight, %)

部位 Part	占体重比例 Proportion in body weight	水分 Moisture	粗脂肪 Fat	粗蛋白 Protein	灰分 Ash
背部 Dorsum	16.95±0.42	78.28±0.10 ^d	1.24±0.08 ^a	18.76±0.21 ^d	1.29±0.03 ^c
腹部 Abdomen	14.84±0.28	77.43±0.21 ^c	1.88±0.10 ^b	18.96±0.10 ^d	1.28±0.02 ^c
胸腔部 Chest	3.43±0.27	77.25±0.18 ^c	2.74±0.14 ^c	17.91±0.25 ^b	1.26±0.02 ^c
尾部 Tail	2.66±0.24	78.49±0.13 ^d	1.23±0.06 ^a	18.39±0.11 ^c	1.27±0.01 ^c
裙边 Skirt	6.26±0.31	69.26±0.50 ^b	17.47±0.15 ^e	12.99±0.34 ^a	0.88±0.01 ^b
鱼皮 Skin	9.62±0.32	66.27±0.34 ^a	5.17±0.23 ^d	29.04±0.72 ^e	0.78±0.01 ^a

注: 同行数据上标不同英文字母表示有显著性差异($P<0.05$), 下同

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

canadum)皮(1.57%) (杨树奇等, 2010)和罗非鱼(*Oreochromis*)皮(1.56%) (叶小燕等, 2008), 主要因为大菱鲆属于冷水鱼类, 皮下聚集较多的脂肪有利于御寒和耐低氧的缘故(姜晓东等, 2015; Wu *et al*, 2015)。对于水分来说, 尾部的水分含量最高, 为78.49%, 其次为背部(78.28%), 但二者差异不显著($P>0.05$), 而裙边和鱼皮的水分含量较低, 分别为69.26%和66.27%, 除鱼皮(0.78%)和裙边(0.88%)外, 其他各部位灰分含量差异性不显著($P>0.05$), 含量在1.26%~1.29%之间。研究结果显示, 大菱鲆不同部位的基本营养成分存在一定的差异, 其中裙边和鱼皮与肌肉的差异最为明显, 可为其分割加工利用提供一定的参考。

2.2 大菱鲆不同部位的胶原蛋白含量

胶原蛋白是生物体内一种重要的蛋白质, 也是结缔组织的主要组成成分, 具有美容养颜、补充氨基酸、提高机体免疫力以及预防心血管疾病等生理功效(王忠稳等, 2013)。从图2中可以看出, 大菱鲆鱼皮胶原蛋白含量最高, 为224.69 mg/g, 占粗蛋白含量的77.37%, 高于大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*) (214.2 mg/g)

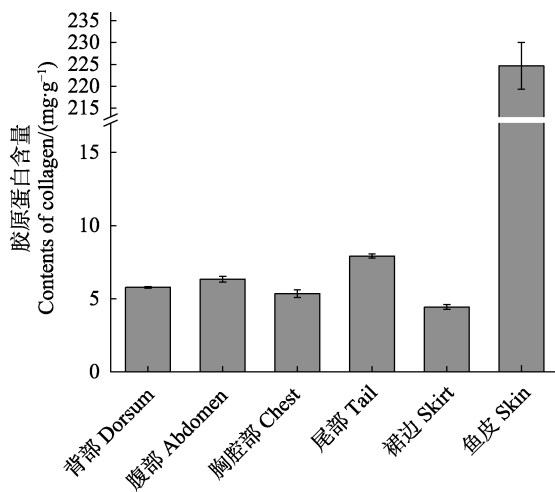


图 2 大菱鲆不同部位的胶原蛋白含量

Fig.2 Contents of collagen in different parts of turbot

(姜晓东等, 2015)、安康鱼(211 mg/g) (陈小娥等, 2007)、军曹鱼(200.9 mg/g)和罗非鱼(206.5 mg/g) (杨树奇等, 2010), 与脆化鲩(*Ctenopharyngodon idellus*) (229.9 mg/g) (刘邦辉等, 2012)和金枪鱼(*Thunnus thynnus*)(226.4 mg/g) (杨树奇等, 2010)相近, 可见大菱鲆鱼皮中胶原蛋白含量较丰富, 可以作为制备胶原蛋白的原料。然后依次为尾部、腹部、背部、胸腔部和裙边, 含量分别为7.92、6.34、5.78、5.34和4.44 mg/g。尾部胶原蛋白含量较高可能是由于鱼尾部运动较多, 结缔组织相对发达的缘故。Sato 等(1986)研究表明, 胶原蛋白对肌肉结构、强度以及鱼类运动等方面均起着重要作用。

2.3 大菱鲆不同部位肌肉的质构特性

质构能反映水产品的硬度、弹性以及咀嚼性, 是水产品品质评判的重要指标。质构剖面分析法 TPA(Texture profile analysis)通过模拟人口腔咀嚼运动, 对水产品施加压力而反映出的一系列质构特性。由表 2 可知, 胸腔部肌肉的硬度、咀嚼性和弹性显著高于背部、腹部和尾部。研究表明, 质构仪分析指标中的硬度和弹性与感官分析指标具有显著相关性, 硬度较大, 弹性较强的鱼肉, 其口感会更好(Monaco *et al*, 2008; 林婉玲等, 2013; 文平等, 2015)。所以胸腔部肌肉的口感更佳。腹部肌肉的硬度和咀嚼性高于尾部和背部, 然而尾部肌肉的弹性高于背部和腹部, 主要是鱼尾部运动较多, 肌肉较发达, 肌原纤维蛋白和基质蛋白含量较高, 而肌原纤维蛋白中的肌动蛋白和肌球蛋白以及肌基质蛋白中的弹性蛋白含量越高, 鱼肉的弹性越大(熊铭等, 2016)。从表 2 中还可以看出, 各部位间内聚性差异不显著($P>0.05$)。

2.4 大菱鲆不同部位的氨基酸组成

蛋白质是大菱鲆的主要营养物质, 蛋白质的营养价值是由氨基酸组成与必需氨基酸含量所决定的(Usyduš *et al*, 2008)。由表 3 可知, 大菱鲆各个部位中氨基酸种类一致, 共 18 种氨基酸, 包括 8 种必需氨基酸和 10 种非必需氨基酸, 但不同部位中各种氨

表 2 大菱鲆不同部位肌肉的质构特性

Tab.2 Texture characteristics of muscle in different parts of turbot

指标 Index	背部 Dorsum	腹部 Abdomen	胸腔部 Chest	尾部 Tail
硬度 Hardness(g)	4795.25±108.19 ^b	4807.85±107.59 ^b	5293.15±207.26 ^c	4396.92±227.79 ^a
咀嚼性 Chewiness(g)	470.12±8.66 ^b	496.76±16.89 ^c	536.14±13.56 ^d	443.32±13.92 ^a
内聚性 Cohesiveness	0.728±0.011 ^a	0.731±0.008 ^a	0.738±0.009 ^a	0.729±0.012 ^a
弹性 Elasticity	0.828±0.013 ^a	0.853±0.006 ^b	0.925±0.009 ^d	0.887±0.015 ^c

表3 大菱鲆不同部位氨基酸组成(干重, g/100 g)
Tab.3 Amino acid composition in different parts of turbot (Dry weight, g/100 g)

氨基酸 Amino acid	背部 Dorsum	腹部 Abdomen	胸腔部 Chest	尾部 Tail	裙边 Skirt	鱼皮 Skin
赖氨酸 Lys*	7.05	7.46	6.89	7.23	4.26	3.26
苯丙氨酸 Phe*	3.20	2.89	2.96	3.06	1.66	1.63
蛋氨酸 Met*	2.27	2.24	2.26	2.18	1.60	1.54
苏氨酸 Thr*	3.47	3.63	3.15	3.18	1.88	2.08
异亮氨酸 Ile*	4.13	4.68	4.19	4.48	2.21	1.39
亮氨酸 Leu*	6.72	6.83	6.27	6.28	4.03	2.70
缬氨酸 Val*	3.72	3.56	3.68	3.74	2.20	2.05
色氨酸 Trp*	0.92	1.03	0.94	0.87	0.62	0.21
天冬氨酸 Asp [△]	8.46	9.46	8.61	9.01	6.36	4.45
谷氨酸 Glu [△]	11.87	11.76	11.61	12.22	8.62	6.61
半胱氨酸 Cys	1.38	1.17	1.39	1.32	0.66	1.13
丝氨酸 Ser	3.65	3.19	3.60	3.26	2.28	2.99
甘氨酸 Gly [△]	2.89	3.28	2.90	2.99	1.96	10.50
组氨酸 His	0.40	0.47	0.41	0.41	0.28	1.19
精氨酸 Arg	4.84	4.61	4.87	4.59	2.46	4.71
丙氨酸 Ala [△]	4.54	4.56	4.50	4.61	3.45	5.93
脯氨酸 Pro	3.35	3.18	3.53	3.71	1.98	5.28
酪氨酸 Tyr	2.99	2.41	2.94	2.58	1.80	1.10
EAA	31.48	32.32	30.34	31.02	18.46	14.85
NEAA	44.37	44.09	44.36	44.70	29.85	43.88
DAA	27.76	29.06	27.62	28.83	20.39	27.48
TAA	75.85	76.41	74.70	75.72	48.31	58.73
EAA/TAA(%)	41.50	42.30	40.62	40.97	38.21	25.29
EAA/NEAA(%)	70.95	73.30	68.39	69.40	61.84	33.85

注: *为必需氨基酸; [△]为鲜味氨基酸; EAA 为必需氨基酸总量; DAA 为鲜味氨基酸总量; NEAA 为非必需氨基酸总量; TAA 为氨基酸总量

Note: *: Essential amino acids; [△]: Delicious amino acids; EAA: Total essential amino acids; DAA: Total delicious amino acids; NEAA: Total non-essential amino acids; TAA: Total amino acids

氨基酸的含量存在一定差异。其中背部、腹部、胸腔部、尾部和裙边均为谷氨酸的含量最高,其次是天冬氨酸和赖氨酸;鱼皮中甘氨酸含量最高,其次为谷氨酸。谷氨酸是重要的鲜味氨基酸,并且参与多种生理活性物质的合成(王娟, 2013);赖氨酸是人乳中的第一限制性氨基酸,被喻为“生长性氨基酸”(徐革锋等, 2014),在谷物中赖氨酸也是第一限制性氨基酸。大菱鲆肌肉中赖氨酸含量较高,因此食用大菱鲆可以弥补膳食赖氨酸的不足。

食物鲜味的呈现主要取决于甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸和天冬氨酸4种氨基酸含量的高低。除鱼皮是甘氨酸外,其余部位中鲜味氨基酸含量最高的均为谷氨酸。就总鲜味氨基酸而言,腹部的含量最高(29.06 g/100 g),然后依次为尾部(28.83 g/100 g)、背部(27.76 g/100 g)、胸腔部(27.62 g/100 g)、鱼皮

(27.48 g/100 g)和裙边(20.39 g/100 g),表明大菱鲆腹部的味道更为鲜美。从总氨基酸来看,不同部位总氨基酸含量的高低顺序腹部>背部>尾部>胸腔部>鱼皮>裙边,分别为76.41、75.85、75.72、74.70、58.73和48.31 g/100 g。大菱鲆鱼皮中必需氨基酸与总氨基酸的比值为25.29%,必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为33.85%;其他部位的必需氨基酸与氨基酸总量的比值为38.21%~42.3%,必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为61.84%~73.3%。根据FAO/WHO的理想模式,质量较好的蛋白质EAA/TAA为40%左右,EAA/NEAA在60%以上。可见大菱鲆背部、腹部、胸腔部、尾部和裙边的氨基酸组成均符合理想模型要求,均属于优质蛋白;而鱼皮并不属于传统营养学的优质蛋白,可以通过深加工制备胶原蛋白等产品,提高其附加价值。

大菱鲆不同部位的必需氨基酸含量如表 4 所示, 大菱鲆背部、腹部、胸腔部、尾部和裙边的必需氨基酸总量为 2507~2834 mg/g N, 均高于 FAO/WHO 标准 (2250 mg/g N), 但低于鸡蛋蛋白标准 (3096 mg/g N), 而鱼皮中必需氨基酸总量较低 (1240 mg/g N), 均低于 FAO/WHO 标准和鸡蛋蛋白标准。从表 5 可以看出, 以 CS 为标准进行评判时, 背部、腹部、胸腔部和裙边的第一限制氨基酸和第二限制氨基酸相同, 分别为 Met+Cys 和 Val; 尾部和鱼皮的第一限制氨基酸分别为 Met+Cys 和 Trp, 而第二限制氨基酸分别为 Trp 和 Ile。以 AAS 为标准进行评判时, 鱼皮的第一限制氨基酸为 Trp, 第二限制氨基酸为 Ile, 而其余部位的第一限制氨基酸均为 Met+Cys, 第二限制氨基酸为 Val。EAAI 可以表征食物中必需氨基酸组成与标准蛋白质的相似程度 (Adeyeye, 2012), 大菱鲆裙边的 EAAI 为 85.22, 与标准蛋白质更为相近, 然后依次为胸腔部 (81.78)、腹部 (79.77)、尾部 (76.38) 和背部 (76.24), 而

鱼皮的 EAAI 较低, 仅为 35.66, 与标准蛋白质差距较大。从氨基酸角度评价, 除鱼皮外, 大菱鲆其余部位的必需氨基酸含量丰富, 营养价值较高。

2.5 大菱鲆不同部位的脂肪酸组成

从表 6 中可以看出, 大菱鲆裙边脂肪酸种类最为丰富, 共检测出 27 种脂肪酸; 胸腔部次之, 共检测出 20 种脂肪酸; 背部最少, 仅检测出 13 种脂肪酸。其中各部位检测出饱和脂肪酸 (Saturated fatty acid, SFA) 4~12 种, 含量为 9.64~59 mg/g; 单不饱和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acid, MUFA) 4~7 种, 含量为 4.84~46.84 mg/g; 多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) 5~8 种, 含量为 31.28~212.25 mg/g。就饱和脂肪酸而言, 裙边>鱼皮>胸腔部>腹部>背部>尾部, 其中含量最高的饱和脂肪酸均为棕榈酸, 其次为硬脂酸。裙边的单不饱和脂肪酸含量最高, 为 46.84 mg/g, 然后依次为鱼皮 (33.1 mg/g)、胸腔部

表 4 大菱鲆不同部位必需氨基酸含量 (mg/g N)
Tab.4 Contents of essential amino acids in different parts of turbot (mg/g N)

氨基酸 Amino acid	背部 Dorsum	腹部 Abdomen	胸腔部 Chest	尾部 Tail	裙边 Skirt	鱼皮 Skirt	FAO/WHO	鸡蛋蛋白 Egg protein
苏氨酸 Thr	251	270	258	258	278	151	250	292
缬氨酸 Val	269	265	292	269	297	149	310	441
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	177	179	195	187	146	194	220	386
异亮氨酸 Ile	299	348	333	322	327	101	250	331
亮氨酸 Leu	486	508	498	488	552	196	440	534
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	448	394	468	406	512	198	380	565
赖氨酸 Lys	510	555	547	520	630	237	340	441
色氨酸 Trp	67	77	75	63	92	15	60	106
总计 Total	2507	2597	2665	2512	2834	1240	2250	3096

表 5 大菱鲆不同部位氨基酸评分和化学评分
Tab.5 AAS and CS in different parts of turbot

氨基酸 Amino acid	背部 Dorsum		腹部 Abdomen		胸腔部 Chest		尾部 Tail		裙边 Skirt		鱼皮 Skin	
	CS	ASS	CS	ASS	CS	ASS	CS	ASS	CS	ASS	CS	ASS
苏氨酸 Thr	0.86	1.00	0.92	1.08	0.88	1.03	0.88	1.03	0.95	1.11	0.52	0.60
缬氨酸 Val	0.61	0.87	0.60	0.85	0.66	0.94	0.61	0.87	0.67	0.96	0.34	0.48
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.46	0.81	0.46	0.82	0.50	0.88	0.48	0.85	0.38	0.67	0.50	0.88
异亮氨酸 Ile	0.90	1.20	1.05	1.39	1.00	1.33	0.97	1.29	0.99	1.31	0.31	0.40
亮氨酸 Leu	0.91	1.11	0.95	1.15	0.93	1.13	0.91	1.11	1.03	1.25	0.37	0.45
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	0.79	1.18	0.70	1.04	0.83	1.23	0.72	1.07	0.91	1.35	0.35	0.52
赖氨酸 Lys	1.16	1.50	1.26	1.63	1.24	1.61	1.18	1.53	1.43	1.85	0.54	0.70
色氨酸 Trp	0.63	1.11	0.72	1.28	0.70	1.24	0.59	1.04	0.87	1.53	0.14	0.25
必需氨基酸指数 EAAI	76.24		79.77		81.78		76.38		85.22		35.66	

表6 大菱鲆不同部位脂肪酸组成(干重, mg/g)
Tab.6 Fatty acid composition in different parts of turbot (Dry weight, mg/g)

脂肪酸 Fatty acid	背部 Dorsum	腹部 Abdomen	胸腔部 Chest	尾部 Tail	裙边 Skirt	鱼皮 Skin
月桂酸 C12:0	-	-	-	-	0.16	-
十三烷酸 C13:0	-	-	-	-	0.13	-
肉豆蔻酸 C14:0	0.42	1.30	1.87	0.56	3.62	5.63
十五烷酸 C15:0	-	0.16	0.39	-	1.31	0.69
棕榈酸 C16:0	7.18	10.28	15.62	6.87	44.72	21.14
十七烷酸 C17:0	0.12	0.25	0.56	0.15	1.88	0.42
硬脂酸 C18:0	2.32	2.30	3.26	2.06	3.99	3.08
花生酸 C20:0	-	0.14	0.23	-	1.14	0.24
二十一碳酸 C21:0	-	-	-	-	0.19	-
山嵛酸 C22:0	-	-	-	-	0.80	-
二十三碳酸 C23:0	-	-	-	-	0.25	-
二十四烷酸 C24:0	-	-	-	-	0.81	-
ΣSFA	10.05	14.42	21.93	9.64	59.00	31.21
肉豆蔻烯酸 C14:1	-	-	-	-	0.27	0.12
棕榈油酸 C16:1	0.69	1.89	1.89	0.93	10.40	10.44
十七烯酸 C17:1	-	0.12	0.15	-	0.94	-
油酸 C18:1	3.52	8.08	8.06	4.25	19.53	17.40
二十碳烯酸 C20:1	0.44	1.08	1.76	0.61	5.44	3.23
芥酸 C22:1	0.18	0.76	0.86	0.31	8.28	0.96
神经酸 C24:1	-	0.23	0.23	-	1.97	0.96
ΣMUFA	4.84	12.15	12.95	6.11	46.84	33.10
亚油酸 C18:2n6	7.71	16.69	18.31	8.96	107.26	3.65
亚麻酸 C18:3n6	-	-	0.12	-	0.69	1.92
二十碳二烯酸 C20:2n6	0.49	1.24	1.88	0.64	7.79	0.62
顺-11,14,17-二十碳三烯酸 C20:3n3	-	-	0.19	-	0.63	0.57
顺-8,11,14-二十碳三烯酸 C20:3n6	-	0.23	0.24	0.10	2.11	-
花生四烯酸 C20:4n6	0.82	1.01	1.19	0.80	2.76	0.79
二十碳五烯酸 C20:5n3	4.25	6.41	8.00	4.39	26.61	8.42
二十二碳六烯酸 C22:6n3	18.00	21.14	24.45	16.65	64.39	31.72
ΣPUFA	31.28	46.72	54.38	31.54	212.25	47.69
Σn-3PUFA	22.26	27.55	32.64	21.04	91.63	40.71
Σn-6PUFA	9.02	19.17	21.74	10.50	120.62	6.97
ΣPUFA/ΣSFA	3.11	3.24	2.48	3.27	3.60	1.53
Σn-6PUFA/Σn-3PUFA	0.41	0.70	0.67	0.50	1.32	0.17

注: -为未检出; ΣSFA为总饱和脂肪酸; ΣMUFA为总单不饱和脂肪酸; ΣPUFA为总不饱和脂肪酸; Σn-3PUFA为总n-3多不饱和脂肪酸; Σn-6PUFA为总n-6多不饱和脂肪酸

Note: -: Not detected; ΣSFA: Total saturated fatty acid; ΣMUFA: Total monounsaturated fatty acid; ΣPUFA: Total polyunsaturated fatty acids; Σn-3PUFA: Total n-3 polyunsaturated fatty acid; Σn-6PUFA: Total n-6 polyunsaturated fatty acid

(12.95 mg/g)、腹部(12.15 mg/g)、尾部(6.11 mg/g)和背部(4.84 mg/g), 主要单不饱和脂肪酸均为油酸。对多不饱和脂肪酸来说, 裙边的含量最高, 为212.25 mg/g, 为其他部位的3.90~6.78倍, 其中亚油酸最为丰富, 为107.26 mg/g, 然后为DHA(64.39 mg/g)

和EPA(26.61 mg/g), 而背部、腹部、胸腔部和尾部中多不饱和脂肪酸含量顺序为DHA>亚油酸>EPA。

研究认为, 亚油酸可使胆固醇脂化, 从而降低血清和肝脏中的胆固醇水平, 对糖尿病也有预防作用(姜启兴等, 2014); DHA和EPA已被誉为人物生长发

育所必需的脂肪酸,具有降血脂、提高视力、健全大脑发育、增强免疫、降低心血管疾病发生率等多项生理功能(Siriwadhana *et al.*, 2012; Brenna *et al.*, 2014)。大菱鲆各部位n-3系列多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)含量为21.04~91.63 mg/g, n-6系列多不饱和脂肪酸(n-6 PUFA)为6.97~120.62 mg/g, 背部、腹部、胸腔部、尾部、裙边和鱼皮的 Σ n-6 PUFA与 Σ n-3PUFA的比值为分别为0.41、0.7、0.67、0.5、1.32和0.17, 远低于英国卫生部推荐的最大安全上限(4.0)。而 Σ PUFA与 Σ SFA的比值分别为为3.11、3.24、2.48、3.27、3.6和1.53, 亦高于英国卫生部推荐的最低限值(0.45)(许建和等, 2013), 因此大菱鲆脂肪酸组成符合食品健康要求, 具有较高的营养价值。

3 结论

大菱鲆不同部位间营养品质特性存在明显差异,可以根据其不同部位的组成特点加以开发利用,以提高大菱鲆产品的附加值。具体来说,背部和腹部肌肉的氨基酸总量、必需氨基酸含量、鲜味氨基酸含量、EAA/TAA和EAA/NEAA较高,氨基酸组成符合FAO/WHO的理想模式,适合作为补充人体蛋白质的优质蛋白源。裙边肌肉中脂肪酸的种类最多、含量最丰富,多不饱和脂肪酸含量尤为丰富,达212.25 mg/g,为其他部位的3.9~6.76倍,主要成分为亚油酸、DHA和EPA,可以作为生产鱼油的优质原料。鱼皮的粗蛋白和胶原蛋白含量最高,分别为29.04%和224.69 mg/g,可以通过深加工制备胶原蛋白等产品,提高其附加价值。

参 考 文 献

- Adeyeye EI. Evaluation of the amino acid profile of the yolk and albumen of guinea fowl (*Numida meleagris*) egg. *Elixir Appl Biology*, 2012, 47: 8799–8803
- Altundag MS, Tiril SU, Ozdemir A. Effects of safflower oil supplementation in diet on growth performance and body fatty acid composition of turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture International*, 2014, 22(2): 597–605
- Brenna JT, Carlson SE. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *Journal of Human Evolution*, 2014, 77: 99–106
- Chen XE, Fang XB, Zhong YQ. Research of collagen extraction from *Lophius litulon* skin. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(3): 131–133 [陈小娥, 方旭波, 钟秋琴. 安康鱼皮中胶原蛋白的提取工艺研究. *食品工业科技*, 2007, 28(3): 131–133]
- Dai WW, Mai KS, Xu W, *et al.* Effects of lysine-arginine interaction on growth performance, body composition, and muscle amino acid levels of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 876–887 [代伟伟, 麦康森, 徐玮, 等. 饲料中赖氨酸和精氨酸含量对大菱鲆幼鱼生长、体成分和肌肉氨基酸含量的影响. *水产学报*, 2015, 39(6): 876–887]
- Goll DE, Bray RW, Hoekstra WG. Age-associated changes in muscle composition. The isolation and properties of a collagenous residue from bovine muscle. *Journal of Food Science*, 1963, 28(5): 503–509
- Ham EHV, Berntssen MHG, Imsland AK, *et al.* The influence of temperature and ration on growth, feed conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 2003, 217(1): 547–558
- Jiang QX, Wu JR, Xu YS, *et al.* Composition analysis and nutritional evaluation of different parts of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Food Science*, 2014, 35(5): 183–187 [姜启兴, 吴佳芮, 许艳顺, 等. 鳊鱼不同部位的成分分析及营养评价. *食品科学*, 2014, 35(5): 183–187]
- Jiang XD, Li HY, Wang Y, *et al.* The analysis of nutrient components of *Oncorhynchus keta* skin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 145–150 [姜晓东, 李红艳, 王颖, 等. 大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)鱼皮的营养成分分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 145–150]
- Lei JL, Liang MQ, Liu XF, *et al.* A review of nutritional components and food value of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 112–115 [雷霖霖, 梁萌青, 刘新富, 等. 大菱鲆营养成分与食用价值研究概述. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 112–115]
- Li J, Wang XR, Liu HY, *et al.* Effect of modified atmosphere packaging on quality preservation of *Scophthalmus maximus* during cold storage. *Food Science*, 2016, 37(22): 313–317 [李敬, 王小瑞, 刘红英, 等. 气调包装对大菱鲆的冷藏保鲜效果. *食品科学*, 2016, 37(22): 313–317]
- Li TT, Liu JX, Xu YX, *et al.* Quality changes of *Scophthalmus maximus* during mini-freezing storage. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(7): 95–102 [李婷婷, 刘剑侠, 徐永霞, 等. 大菱鲆微冻贮藏过程中的品质变化规律. *中国食品学报*, 2014, 14(7): 95–102]
- Lin WL, Yang XQ, Li LH, *et al.* Research of relationship between texture and sensory evaluation of crisp grass carp. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(1): 1–7, 72 [林婉玲, 杨贤庆, 李来好, 等. 脆肉鲩质构与感官评价的相关性研究. *现代食品科技*, 2013, 29(1): 1–7, 72]
- Liu BH, Yu EM, Xie J, *et al.* Research of physicochemical characteristics of collagen from crisp grass carp skin and muscle and its influencing factors. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(2): 200–204 [刘邦辉, 郁二蒙, 谢骏, 等. 脆肉鲩鱼皮和肌肉胶原蛋白的理化特性及其影响因素研究. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 200–204]
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. *China fishery statistical yearbook*.

- Beijing: China Agricultural Press, 2018, 26 [农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018, 26]
- Monaco RD, Cavella S, Masi P. Predicting sensory cohesiveness, hardness and springiness of solid foods from instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*, 2008, 39(2): 129–149
- Sato K, Yoshinska R, Sato M, *et al.* Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific*, 1986, 52(9): 1595–1600
- Siriwadhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2012, 65: 211–222
- Usyduš Z, Szlinder-Richert J, Polak-Juszczak L, *et al.* Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. *Food Chemistry*, 2008, 111(3): 556–563
- Wang CL, Guo XH, Yuan DS, *et al.* Analysis on *Scophthalmus maximus* amino acids at different developing stages. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(1): 104–107 [王彩理, 郭晓华, 苑德顺, 等. 不同生长阶段大菱鲆的氨基酸评价分析. 现代食品科技, 2012, 28(1): 104–107]
- Wang J. Comparison of nutritional compositions in muscles of *Penaeus chinensis*, *Penaeus vannamei* Boone and *Penaeus japonicus* Bate. *Food Science and Technology*, 2013, 38(6): 146–150 [王娟. 中国对虾、南美白对虾和斑节对虾肌肉营养成分的比较. 食品科技, 2013, 38(6): 146–150]
- Wang ZW, Wang HB, Liang YP, *et al.* Isolation and characterization of collagens from skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and snakehead (*Channa argus*). *Food Science*, 2013, 34(17): 23–27 [王忠稳, 汪海波, 梁艳萍, 等. 乌鳢和草鱼鱼皮胶原蛋白的提取与理化性能分析. 食品科学, 2013, 34(17): 23–27]
- Wen P, Zhou YT, Yu YL, *et al.* Analysis of muscle quality variations among five different varieties of brindled *Monopterus albus*. *Food Science*, 2015, 36(20): 120–125 [文平, 周运涛, 喻亚丽, 等. 5 种不同花斑黄鳝肌肉品质的差异性分析. 食品科学, 2015, 36(20): 120–125]
- Wu JL, Zhang JL, Du XX, *et al.* Evaluation of the distribution of adipose tissues in fish using magnetic resonance imaging (MRI). *Aquaculture*, 2015, 448: 112–122
- Xiong M, Wu LZ, Lin XD. Meat quality characteristics of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) cultured under different aquaculture modes. *Food Science*, 2016, 37(3): 17–21 [熊铭, 吴祖亮, 林向东. 不同养殖模式斑石鲷的鱼肉品质特性分析. 食品科学, 2016, 37(3): 17–21]
- Xu GF, Wang YY, Bai QL, *et al.* Nutritional evaluation of amino acids in the muscle of *Lota lota*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2014, 27(2): 25–28 [徐革锋, 王裕玉, 白庆利, 等. 野生江鳕肌肉氨基酸含量及其营养评价. 水产学杂志, 2014, 27(2): 25–28]
- Xu JH, Qian J, Zou K, *et al.* Amino acid and fatty acid compositions and nutritional quality of muscle in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Food Science*, 2013, 34(15): 299–302 [许建和, 秦洁, 邹宽, 等. 漠斑牙鲆肌肉氨基酸和脂肪酸组成分析与营养品质评价. 食品科学, 2013, 34(15): 299–302]
- Yang SQ, Zeng SK, Zhou CX, *et al.* Analysis of proximate and amino acid composition of three fish skins. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(1): 97–100 [杨树奇, 曾少葵, 周春霞, 等. 3 种鱼皮的基本成分及氨基酸组成分析. 广东海洋大学学报, 2010, 30(1): 97–100]
- Ye XY, Zeng SK, Yu WG, *et al.* Study on nutrient components and the extracting condition of the skin gelatin of tilapia. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(5): 55–60 [叶小燕, 曾少葵, 余文国, 等. 罗非鱼皮营养成分分析及鱼皮明胶提取工艺的探讨. 南方水产, 2008, 4(5): 55–60]
- Zeng L, Lei JL, Liu B, *et al.* Effects of salinities on growth and flesh quality of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1535–1541 [曾霖, 雷霖霖, 刘滨, 等. 盐度对大菱鲆幼鱼生长和肌肉营养成分的影响. 水产学报, 2013, 37(10): 1535–1541]
- Zhang KK, Ai QH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary hydroxyproline on growth performance, body composition, hydroxyproline and collagen concentrations in tissues in relation to prolyl 4-hydroxylase α (I) gene expression of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. fed high plant protein diets. *Aquaculture*, 2013, 404–405: 77–84
- Zhao TT, Zhang Y, Chen C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 89–96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 89–96]

(编辑 陈辉)

Analysis and Evaluation of Nutrition and Texture Quality in Different Parts of Turbot (*Scophthalmus maximus*)

ZOU Zhaoyang^{1,2}, ZHAO Feng¹, WANG Zhi¹, OU Shuai^{1,2},
WANG Hong³, LI Guodong⁴, ZHOU Deqing^{1①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory of Marine Drugs and Bioproducts Products, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Penglai Huiyang Food Co., Ltd, Yantai 264000; 4. Qingdao Yihexing Foods Co., Ltd., Qingdao 266000)

Abstract Turbot is internationally recognized as a high-value edible fish and has become one of the important farmed fish in the northern coast of China; however, its nutritional quality still lacks comprehensive evaluation, and its deep processing rate is too low. To provide fundamental data for the segmentation processing of turbot, the nutritional components, content of collagen, amino acid, fatty acid, and texture characteristics of different parts of turbot, including the dorsum, abdomen, chest, tail, skirt, and skin, were determined. Meanwhile, the nutritional value was also evaluated. The results showed that there were differences in crude protein content from different parts, among which crude protein content of skin was the highest (29.04%) and that of skirt was the lowest (12.99%), both of which were significantly different from that of the other parts ($P<0.01$): the crude protein content from the dorsum, abdomen, chest and tail was 18.76%, 18.96%, 17.91%, and 18.39%, respectively. The maximum fat content in the skirt was as high as 17.47%, containing the most types of fatty acids (27 kinds), and reached 318.09 mg/g; Polyunsaturated fatty acid (PUFA) was 3.90 to 6.76 times as much as that of the other parts, among which linoleic acid content was the highest (107.26 mg/g), followed by docosahexaenoic acid (DHA) (64.39 mg/g) and eicosapentaenoic acid (EPA) (26.61 mg/g). The skin had the highest level of 224.69 mg/g in collagen ($P<0.01$), which could be used as a raw material to produce collagen. A total of 18 amino acids were detected in all parts of the turbot. The main limiting amino acids in the dorsum, abdomen, chest, tail, and skirt were all methionine (Met) and cysteine (Cys), while the main limiting amino acid in the skin was tryptophan (Trp). In addition, except for the skin, amino acid compositions in other parts of the turbot were all in line with the ideal pattern described by FAO/WHO. Texture characteristics analysis showed that hardness, chewiness, and elasticity of the abdomen were significantly higher than those of the other parts ($P<0.05$), which had a better mouthfeel.

Key words *Scophthalmus maximus*; Different parts; Nutrition; Texture; Quality; Evaluation

① Corresponding author: ZHOU Deqing, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180818002

http://www.yykxjz.cn/

沈妮, 吴甜甜, 李苑, 江杨阳, 陈士国, 胡亚芹. 低温冷藏对带鱼肌肉蛋白的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 196–202
Shen N, Wu TT, Li Y, Jiang YY, Chen SG, Hu YQ. Effect of chilling storage on the muscle protein of hairtail. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 196–202

低温冷藏对带鱼肌肉蛋白的影响*



沈 妮 吴甜甜 李 苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹^①

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 馥莉食品研究院 智能食品加工技术与装备国家(地方)
联合实验室 农业农村部农产品产后处理重点实验室 农业农村部农产品营养功能评价实验室
浙江省农产品加工技术研究重点实验室 浙江大学宁波研究院 杭州 310058)

摘要 选取蛋白丰富、营养价值高的舟山大眼带鱼(*Trichiurus haumela*), 分别置于 0℃ 和 4℃ 冷藏条件下贮藏 15 d, 通过测定肌原纤维蛋白 TCA 可溶性肽含量、巯基含量、表面疏水性、Ca²⁺-ATPase 和 Mg²⁺-ATPase 活性等一系列可表征带鱼品质变化的理化指标, 同时结合全溶性蛋白、水溶性蛋白和高盐溶性蛋白的电泳图, 观察低温冷藏对带鱼肌肉蛋白的影响, 比较 2 种贮藏温度下鱼肉蛋白的氧化变性以及降解情况。实验结果显示, 在 0℃ 和 4℃ 条件下, 随着贮藏时间的延长, TCA 可溶性肽含量从 1.446 μmol/g 分别升至 6.717 和 7.595 μmol/g, 巯基含量从 38.15 μmol/g MP 降至 35.82 和 30.36 μmol/g MP, Ca²⁺-ATPase 活性从 0.99 U/mg prot 下降至 0.092 和 0.134 U/mg prot, Mg²⁺-ATPase 活性从 0.76 U/mg prot 下降至 0.199 和 0.125 U/mg prot, 表面疏水性先上升后下降, 但数值都高于新鲜样。这一系列理化指标数值的改变, 反映了 0℃ 和 4℃ 这 2 种冷藏条件不利于带鱼长期的贮藏, 随着贮藏时间的延长, 带鱼的蛋白氧化致使其新鲜度和品质都遭到破坏, 散发出异味, 以至于无法食用。从微观结构来看, 带鱼肌肉的全溶性蛋白和水溶性蛋白基本没有变化, 但肌原纤维蛋白逐渐降解, 也是导致鱼肉品质下降的原因之一。相对于 4℃ 冷藏条件, 相同的贮藏天数, 0℃ 冷藏条件下带鱼蛋白降解速率较慢, 鱼肉腐败程度较低。

关键词 带鱼; 冷藏; 肌原纤维蛋白; 理化指标; 降解

中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0196-07

舟山带鱼(*Trichiurus haumela*)是舟山渔场四大经济鱼类之一, 分布较广, 以东海产量最高(陈云龙等, 2013)。带鱼属于洄游性鱼类, 含有丰富的氨基酸、微量元素和 DHA 等, 营养价值高, 在市场上备受欢迎。带鱼对水压等生存条件比较敏感, 所以捕获后很快就会死亡。由于微生物以及内源性蛋白酶等共同作用, 新鲜的鱼非常容易腐败, 所以运输贮藏过程中的保鲜方法对鱼肉品质影响较大。目前已有的保鲜方法

为高压技术(Kouassi *et al*, 2007)、冷藏(Dileep *et al*, 2005)、冰库冻藏(Gallart-jornet *et al*, 2007)、生物保鲜剂(Prodpran *et al*, 2012)、电离辐射(Shi *et al*, 2015)和气调贮藏(Lund *et al*, 2007)等。其中, 低温贮藏是维持鱼类新鲜度的主要方法之一。低温可以减少细菌和酶的作用, 更好地保留带鱼肌肉蛋白的完整性和功能特性(Wang *et al*, 2003)。

肌肉氧化(Decker *et al*, 1993)一般包含脂肪氧化

* 国家自然科学基金面上项目(31671918)资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31671918)]. 沈 妮, E-mail: 289262364@qq.com

^① 通讯作者: 胡亚芹, 教授, E-mail: yqhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2018-08-18, 收修改稿日期: 2018-09-13

和蛋白氧化,通过改变风味、颜色、营养组成和质地等使食品品质下降。虽然脂肪氧化对蛋白氧化有一定的影响,但是无论脂质氧化是否发生,蛋白质氧化都会不可避免的发生。在特定的铁结合位点上过氧化氢产生了羟基自由基,并且导致酶活性和溶解度的下降,羰基、疏水性荧光度和蛋白水解度的增加以及氨基酸组成的变化(Meucci *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1990),这被 Stadtman 等(1991)称之为由特异性金属催化引起的蛋白质氧化。众所周知,蛋白质的水解、变性或降解是鱼肉腐败变质的一个主要原因,其完整性与带鱼肌肉组织的功能特性密切相关。其中,最主要的是鱼肉肌原纤维蛋白。肌原纤维蛋白的凝胶特性是被广泛关注的重要的蛋白功能特性,与羰基含量、巯基含量、持水力、表面疏水性和 ATPase 酶活等理化指标有关,对鱼肉质地有很大的影响(Haard, 1994)。肌球蛋白和肌动蛋白是组成肌原纤维蛋白的两大主要蛋白,也是主要的研究对象。影响鱼肉蛋白性质的因素有很多(Park *et al.*, 2006),例如鱼的品种、捕获季节、新鲜程度、运输和贮藏方式等。在带鱼储藏期间,由于鱼肉肌原纤维蛋白的变性、聚集、自溶和降解等,鱼肉蛋白会发生一系列的物理和化学变化(Lefevre *et al.*, 2007)。鱼类肌肉的感官特征、营养品质和质构特性等影响着鱼类被消费者接受的程度。鱼类鲜度与品质保持技术方面的研究具有重要意义。

本研究以新鲜舟山大眼带鱼为原料,在 0℃ 和 4℃ 条件下贮藏 15 d,测定了一系列理化指标,并结合蛋白电泳,比较了 2 种温度条件下带鱼肌原纤维蛋白的降解情况,探究低温冷藏对带鱼新鲜度及品质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜舟山大眼带鱼,购于浙江省舟山市沈家门水产码头。选取长度约 70 cm,厚度约 1.5 cm,腹部饱满,鳃色鲜红、眼球饱满、鳞片完整、体表光滑无黏液的新鲜带鱼,放入装有碎冰的泡沫盒中运回实验室。

Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、乙二胺四乙酸(EDTA)、NaCl、三氯乙酸(TCA)、1-苯奈氨-8-磺酸(ANS)、C₁₂H₂₅SO₄Na(SDS),均为分析纯;SDS-PAGE变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、10X Tris-甘氨酸(C₂H₅NO₂)电泳缓冲液(pH 8.3)、5X蛋白质加样缓冲液、RealBand蛋白预染Marker(宽范围、三色)、高灵敏快速考马斯亮蓝染色试剂盒,购自生工生物工程(上海)有限公司;总巯基测试盒(微板法)、ATP酶试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

UV-2550紫外分光光度计,日本岛津制作公司;电子天平BS223 S,北京赛多利斯仪器系统有限公司;FSH-2A可调高速均质机;六孔六温磁力搅拌水浴锅,金坛市良友仪器有限公司;制冰机,斯科茨曼制冰系统(上海)有限公司;L500台式低速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;TGL-18MS高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;漩涡混合器G2-38B,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;B-S/FACT系列天平,梅特勒托利多(上海)仪器有限公司;全波长酶标仪,赛默飞世尔科技公司;海尔冰箱BCD-186KB,青岛海尔股份有限公司;荧光分光光度计(型号Cary Eclipse),赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鱼肉处理 将新鲜带鱼拭干表面多余水分,以自封袋分装置于 0℃ 和 4℃ 条件下低温贮藏。

1.3.2 肌原纤维蛋白的提取 肌原纤维蛋白提取参考Lefevre等(2007)的方法,并进行适当修改。称取 3 g块状鱼肉,与30 ml缓冲液A(20 mmol/L磷酸盐缓冲液,含有100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.0)混合均匀,13000 r/min匀浆60 s,然后4℃、8000 r/min条件下离心10 min,弃上清液,将沉淀与15 ml缓冲液A混合均匀,重复洗涤2次,弃上清,最后沉淀中加入15 ml缓冲液B(25 mmol/L磷酸盐缓冲液,含有0.6 mol/L NaCl, pH 7.0),混合均匀,13000 r/min匀浆60 s充分溶解后置于冰上2 h,然后用双层纱布过滤,除去不溶性物质,滤液即为肌原纤维蛋白溶液。

1.3.3 指标测定 TCA-可溶性肽的测定参考Benjakul等(2003)的方法,并进行适当修改。称取 2 g块状鱼肉,加入 18 ml质量分数 5%的三氯乙酸(TCA),13000 r/min匀浆 60 s。均质后置于冰上 1 h,然后在 4℃、8000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液并稀释,Lowry法测定吸光度,以 μmol 酪氨酸/g 表示。

巯基含量的测定使用总巯基测试盒(微板法)测定,购于南京建成生物工程研究所。

表面疏水性的测定参照Kobayashi等(2017)的方法,略有改动。以1-苯奈氨-8-磺酸(ANS)作为荧光探针,用10 mmol/L磷酸盐缓冲液(含有0.6 mol/L NaCl, pH 6.0)稀释肌原纤维蛋白溶液,使其浓度在0.05~0.50 mg/ml。取4 ml稀释后的肌原纤维蛋白溶液,加入20 μl 8 mmol/L ANS溶液(pH 7.0),使用荧光分光光度计测定,激发波长374 nm,发射波长485 nm。以荧光强度与蛋白浓度作图,用曲线斜率表示肌原纤维蛋

白表面疏水性So。

Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 活性的测定使用 ATP 酶试剂盒测定, 购于南京建成生物工程研究所。

带鱼肌肉蛋白的提取和SDS-PAGE分析(Li *et al.*, 2014; 李艳青, 2013)。全蛋白的提取: 称取3 g块状鱼肉, 加入27 ml 50 g/L SDS (85℃), 均质5 min, 85℃恒温1 h, 然后4000 r/min离心20 min, 去除不溶物, 取上清液。

水溶性蛋白提取: 称取3 g块状鱼肉, 加入15 ml 双蒸水, 均质5 min, 然后在4℃、8000 r/min条件下离心15 min, 取上清液, 即为水溶性蛋白提取物。

低盐溶性蛋白提取: 向水提后的沉淀中加入15 ml低盐溶液(20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 15 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ PMSF, 5 mmol/L DTT, 3.4 mmol/L NaH_2PO_4 , 1.6 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 6.5), 均质5 min, 然后在4℃、8000 r/min条件下离心15 min, 取上清液, 即为低盐溶性蛋白提取物。

高盐溶性蛋白提取: 向提取低盐溶性蛋白后剩余的沉淀中加入15 ml高盐溶液(5 mmol/L EGTA, 15 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ PMSF, 5 mmol/L DTT, 100 mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, pH 8.5), 均质5 min, 然后在4℃、8000 r/min条件下离心15 min, 取上清液, 即为高盐溶性蛋白提取物。

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析肌肉蛋白的变化。将4 μl 样品(浓度为3 mg/ml)加到由5%浓缩凝胶和12%分离凝胶制成的聚丙烯酰胺凝胶上, 电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色, 然后凝胶用10%(v/v)乙酸和40%(v/v)乙醇混合液脱色, 观察蛋白条带。

2 结果与分析

2.1 冷藏过程中 TCA 可溶性肽含量变化

如图1所示, 带鱼在0℃、4℃冷藏条件下贮藏15 d, 带鱼中TCA可溶性肽含量呈上升趋势, 表明在贮藏过程中, 鱼肉蛋白降解, 肽键水解, 从而生成小分子肽。从图1中可以看出, 0~9 d TCA可溶性肽含量增长速率较快, 12~15 d趋于平缓, 可能是由于与蛋白降解相关的内源性蛋白酶含量逐渐稳定(Benjukul *et al.*, 2003)。除第9天外, 4℃贮藏的样品其TCA可溶性肽含量均高于0℃贮藏的样品, 表明0℃冷藏条件下带鱼蛋白降解速度相对缓慢。新鲜带鱼和贮藏15 d后带鱼的TCA可溶性肽的含量有显著差异($P < 0.05$), 而且4℃冷藏条件下的带鱼TCA可溶性肽的含量和贮藏时间有良好的线性关系, 相关系数 R^2 达到0.93。因此, TCA可溶性肽的含量变化可以作为评价冷藏过程中带

鱼的品质变化的指标之一, 这与李婷婷(2013)的研究结论基本一致。

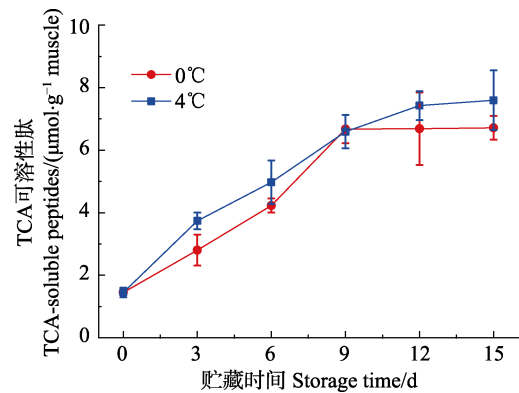


图1 带鱼在冷藏过程中 TCA-可溶性肽含量的变化
Fig.1 Changes in TCA-soluble peptides of hairtail during storage at 0℃ and 4℃

2.2 冷藏过程中鱼肉蛋白巯基含量变化

半胱氨酸残基中的巯基是所有蛋白质氨基酸残基中最活泼的基团, 在体内参加抗氧化、亚硝基化和巯基-二硫键交换等多种重要生理反应(田悦等, 2007)。如图2所示, 随着贮藏时间的延长, 0℃和4℃冷藏条件下带鱼肌原纤维蛋白的巯基含量呈现下降趋势。0~6 d和9~15 d, 4℃条件下巯基含量急剧下降, 可能是贮藏过程中肌球蛋白和肌动蛋白转换被阻断, 从而蛋白氧化速率加快(Wang *et al.*, 2003)。第9天, 巯基含量突然增加, 可能是由于内源性酶自溶作用或微生物作用使蛋白变性或分解而释放出的(Noguchi *et al.*, 1955; Wang *et al.*, 2003), 有报道(Benjukul, 1997)显示, 太平洋白鱼在冷藏条件下, 第2天肌原纤维蛋白的巯基含量也有所上升, 本研究的实验现象与其相似。通过比较发现 4℃条件下的样品巯基含量都低于 0℃条

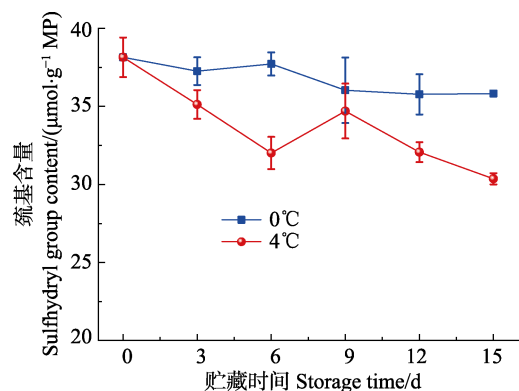


图2 带鱼在冷藏过程中巯基含量的变化
Fig.2 Changes in sulfhydryl group content of hairtail during storage at 0℃ and 4℃

件,这说明4℃条件下肌原纤维蛋白更易被氧化而变性,从而更多巯基的抗氧化作用削弱而被氧化,含量减少。

2.3 冷藏过程中鱼肉表面疏水性变化

蛋白质的表面疏水性可表征蛋白质的构象,衡量蛋白质的变性程度。通常认为蛋白质变性可提高蛋白质表面的疏水性,主要是因为埋藏在蛋白质空间构象内部的疏水性氨基酸残基的暴露引起的空间结构发生了改变(李艳青,2013)。如图3所示,0℃和4℃冷藏条件下带鱼肌原纤维蛋白的表面疏水性随着时间的延长而呈先上升后下降趋势,0~6 d显著升高($P < 0.05$),于第6天上升至最高值,而后第9天蛋白质表面疏水性急剧下降,9~15 d其数值在482.05~568.05间波动,但都高于新鲜带鱼的表面疏水性。有报道表明(Leelapongwattana *et al.*, 2005),蛋白质表面疏水性的降低可能是由于疏水作用使蛋白质表面的疏水基团相互作用,游离疏水基团减少,从而引起蛋白质的聚集。Leelapongwattana等(2005)在蛇鲭鱼的冻藏过程中发现了类似的现象。在相同的贮藏条件下,4℃贮藏条件下带鱼肌原纤维蛋白的表面疏水性高于0℃条件,表明相较于4℃,0℃贮藏条件减缓了鱼肉蛋白质氧化变性的速率,更能保持蛋白质的完整性。

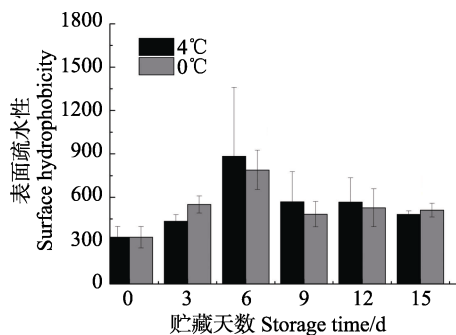


图3 带鱼在冷藏过程中表面疏水性的变化

Fig.3 Changes in surface hydrophobicity (S_o) of hairtail during storage at 0°C and 4°C

2.4 冷藏过程中鱼肉蛋白 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 活性变化

肌原纤维蛋白容易被溶酶体酶和钙激活的中性蛋白酶降解,从而影响ATP酶活性,因此,肌原纤维蛋白的降解可以通过ATP酶活性的变化间接测量。同时,ATP酶活性已被广泛用作肌原纤维蛋白完整性的量度,其中 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase活性分别表征肌球蛋白、肌动球蛋白的完整性(Benjukul, 1997)。有报道(Ouali *et al.*, 1981)表明, Ca^{2+} -ATPase活性下降可能与肌球蛋白水解有关。如图4、图5所示,在0℃

和4℃条件下贮藏15 d, Ca^{2+} -ATPase和 Mg^{2+} -ATPase活性逐渐下降,这与蛋白水解引起的肌原纤维蛋白降解有关(Kobayashi *et al.*, 2017)。0℃条件下样品的 Ca^{2+} -ATPase和 Mg^{2+} -ATPase活性高于4℃条件下的样品,表明贮藏温度越低,肌原纤维蛋白ATP酶活性下降越缓慢。贮藏到15 d时,0℃和4℃冷藏条件下, Ca^{2+} -ATPase和 Mg^{2+} -ATPase活性分别下降至0.092、0.134、0.199和0.125 U/mg prot,与新鲜样的ATPase酶活性相比较,显著下降($P < 0.05$)。Benjakul等(1997)认为冻藏期间,太平洋白鱼肌原纤维蛋白的 Ca^{2+} -ATPase活性降低和蛋白酶活性有关,尤其是组织蛋白酶。另外,也有报道(Benjukul *et al.*, 2003)指出冷藏条件下,蛇鲭鱼 Ca^{2+} -ATPase活性的降低,可能是由于肌钙蛋白的变性或降解,尤其是肌钙蛋白C,因为 Ca^{2+} -ATPase通过调节 Ca^{2+} 含量来影响肌原纤维蛋白的完整性。

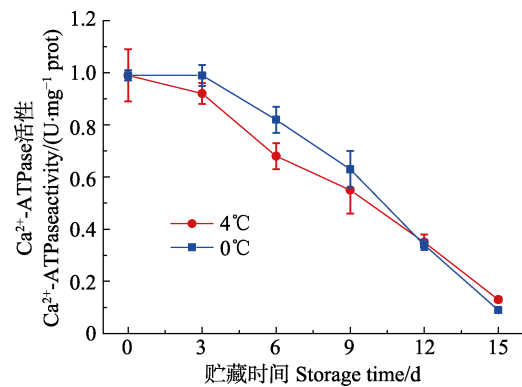


图4 带鱼在冷藏过程中 Ca^{2+} -ATPase活性的变化
Fig.4 Changes in Ca^{2+} -ATPase activity of hairtail during storage at 0°C and 4°C

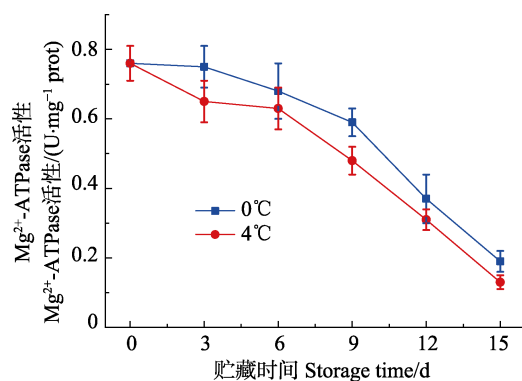


图5 带鱼在冷藏过程中 Mg^{2+} -ATPase活性的变化
Fig.5 Changes in Mg^{2+} -ATPase activity of hairtail during storage at 0°C and 4°C

2.5 冷藏过程中蛋白的SDS-PAGE条带变化

如图6所示, Real Band蛋白预染Marker左侧和右

侧分别是0℃和4℃冷藏条件下的全蛋白电泳图。从图6中可以看出,全蛋白SDS-PAGE条带分布较广,分子量基本在25~245 kDa范围内,以肌球蛋白重链(MHC)和肌动蛋白为主。在贮藏的15 d内,MHC条带基本没有变化,既没有新条带的产生,已有条带也没有明显的消失,表明提取的带鱼肉全蛋白没有显著降解或聚集。这与Li等(2014)对死后大黄鱼的蛋白质变化研究结果相似。报道的研究表明,出现此现象的原因可能是与全蛋白提取方法有关,MHC和肌动蛋白在5% SDS溶液中不能完全溶解。有研究证明,海鲈鱼亦有类似情况,即在贮藏期间肌球蛋白和肌动蛋白几乎没有变化(Verrez-Bagnis *et al*, 2001)。说明在低温冷藏条件下,全溶性蛋白的MHC和Actin变化不大,基本不受0℃及4℃贮藏条件的影响。

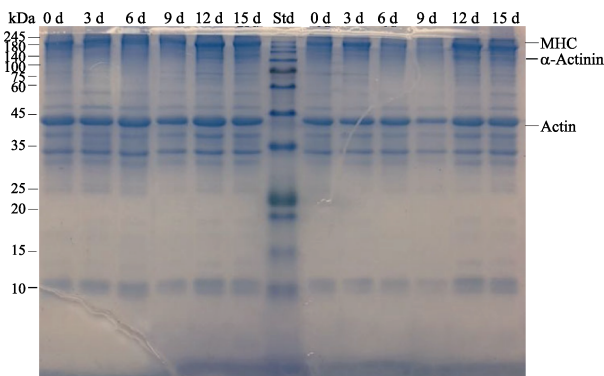


图6 冷藏过程中带鱼肉全蛋白的 SDS-PAGE
Fig.6 SDS-PAGE patterns of total proteins of hairtail muscle during storage at 0℃ and 4℃

Std: Real Band 蛋白预染 Marker; MHC: 肌球蛋白重链;
α-Actinin: α-辅肌动蛋白; Actin: 肌动蛋白。Std 左侧 0~15 d
为 0℃ 冷藏样品; Std 右侧 0~15 d 为 4℃ 冷藏样品。下同
Std: Real Band pre-dyed Marker; MHC: myosin heavy chain;
Left of Std: samples stored for 0~15 d at 0℃; right of Std:
samples stored for 0~15 d at 4℃. The same as below

带鱼肉水溶性蛋白的电泳图如图7所示, Real Band蛋白预染Maker左侧和右侧分别是0℃和4℃冷藏条件。水溶性蛋白主要是肌浆蛋白,从图7中可以看出,2种冷藏温度下蛋白条带分子量集中在25~60 kDa范围内。整个贮藏期内蛋白条带并没有明显的变化,由此可见,0℃及4℃低温冷藏条件下,水溶性蛋白几乎没有受到影响。

图8显示了0℃(左侧)和4℃(右侧)2种冷藏条件下带鱼肉高盐溶性蛋白的变化情况。高盐溶性蛋白的主要成分是肌原纤维蛋白,其条带分布很广,分子量在10~245 kDa之间,比较明显的是肌球蛋白(MHC)、肌动蛋白(Actin)、原肌球蛋白(Tropomyosin)、I (41~42 kDa)、

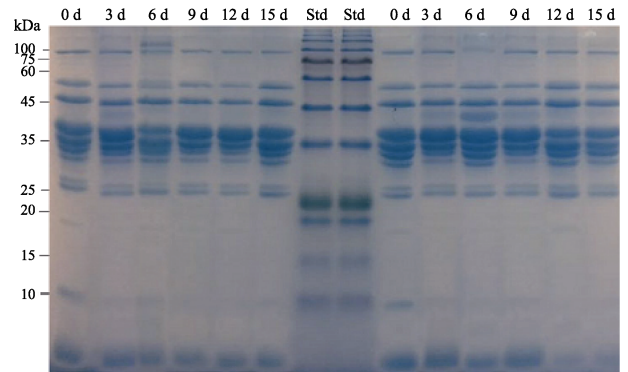


图7 冷藏过程中带鱼肉水溶性蛋白的 SDS-PAGE
Fig.7 SDS-PAGE patterns of water soluble proteins of hairtail muscle during storage at 0℃ and 4℃

II (19~20 kDa)和III (13~15 kDa)蛋白条带。从图8中可以看出,在0℃和4℃贮藏期内,除了原肌球蛋白条带没有明显变化,其他上述蛋白条带均发生了不同程度的降解。另外,在4℃贮藏后期,图中肌动蛋白的条带变粗,可能是肌动蛋白含量增多或MHC降解。有文献(Li *et al*, 2014)报道过,将死后的大黄鱼贮藏在-2℃的条件下,在提取的高盐溶性蛋白电泳图中,分子量约为32~34 kDa和67 kDa的条带增加,可能是由于MHC降解引起的,本次实验的现象与其研究结果相似。

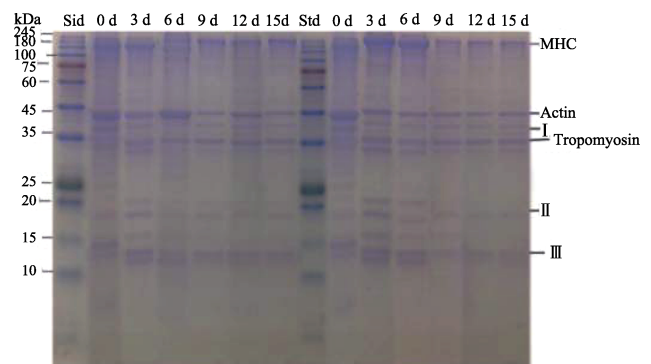


图8 冷藏过程中带鱼肉高盐溶性蛋白的 SDS-PAGE
Fig.8 SDS-PAGE patterns of high-salt-soluble proteins of hairtail muscle during storage at 0℃ and 4℃

Tropomyosin: 原肌球蛋白; I、II和
III为不同分子量的蛋白条带
I, II and III: Protein bands with different molecular weights

3 结论

与4℃贮藏相比,0℃条件下贮藏减缓了带鱼肌原纤维蛋白的降解速率,但贮藏时间长达15 d时,2种冷藏条件下贮藏的带鱼蛋白都已变性,相互之间并没

有显著差异性($P<0.05$)。TCA可溶性肽含量的上升、巯基含量的下降以及高盐溶性蛋白SDS-PAGE图表明,随着贮藏时间的延长,肌原纤维蛋白中的肌球蛋白和肌动蛋白出现了逐渐降解的现象(顾冰宁等,2018)。带鱼肌原纤维蛋白的表面疏水性在贮藏期间总体呈上升趋势,说明了蛋白质变性引起的疏水基团的暴露,同时贮藏15 d后 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase活性显著降低,可能是巯基氧化使得二硫键发生了交联,也表明了蛋白已经严重变性水解、降解,带鱼肉已不能食用。综上所述,虽然低温贮藏是目前常用的食物保鲜方法,但是对于带鱼的短期存贮,0℃和4℃这2种冷藏条件并不能很好的维持其新鲜度,也不能保持良好的鱼肉品质,所以探讨和研发更完善的贮藏方式很有必要。

参 考 文 献

- Benjakul S, Seymour TA, Morrissey MT, *et al.* Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science*, 1997, 62(4): 729–733
- Benjakul S, Visessanguan W, Tueksuban J. Changes in physicochemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. *Food Chemistry*, 2003, 80(4): 535–544
- Chen YL, Shan XJ, Dai FQ, *et al.* Relative stock density and distribution of hairtail *Trichiurus lepturus* and its spawning stock structure in coastal waters of the East China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 8–15 [陈云龙, 单秀娟, 戴芳群, 等. 东海近海带鱼群体相对资源密度、空间分布及其产卵群体的结构特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 8–15]
- Decker EA, Xiong YL, Calvert JT, *et al.* Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(2): 186–189
- Dileep AO, Shamasundar BA, Binsi PK, *et al.* Effect of ice storage on the physicochemical and dynamic viscoelastic properties of ribbonfish (*Trichiurus* spp) meat. *Journal of Food Science*, 2005, 70(9): E537–E545
- Gallart-Jornet L, Rustad T, Barat JM, *et al.* Effect of superchilled storage on the freshness and salting behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Chemistry*, 2007, 103(4): 1268–1281
- Gu BN, Liu X, Shen HD, *et al.* Molecular cloning and analysis of the *MyHC* gene in *Onchidium struma*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 126–138 [顾冰宁, 刘欣, 沈和定, 等. 瘤背石磺肌球蛋白重链(*MyHC*)基因的克隆与表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 126–138]
- Haard NF. Protein hydrolysis in seafoods//Seafoods: Chemistry, processing technology and quality. Springer US, 1994, 10–33
- Kobayashi Y, Park JW. Biochemical and physical characterizations of fish protein isolate and surimi prepared from fresh and frozen whole fish. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, 77: 200–207
- Kouassi GK, Anantheswaran RC, Knabel SJ, *et al.* Effect of high-pressure processing on activity and structure of alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase in buffer and milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(23): 9520–9529
- Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Physicochemical and biochemical changes during frozen storage of minced flesh of lizardfish (*Saurida micropectoralis*). *Food Chemistry*, 2005, 90(1–2): 141–150
- Lefevre F, Fauconneau B, Thompson JW, *et al.* Thermal denaturation and aggregation properties of Atlantic salmon myofibrils and myosin from white and red muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(12): 4761–4770
- Li T, Li J, Hu W, *et al.* Protein changes in *post mortem* large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) monitored by SDS-PAGE and proteome analysis. *Food Control*, 2014, 41(1): 49–55
- Li TT. Studies on bio-preservation techniques and protein Indicators of freshness in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Doctoral Dissertation of Zhejiang Gongshang University, 2013, 1–193 [李婷婷. 大黄鱼生物保鲜技术及新鲜度指示蛋白研究. 浙江工商大学博士研究生学位论文, 2013, 1–193]
- Li YQ. Protein oxidation-induced structure and function changes of common carp (*Cyprinus carpio*) protein and its control technology. Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2013, 1–114 [李艳青. 蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术. 东北农业大学博士研究生学位论文, 2013, 1–114]
- Lund MN, Lametsch R, Hviid MS, *et al.* High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine *Longissimus dorsi* during chill storage. *Meat Science*, 2007, 77(3): 295–303
- Meucci E, Mordente A, Martorana GE. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: Conformational and functional changes. Implications in protein aging. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(8): 4692–4699
- Noguchi E, Yamamoto J. Studies on the “Arai” phenomenon (the muscle contraction caused by perfusing water)-III. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1955, 20(11): 1020–1022
- Ouali A, Valin C. Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase on myofibrillar ATPase activity: Relationship with ageing changes. *Meat Science*, 1981, 5(3): 233–245
- Park D, Xiong YL, Alderton AL, *et al.* Biochemical changes in myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(12): 4445–4451
- Prodpran T, Benjakul S, Phatcharat S. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(5): 774–782
- Rivett AJ, Levine RL. Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli*, glutamine synthetase: Correlation of structural and functional changes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990, 278(1): 26–34

- Shi Y, Li RY, Tu ZC, *et al.* Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties and structure of fish myofibrillar proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 109(10): 70–72
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(4): 2005–2008
- Tian Y, Du JB. Effect of disulfide bond and mercapto-group on structure and function of protein and analytical method. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2007, 22(19): 1499–1501 [田悦, 杜军保. 二硫键和巯基在蛋白质结构功能中的作用及分析方法. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(19): 1499–1501]
- Verrez-Bagnis V, Ladrat C, Morzel M, *et al.* Protein changes in *post mortem* sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2001, 22(8): 1539–1544
- Wang H, Liceaga-Gesualdo AM, Li-Chan ECY. Biochemical and physicochemical characteristics of muscle and natural actomyosin isolated from young Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at 0 and 4°C. *Journal of Food Science*, 2003, 68(3): 784–789

(编辑 陈辉)

Effect of Chilling Storage on the Muscle Protein of Hairtail

SHEN Ni, WU Tiantian, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin^①

(National Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Key Laboratory for Agro-Products Postharvest Handling of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory for Agro-Products Nutritional Evaluation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Fuli Institute of Food Science, College of Biosystems Engineering and Food Science, Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract The hairtail (*Trichiurus haumela*) is rich in protein and high in nutrition. In this study, the effects of chilling storage on the muscle protein of hairtail were studied by measuring a series of physical and chemical indicators that characterize changes in the fish quality, including TCA-soluble peptides, sulfhydryl group content, surface hydrophobicity, Ca²⁺-ATPase activity, and Mg²⁺-ATPase activity, as well as SDS-PAGE patterns of total soluble proteins, water-soluble proteins, low-salt-soluble proteins, and high-salt-soluble proteins. The effects of 0°C and 4°C chilling on the fish muscle protein were observed after 15 days of storage, and the oxidation, denaturation, and degradation of the fish protein under the two storage temperatures were compared. The results showed that after 0°C and 4°C storage for 15 days, the TCA-soluble peptides increased from 1.446 μmol/g to 6.717 μmol/g and 7.595 μmol/g, respectively. The Ca²⁺-ATPase activities were lower than the initial values, decreasing from 0.99 U/mg prot to 0.092 U/mg prot and 0.134 U/mg prot, respectively. The Mg²⁺-ATPase activities also decreased from 0.76 U/mg prot to 0.199 U/mg prot and 0.125 U/mg prot, respectively. In addition, the sulfhydryl group content decreased from 38.15 μmol/g MP to 35.82 μmol/g MP and 30.36 μmol/g MP, respectively. The surface hydrophobicity first increased and then decreased, but the values were higher than those of the fresh samples. The changes in the values of this series of physical and chemical indicators indicated that the refrigerating conditions of 0°C and 4°C were not conducive to the long-term storage of the hairtail. Prolonged storage time destroyed the freshness and quality of the hairtail owing to protein oxidation, which caused a bad odor and rendered the fish inedible. From the microstructure perspective, there were almost no changes in the total soluble proteins and water-soluble proteins. However, the high-salt-soluble proteins degraded under storage, indicating that the myofibrillar protein had degraded gradually, decreasing the fish quality. Moreover, the rate of myofibrillar protein degradation and corruption of the fish was slower at 0°C than at 4°C on the same day during storage.

Key words Hairtail; Chilling storage; Myofibrillar protein; Physical and chemical indicators; Degradation

① Corresponding author: HU Yaqin, E-mail: yqhu@zju.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180814003

http://www.yykxjz.cn/

姚洁玉, 李苑, 江杨阳, 陈士国, 胡亚芹. 壳聚糖-柑橘精油微胶囊制备工艺优化及其在凡纳滨对虾保鲜中的应用. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 203-209

Yao JY, Li Y, Jiang YY, Chen SG, Hu YQ. Optimization of chitosan-citrus essential oil microcapsules for application in the preservation of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 203-209

壳聚糖-柑橘精油微胶囊制备工艺优化及其在凡纳滨对虾保鲜中的应用*

姚洁玉 李苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹^①

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 馥莉食品研究院 智能食品加工技术与装备

国家(地方)联合实验室 农业农村部农产品产后处理重点实验室 农业农村部农产品营养功能评价实验室

浙江省农产品加工技术研究重点实验室 浙江大学宁波研究院 杭州 310058)

摘要 本研究分别以壳聚糖浓度、乳化剂用量和三聚磷酸钠用量为指标进行单因素试验,以粒径、PDI和Zeta电位为指标进行分析,制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊。以挥发性盐基氮(TVB-N)值、SDS-PAGE电泳、硫代巴比妥酸值(TBA)和菌落总数(TVC)为指标分析壳聚糖-柑橘精油微胶囊在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 4℃贮藏过程中对其品质的影响。结果显示,与对照组相比,壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理组可以明显抑制TVB-N值、TBA值和TVC值增长($P<0.05$); SDS-PAGE图谱也显示实验组的肌球蛋白重链分解更慢。说明在4℃冷藏条件下,壳聚糖-柑橘精油微胶囊能够有效地抑制蛋白质的变性、脂肪的酸败和微生物的增长,从而延缓凡纳滨对虾腐败变质,延长凡纳滨对虾货架期3~4 d。

关键词 凡纳滨对虾; 壳聚糖-柑橘精油微胶囊; 品质; 保鲜

中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0203-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界上养殖产量最高的三大虾类品种之一(曹荣等, 2009)。凡纳滨对虾味道鲜美,营养丰富,深受广大消费者的喜爱,现已成为中国养殖虾类的主要品种(袁丽等, 2011)。凡纳滨对虾丰富的营养物质极易被微生物利用而导致腐败,货架期短是影响凡纳滨对虾销售流通的突出问题。

随着人们对食品的口感、安全性、营养性等重视程度的提高,生物保鲜剂的应用越来越广泛,这些保鲜剂不仅可以抑制细菌生长、抗氧化而且相对安全。单一生物保鲜剂的作用相对局限,2种或2种以上协

同作用可以大大降低单一保鲜剂的用量,提高保鲜效率。倪渠峰(2014)用茶多酚结合壳聚糖处理冷藏大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*),发现茶多酚和壳聚糖能延缓肌肉蛋白质中疏水基团的暴露和巯基的氧化,从而抑制大黄鱼肌原纤维蛋白的变性,控制组织微观结构的劣变。毕海丹等(2016)用茶多酚和乳清蛋白对冷藏鱼糜进行保鲜处理,结果显示,茶多酚和乳清蛋白共同作用对蛋白氧化和脂肪氧化的抑制效果都优于单独添加茶多酚或乳清蛋白。

壳聚糖(Chitosan)是甲壳素脱乙酰产物,由 α -氨基-D-葡胺糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的天然多糖。

*“十三五”国家重点研发计划(2017YFD0400403)资助 [This work was supported by the National Thirteenth Five-Year Key Research and Development Project (2017YFD0400403)]. 姚洁玉, E-mail: 1326496020@qq.com

^① 通讯作者: 胡亚芹, 教授, E-mail: yqhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2018-08-14, 收修改稿日期: 2018-08-29

Gooday等(1986)的研究表明,壳聚糖具有广谱抑菌作用和抗氧化作用;壳聚糖对假单胞菌、肠杆菌、沙门氏菌等革兰氏阴性菌,以及金黄色葡萄球菌、乳酸菌、单核细胞增生李斯特菌等革兰氏阳性细菌和酵母菌均具有抑制作用(No *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2001); 0.5%和1%的壳聚糖投喂花鲈(*Lateolabrax japonicus*)可以增强花鲈的溶菌酶活性和吞噬活性(常青等, 2006)。柑橘精油是柑橘果皮中提取的一种精油,有比较强的抑菌效果和抗氧化性。柑橘油不仅对酵母、霉菌和产孢子细菌有抑菌作用,对食品产毒细菌也有抗菌效果(Palvano *et al.*, 2004)。

微胶囊产品可通过预先设计的壁材溶解时间和释放曲线,在规定的时间内以一定的速率释放芯材物质。在食品工业中,微胶囊化用以保持被包埋物质的生理活性,保护敏感性成分。曾治平(2010)用复凝聚法将叶黄素微胶囊化,提高了叶黄素的稳定性,能更加方便的贮藏和应用。韩宁(2006)发现,微胶囊能够大大提高 β -胡萝卜素的稳定性,减缓降解速率。郭爱莲等(1994)发现,将苯甲酸钠用 β -环状糊精包埋成微囊后,能显著延长产品的货架期。肉桂醛经喷雾干燥制备成微胶囊后可以延长其抗菌作用时间(武伟等, 2002)。

本研究以具有良好成膜性兼具抗菌性的壳聚糖作为壁材,以具有抗氧化性、抗菌性的柑橘精油作为芯材,制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊,并考察了壳聚糖浓度、乳化剂用量和三聚磷酸钠用量对粒径、PDI (Polydispersity Index分散指数)及Zeta电位的影响,在此基础上得到优化的微胶囊制备条件,并研究了壳聚糖-柑橘精油微胶囊对凡纳滨对虾贮藏过程品质的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

凡纳滨对虾取自杭州骆家庄农贸市场,选取大小(15.0 \pm 0.5) g的凡纳滨对虾置于碎冰中,于20 min内带回实验室;柑橘精油(法国Florihana公司);吐温80、Na₅P₃O₁₀(TPP)、醋酸、壳聚糖(脱乙酰度80.0%~95.0%,粘度50~800 cp)、HCl、NaOH、乙醇、硫代巴比妥酸、三氯乙酸、KI、氯仿、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、Na₂S₂O₃、冰乙酸等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FA2004电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;TGL20M台式低速冷冻离心机,湖南凯达科学仪器有限公司;UV-2550紫外分光光度计,日本岛津公司;

EPS300电泳仪,上海天能科技有限公司;凯氏定氮装置,郑州市中原科技玻璃仪器厂;磁力搅拌器;粒度分析仪LS-230,美国库尔特公司;Zeta电位分析仪Zetasizer Nano ZS90,英国马尔文公司。

1.3 实验方法

1.3.1 壳聚糖-柑橘精油微胶囊的制备 称取一定浓度的壳聚糖溶于1%的醋酸溶液,磁力搅拌至完全溶解,滴加一定量吐温80,磁力搅拌2 h,用蠕动泵向溶液中加入一定量柑橘精油,磁力搅拌2 h,用蠕动泵以一定速率滴加一定量的TPP溶液,边滴加边用磁力搅拌器搅拌。搅拌12 h,在4000 r/min下离心30 min,将沉淀在-40℃下冻干备用。

1.3.2 粒径、PDI的测定 使用粒度分析仪进行测量,测量温度为25℃,每个样品取3组平行,数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

1.3.3 Zeta电位的测定 使用Zeta电位分析仪进行测量,测量温度为25℃,每个样品取3组平行,数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

1.3.4 样品处理 以1%的醋酸溶液为溶剂,制备1%(w/v)的微胶囊溶液,将凡纳滨对虾置于溶液中20 min后取出,等待其表面干燥后,置于4℃冰箱贮藏,并定期测量其指标。

1.3.5 挥发性盐基氮(TVB-N)值测定 参照Yerlikaya等(2017)的方法,蒸馏获得均质虾肉末的总挥发性碱,并将这些挥发性碱用0.1 mol/L的HCl收集,在Tashiro指示剂(0.2 g甲基红和0.1 g亚甲基蓝溶解于100 ml 95%乙醇)的存在下,用0.1 mol/L的NaOH滴定馏出液。计算TVB-N并表示为mg TVB-N/100 g样品。

1.3.6 SDS-PAGE电泳 参照Laemmli(1970)的方法,采用SDS-PAGE分析不同处理对虾肉蛋白质的影响。采用10%的分离胶浓度,5%的浓缩胶浓度。电泳完成后,经考马斯亮蓝染色,脱色后观察蛋白质条带的变化。

1.3.7 硫代巴比妥酸值(TBA)测定 参照Vyncke(1975)的方法并有所改动,取10 g碎虾肉,加入50 ml 7.5%的三氯乙酸(含有0.1% EDTA),振荡后静置30 min,用双层滤纸过滤。取5 ml滤液,加入5 ml 0.02 mol/L的TBA溶液,在沸水浴中保存40 min,取出后冷却1 h,在1500 r/min条件下离心25 min,取上清液,加入5 ml 氯仿,静置分层后取上清液分别在532 nm和600 nm波长下测定吸光度,用以下公式计算TBA值。

$$\text{TBA}(\text{mg} / 100 \text{ g}) = \frac{(A_{532} - A_{600})}{155} \times \frac{1}{m} \times 72.6 \times 100$$

1.3.8 菌落总数(TVC)的测定 参照Saraiva等(2016)

的方法,取虾肉5 g,加入45 ml灭菌生理盐水振摇并进行10倍梯度稀释,选择3个合适稀释度的样本匀液,取1 ml样品稀释液于无菌培养皿内。将约15 ml冷至45℃的平板计数琼脂培养基注入培养皿,待琼脂凝固后,翻转平板,置于(36±1)℃恒温箱内,培养72 h后计数。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖浓度对粒径、PDI与Zeta电位的影响

分别使用2.5、5.0、7.5、10.0、15.0和20.0 g/L浓度的壳聚糖溶液制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊,柑橘精油添加量为6 g/L,吐温80添加量为3 ml/L,TPP添加量为2 g/L,TPP添加速度为1 mg/min。6个样品粒径、PDI与Zeta电位的测定结果见表1。由表1可以看出,随着壳聚糖浓度的增加,微胶囊的平均粒径增加,PDI增大。粒径是考察微胶囊的一个重要指标,平均粒径反映了微胶囊的大小。PDI反映了微胶囊大小的分布情况,系数越低,表明微胶囊的大小越均匀,微胶囊的粒度分布,随着壳聚糖浓度的增加越来越不均匀。在较低壳聚糖浓度下,壳聚糖和柑橘精油之间有更好的溶解性和相互作用,因此粒度较小(Fan *et al.*, 2012),随着壳聚糖浓度的增加,溶液中壳聚糖分子增多,使得溶液粘度增加,从而使得微胶囊分布不均匀。Zeta电位也随着壳聚糖浓度的增加而增大,Zeta电位反映了微胶囊溶液胶体体系的稳定程度,Zeta电位数值越大表示溶液稳定性越差,这与形成的微胶囊越来越不均匀有关。随着壳聚糖浓度的增加,载有柑橘精油的微胶囊的Zeta电位增加,是因为壳聚糖带有数量过多的游离正电荷(Katas *et al.*, 2006)。

表1 不同壳聚糖浓度下粒径、PDI与Zeta电位变化情况
Tab.1 Changes of particle size, PDI and Zeta potential with different chitosan concentration

壳聚糖浓度 Chitosan concentration (g/L)	粒径 Particle size (nm)	PDI	Zeta 电位 Zeta potential (mV)
2.5	359.9±9.13	0.665±0.01	11.9±0.02
5.0	693.4±8.13	0.662±0.04	17.6±0.14
7.5	1197.5±15.23	0.742±0.14	25.3±0.34
10.0	2033.1±23.11	0.747±0.05	25.9±0.43
15.0	2668.3±32.14	0.962±0.12	51.1±0.24
20.0	2532.5±24.12	1.000±0.07	53.2±0.12

2.2 乳化剂添加量对粒径、PDI与Zeta电位的影响

根据 1.3 的实验方法制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊,壳聚糖浓度为 10 g/L,TPP 添加量为 2 g/L,TPP

添加速度为 1 mg/min,柑橘精油添加量为 6 g/L,吐温 80 添加量分别为 0、3、6、9 和 12 ml/L。5 个样品粒径、PDI 与 Zeta 电位的测定结果如表 2 所示。可以看出,随着乳化剂吐温 80 的添加量增加,微胶囊的平均粒径减小,粒径分布系数减小,表示溶液中微胶囊粒径分布均匀,Zeta 电位也逐渐减小,表明微胶囊溶液较为稳定。这是由于乳化剂使得柑橘精油在溶液体系中分布更为均匀,有利于形成更为分散和稳定的微胶囊体系。

表2 不同乳化剂添加量下粒径、PDI与Zeta电位变化情况

Tab.2 Changes of particle size, PDI and Zeta potential with different emulsifier concentration

吐温 80 添加量 Tween-80 concentration (ml/L)	粒径 Particle size (nm)	PDI	Zeta 电位 Zeta potential (mV)
0	2964.7±32.12	1.00±0.11	40.2±1.23
3	2552.8±34.21	1.00±0.03	30.2±2.13
6	2004.3±31.12	0.69±0.12	32.5±2.22
9	1048.0±12.23	0.50±0.03	26.7±1.44
12	936.9±22.33	0.39±0.01	17.8±0.89

2.3 TPP 添加量对粒径、PDI与Zeta电位的影响

根据1.3的实验方法,制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊。壳聚糖浓度为10 g/L,柑橘精油添加量为6 g/L,吐温添加量为3 ml/L,TPP添加速度为1 mg/min,TPP添加量分别为0.5、1.0、2.0、4.0和8.0 g/L。5个样品粒径、PDI与Zeta电位的测定结果见表3。由表3可以看出,随着TPP的用量增加,微胶囊的平均粒径减小,而PDI无明显变化,Zeta电位呈现出先降低、后升高的趋势。这是由于TPP可以实现壳聚糖微胶囊壁材的凝聚,TPP产生小颗粒,因为它是一个小的聚阴离子分子,与壳聚糖的-NH₃⁺基团形成强烈的离子相互作用。因此,其用量的增加会促进微胶囊体系形成。而TPP用量继续增加,溶液体系稳定性下降,这可能是由于小颗粒聚集在一起并形成团簇所致(Rampino *et al.*, 2013)。TPP制备的纳米颗粒表现出低Zeta电位,这一结果可能是由TPP与壳聚糖的-NH₃⁺基团之间强烈的交联引起的,-NH₃⁺基团可以中和部分游离电荷从而降低Zeta电位(Csaba *et al.*, 2009)。综上所述,制备壳聚糖-柑橘精油微胶囊的较优参数是壳聚糖浓度10 g/L,柑橘精油添加量为6 g/L,吐温添加量为9 ml/L,TPP添加量为4 g/L,TPP添加速度为1 mg/min。

表3 不同 TPP 添加量下粒径、PDI 与 Zeta 电位变化情况
Tab.3 Changes of particle size, PDI and Zeta potential with different TPP concentration

TPP 添加量 TPP concentration (g/L)	粒径 Particle size (nm)	PDI	Zeta 电位 Zeta potential (mV)
0.5	4077.5±32.22	0.822±0.05	29.9±1.12
1.0	3783.0±42.23	0.836±0.11	17.1±0.53
2.0	1124.4±15.77	0.844±0.08	22.2±0.99
4.0	1960.7±32.13	0.849±0.06	18.2±1.43
8.0	985.7±22.32	0.897±0.09	26.2±0.23

2.4 壳聚糖-柑橘精油微胶囊对冷藏凡纳滨对虾 TVB-N 值的影响

TVB-N是动物性食品的蛋白质在贮藏过程中由于微生物和酶的作用而分解产生的氨以及胺类物质,是反映水产品新鲜程度的主要指标(Benjakul *et al*, 2002)。GB 2733-2005规定TVB-N含量不大于30 mg/100 g为可接受范围。由图1可知,新鲜凡纳滨对虾的挥发性盐基氮含量接近7 mg/100 g,属于一级鲜度,这与刘金昉等(2014)的研究结果一致。贮藏过程中对照组(CK, Control check, 醋酸处理)和实验组(CS-CEOs, Chitosan-citrus essential oil microcapsules, 壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理)的TVB-N含量呈上升趋势,用壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理的凡纳滨对虾TVB-N值与对照组相比在贮藏第19天时差异显著($P<0.05$),这与微胶囊抑制了微生物的生长繁殖有关。4℃贮藏17天后,对照组的TVB-N值超过30 mg/100 g。实验组在4℃贮藏22 d后,TVB-N值为27.47 mg/100 g,仍在可接受范围内。Cheng等(2016)的研究表明,茶多酚改性胶原蛋白-壳聚糖复合膜抑制了鱼肉TVB-N值的升高,

这与壳聚糖抑制了微生物的生长,延缓了蛋白的变性程度有很大关系。Wu等(2014)研究显示,明胶-牛至精油薄膜可以将鲢鱼的保质期延长至12 d,并推测精油的抗菌性对延长鲢鱼的货架期做出贡献。

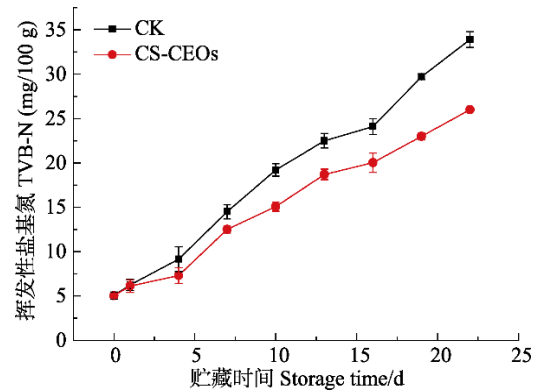


图1 凡纳滨对虾在4℃

保藏过程中 TVB-N 值的变化

Fig.1 Total volatile basic nitrogen (TVB-N) in *L. vannamei* stored at 4℃

CK: 醋酸处理; CS-CEOs:

壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理。下同

CK: Control check; CS-CEOs: Chitosan-citrus essential oil microcapsules. The same as below

2.5 壳聚糖-柑橘精油微胶囊对冷藏凡纳滨对虾 SDS-PAGE 电泳图谱的影响

如图2所示,随着贮藏时间的延长,对照组肌球蛋白重链条带明显变细,肌球蛋白重链含量明显下降,实验组肌球蛋白重链条带直到第16天都未见明显变化,在第24天出现明显变细现象,可能是因为随着贮藏时间的延长,凡纳滨对虾蛋白质自身的交联被打开,分解成分子量较低的蛋白质或者形成其他交联聚

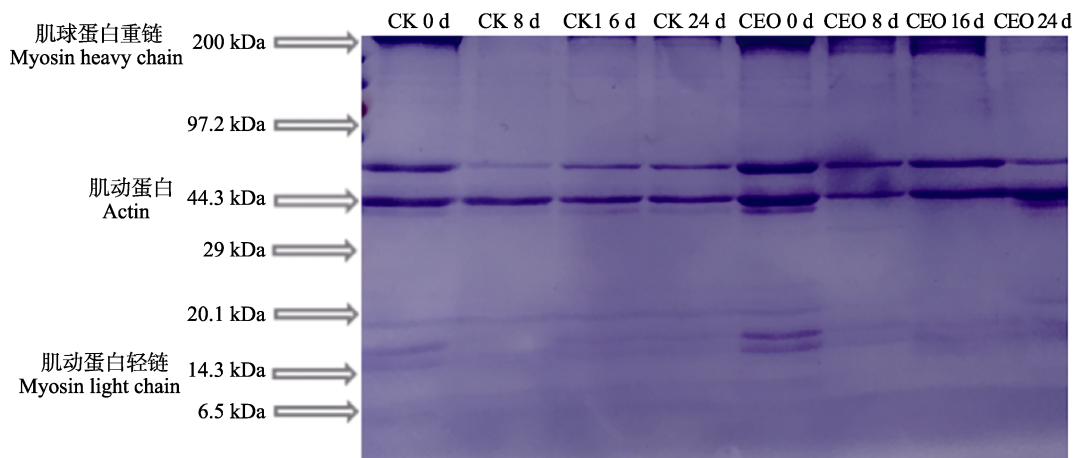


图2 凡纳滨对虾在4℃保藏过程中 SDS-PAGE 电泳图谱的变化

Fig.2 SDS-PAGE patterns of *L. vannamei* stored at 4℃

集成更高分子量的蛋白质。实验组与对照组的肌球蛋白轻链都变细且对照组表现更为明显,可能是因为肌原纤维蛋白分子间二硫键、二聚酪氨酸的形成导致蛋白的聚集,形成了分子量更大的蛋白质,而壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理起到了抗氧化作用,减少了二硫键和二聚酪氨酸的形成。在整个处理过程中,实验组与对照组的肌动蛋白条带变化不明显。

2.6 壳聚糖-柑橘精油微胶囊对冷藏凡纳滨对虾TBA值的影响

脂质氧化形成的过氧化物会分解产生丙二醛(Malondialdehyde, MDA),MDA可与TBA产生颜色反应,生成稳定的红色化合物通过测定吸光度定量(Jo *et al*, 2000)。TBA值是衡量水产品脂肪氧化酸败程度的重要指标(孙群, 2002)。在4℃条件下,凡纳滨对虾TBA值的变化趋势见图3。随着贮藏时间的延长,实验组与对照组的TBA值曲线都呈上升趋势,表明随着时间的延长,凡纳滨对虾的脂肪氧化越来越严重,实验组的TBA值与对照组相比在贮藏第19天时差异显著($P<0.05$),实验组的TBA值上升趋势较对照组更平缓,此外,对照组贮藏第19天的TBA值为0.958 mg/kg,而实验组贮藏第22天的TBA值为0.789 mg/kg,表明壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理能延缓凡纳滨对虾脂肪氧化速率。刘金昉等(2014)的研究结果显示,含有壳聚糖的复合保鲜剂处理过的凡纳滨对虾的TBA上升速度更慢,在贮藏后期,当TBA值上升到一定值后趋于平衡时,含有壳聚糖的复合保鲜剂处理过的样品TBA的平衡值较未经复合保鲜剂处理的样品低。因此,刘金昉等(2014)认为复合保鲜剂处理不仅可以延缓凡纳滨对虾脂肪氧化速率,而且还能降低凡纳滨对虾脂肪氧化程度。

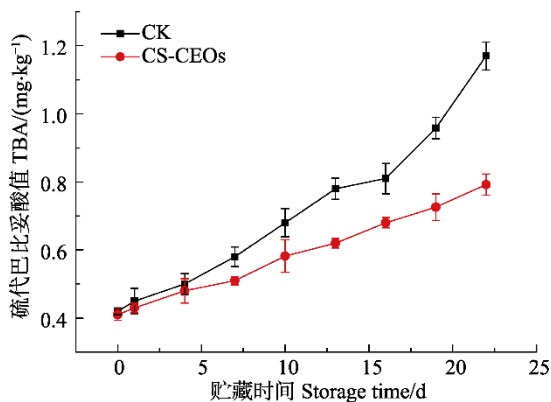


图3 凡纳滨对虾在4℃保藏过程中TBA值的变化
Fig.3 TBA of *L. vannamei* stored at 4°C

2.7 壳聚糖-柑橘精油微胶囊对冷藏凡纳滨对虾菌落总数(TVC)的影响

微生物生长是导致腐败的主要原因,菌落总数是衡量水产品腐败情况的重要指标。Al-Dagal等(1999)的研究表明,虾类的菌落数不大于5.0 lg(CFU/g)为一级鲜度;菌落总数在5.0~5.7 lg(CFU/g)之间为二级鲜度,菌落总数大于5.7 lg(CFU/g)则判定虾类已经到达货架终点。不同处理方式的凡纳滨对虾贮藏于4℃条件下的菌落总数变化情况见图4。随着贮藏时间的延长,凡纳滨对虾的菌落总数整体呈上升趋势,新鲜样品菌落总数为4.10 lg(CFU/g),为一级鲜度。不同处理方式的凡纳滨对虾的菌落总数在贮藏第19天差异显著($P<0.05$)。第1天对照组样品的菌落总数为4.05 lg(CFU/g),可能是因为醋酸浸泡处理起到了杀菌作用,实验组的菌落总数为3.42 lg(CFU/g),可能是因为醋酸浸泡与壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理共同作用的结果。熊青等(2014)用茶多酚、柠檬酸和L-半胱氨酸复合保鲜剂处理凡纳滨对虾,实验组第2天的菌落总数与第0天相比也略有减少,认为这是茶多酚、柠檬酸和L-半胱氨酸复合保鲜剂导致pH值的降低,而较低的pH值抑制了微生物的增长。对照组从第1天起微生物增长迅速,第13天已超过了5.7 lg(CFU/g),实验组的菌落总数增长速率较对照组平缓,到第19天细菌总数为5.42 lg(CFU/g),到第22天细菌总数为6.07 lg(CFU/g),超出二级鲜度范围。可见壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理对凡纳滨对虾微生物的生长繁殖起到一定抑制作用。

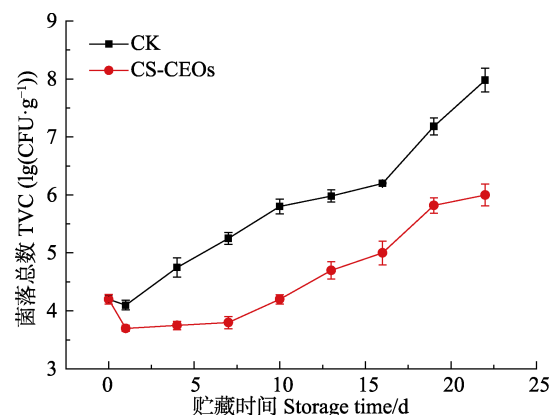


图4 凡纳滨对虾在4℃保藏过程中菌落总数的变化
Fig.4 Total viable count (TVC) of *L. vannamei* stored at 4°C

3 结论

壳聚糖-柑橘精油微胶囊处理过的凡纳滨对虾在

4℃冷藏过程中TVB-N值、TBA值和TVC值等指标明显低于空白对照组,说明壳聚糖-柑橘精油微胶囊能够有效地抑制蛋白质的变性、脂肪的酸败和微生物的增长,从而阻碍凡纳滨对虾腐败变质。近年来,随着人们对食品的口感、安全性和营养性等因素的重视程度的提高,人们对天然保鲜剂越来越感兴趣,天然保鲜剂不仅可以抑制细菌生长、抗氧化而且相对更安全。壳聚糖具有广谱抑菌作用和抗氧化作用,壳聚糖在中性pH下溶解度较低、表面积较小、孔隙度较低、高浓度时有涩感,单独使用时可以通过化学修饰、改变壳聚糖粒径、制备纳米壳聚糖纤维等方式来增大壳聚糖与被保鲜物质的接触面积,从而增强保鲜性能。单一生物保鲜剂的作用相对局限,2种或2种以上生物保鲜剂协同作用,可以大大降低单一保鲜剂的用量,提高保鲜效率,国内外对于壳聚糖和多酚类物质的结合使用,用于生鲜水果保鲜的研究比较多。同时,在水产保鲜贮藏技术上,单一栅栏因子的冷冻冷藏效果相对局限,利用多个栅栏因子的协同作用,例如引用生物保鲜剂等将有较好的发展前景。

参 考 文 献

- Al-Dagal MM, Bazaraa WA. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(1): 51–56
- Benjakul S, Visessanguan W, Riebroy S, *et al.* Gel-forming properties of surimi produced from bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *P. macracanthus*, stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(13): 1442–1451
- Bi HD, Cui XH, Wang ZY, *et al.* Effects of tea polyphenols and whey protein isolate on preservation of surimi quality during cold storage. *Food Science*, 2016, 37(10): 272–277 [毕海丹, 崔旭海, 王占一, 等. 茶多酚和乳清蛋白对冷藏鱼糜保鲜效果的影响. *食品科学*, 2016, 37(10): 272–277]
- Cao R, Xue CH, Xu LM. Application of complex preservative on prawn anti-melanosis and preservation. *Transactions of the CSAE*, 2009, 25(8): 294–298 [曹荣, 薛长湖, 徐丽敏. 复合保鲜剂在对虾保鲜及防黑变中的应用. *农业工程学报*, 2009, 25(8): 294–298]
- Chang Q, Liang MQ, Wang JL, *et al.* Influence of chitosan on the growth and non-specific immunity of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(5): 17–22 [常青, 梁萌青, 王家林, 等. 壳聚糖对花鲈生长和非特异性免疫力的影响. *海洋水产研究*, 2006, 27(5): 17–22]
- Cheng JH, Sun DW, Qu JH, *et al.* Developing a multispectral imaging for simultaneous prediction of freshness indicators during chemical spoilage of grass carp fillet. *Journal of Food Engineering*, 2016, 182: 9–17
- Csaba N, Koping-Hoggard M, Alonso MJ. Ionically crosslinked chitosan/ tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 382(1–2): 205–214
- Fan W, Yan W, Xu ZS, *et al.* Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 90: 21–27
- Gooday GW, Jeuniaux C, Muzzarelli R. Chitin in nature and technology//International conference on chitin and chitosan (1985: Senigallia, Italy). Plenum Press, 1986
- Guo AL, Yuan J. Some preservatives and their protection. *Food Science*, 1994(4): 3–16 [郭爱莲, 袁静. 某些防腐剂及其保护作用. *食品科学*, 1994(4): 3–16]
- Han N. Preparation of β -carotene microcapsules and their stability. Master's Thesis of Zhejiang University, 2006, 1–78 [韩宁. β -胡萝卜素微胶囊的制备和稳定性研究. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2006, 1–78]
- Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44(1): 71–76
- Jo C, Ahn DU. Volatiles and oxidatives changes in irradiated pork sausage with different fatty acid composition and tocopherol content. *Journal of Food Science*, 2000, 65(2): 270–275
- Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 2006, 115(2): 216–225
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685
- Liu JF, Liu YH, Qi FS, *et al.* Preservation effect of complex biological preservative combined with ice temperature storage on *Penaeus vannamei*. *Food Science*, 2014, 35(20): 286–290 [刘金昉, 刘红英, 齐凤生, 等. 复合生物保鲜剂结合冰温贮藏对南美白对虾的保鲜效果. *食品科学*, 2014, 35(20): 286–290]
- Ni QF. The effects of tea polyphenols combined with chitosan coating on muscle protein of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2014, 1–100 [倪渠峰. 茶多酚结合壳聚糖对冷藏大黄鱼肌肉蛋白质的影响. 浙江工商大学硕士研究生学位论文, 2014, 1–100]
- No HK, Park NY, Lee SH, *et al.* Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74: 65–72
- Palhano FL, Vilches TTB, Santos RB, *et al.* Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95(1): 61–66
- Rampino A, Borgogna M, Blasi P, *et al.* Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 455(1–2): 219–228
- Saraiva C, Vasconcelos H, de Almeida JMMM. A chemometrics approach applied to Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for monitoring the spoilage of fresh salmon (*Salmo salar*) stored under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 241: 331–339
- Sun Q. Lipid oxidation of meat products: Determination of aldehydes by thiobarbituric acid test. *Food Science*, 2002, 23(8): 331–333 [孙群. 肉制品脂类氧化: 硫代巴比妥酸试验测定醛类物质. *食品科学*, 2002, 23(8): 331–333]
- Vyncke W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction

- method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1975, 77(6): 239–240
- Wu JL, Ge SY, Liu H, *et al.* Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2014, 2(1): 7–16
- Wu W, Tan LF, Yang LS. Studies on microencapsulation processing of cinnaldehyde. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21(2): 108–111 [王伟, 谭龙飞, 杨连生. 肉桂醛微胶囊的制备工艺. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(2): 108–111]
- Xiong Q, Xie J, Qian YF, *et al.* Effect of tea polyphenol complex preservative on the quality of *Penaeus vannamei* under cold storage. *Food Science*, 2014, 35(2): 287–291 [熊青, 谢晶, 钱韵芳, 等. 茶多酚复合保鲜剂对冷藏南美白对虾品质的影响. 食品科学, 2014, 35(2): 287–291]
- Yerlikaya P, Yatmaz HA, Gokoglu N, *et al.* The quality alterations of rainbow trout mince treated with transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 84: 815–820
- Yuan L, Gao RC, Xue CH, *et al.* Effect of alginate pyrolysis product on the quality of frozen white leg shrimp *Penaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(6): 121–127 [袁丽, 高瑞昌, 薛长湖, 等. 褐藻酸钠裂解物对冷冻南美白对虾品质的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 121–127]
- Zeng ZP. The study on microcapsule preparation of lutein and its stability. Master's Thesis of South China University of Technology, 2010, 1–74 [曾治平. 叶黄素的微胶囊制备及其稳定性的研究. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–74]

(编辑 陈辉)

Optimization of Chitosan-Citrus Essential Oil Microcapsules for Application in the Preservation of *Litopenaeus vannamei*

YAO Jieyu, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin^①

(National Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Key Laboratory for Agro-Products Postharvest Handling of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory for Agro-Products Nutritional Evaluation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Fuli Institute of Food Science, College of Biosystems Engineering and Food Science, Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract In this study, chitosan-citrus essential oil microcapsules were prepared with the following three ingredients at varying concentrations: citrus essential oil 6 g/L, emulsifier 3 ml/L, TPP(Thiamine pyrophosphate) 2 g/L, and chitosan at 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, or 20 g/L; citrus essential oil 6 g/L, TPP 2 g/L, chitosan 10 g/L, and emulsifier at 0, 3, 6, 9, or 12 ml/L; and citrus essential oil 6 g/L, emulsifier 3 ml/L, chitosan 10 g/L, and TPP at 0.5, 1, 2, 4, or 8 g/L. The particle size, PDI(Poly-dispersible), and zeta potential were used as indicators, and chitosan 10 g/L, citrus essential oil 6 g/L, emulsifier 9 ml/L, and TPP 4 g/L were eventually selected as the final ingredient concentrations for preparing the microcapsules. After soaking *Litopenaeus vannamei* with 1% (w/v) microcapsule solution for 20 min, the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content, SDS-PAGE patterns, thiobarbituric acid (TBA) content, and total viable count (TVC) were analyzed to determine the effectiveness of the chitosan-citrus essential oil microcapsules in preserving the quality of *L. vannamei* during storage at 4°C. The results showed that the TVB-N level of the experimental group increased slowly ($P<0.05$), reaching 27.47 mg/100 g on the 22nd day of storage, which was at the secondary freshness level, whereas that of the control group exceeded the secondary freshness level on the 19th day of storage. Likewise, the TBA level of the experimental group increased slowly ($P<0.05$), reaching 0.789 mg/kg on the 22nd day of storage, which was the same level as that of the control group on the 15th day. The TVC of the experimental group also increased slowly ($P<0.05$), reaching 5.42 [lg (CFU/g)] on the 19th day of storage, which was at the secondary freshness level, whereas that of the control group exceeded the secondary freshness level on the 13th day of storage. The SDS-PAGE patterns showed that the myosin heavy chain of the experimental group had decomposed more slowly. These results indicated that the chitosan-citrus essential oil microcapsules could effectively inhibit the degeneration of protein, the rancidity of fat, and the growth of microorganisms, thus, hindering the spoilage of *L. vannamei* and extending its shelf life by 3~4 days compared with that of the control.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Chitosan-citrus essential oil microcapsules; Quality; Preservation

① Corresponding author: HU Yaqin, E-mail: yqhu@zju.edu.cn

《渔业科学进展》2019 年第 40 卷总目录



第 1 期

“973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

- 多目标资源调查站位优化设计——以渤海为例..... 韩青鹏 单秀娟 金显仕 万荣 丁琪 陈云龙 杨涛 (1)
- 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化..... 李苗 单秀娟 王伟继 吕丁 戴芳群 丁小松 吴欢欢 (12)
- 黄海中部泥质区沉积物中重金属的长期变化及其背景值的校正..... 杨茜 杨庶 孙耀 (20)

研究论文

- 不同种类浮游植物对 CO₂ 浓度升高的响应..... 马莎 张继红 刘毅 吴文广 孙科 王巍 隋娟娟 赵云霞 杨艳云 (27)
- 蓝藻水华暴发期间养殖池塘浮游藻类动态变化..... 常孟阳 李晨露 董静 尚向阳 王佳慧 牛萌萌 (36)
- 基于线粒体 CO I 序列的中国前鳞鲛遗传多样性分析..... 黄镇宇 章群 卢丽锋 周琪 唐楚林 (46)
- 鲑鳟通用型低通量单核苷酸多态性芯片的开发..... 邵如玉 许建 江炎亮 张瀚元 白庆利 杨世勇 徐鹏 赵紫霞 (53)
- 凡纳滨对虾 RAS 与 WSSV-VP26 的相互作用..... 王中一 刘庆慧 黄捷 (62)
- 凡纳滨对虾商业苗种抗 WSSV 性能比较..... 董丽君 罗坤 曹家旺 陈宝龙 栾生 曹宝祥 隋娟 孟宪红 (69)
- 放养密度对凡纳滨对虾苗种中间培育效果的影响..... 张龙 陈钊 汪鲁 陈世波 张鹏 曲克明 李秋芬 朱建新 (76)
- 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)血红蛋白 I 基因克隆及表达特征..... 赵庆 吴彪 刘志鸿 孙秀俊 周丽青 杨爱国 张高伟 (84)
- 三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因的克隆及其在低盐适应中的表达分析..... 环朋朋 吕建建 孙东方 高保全 刘萍 (92)
- 刺参(*Apostichopus japonicus*)重要经济性状相关 SNP 标记的验证分析..... 刘安然 廖梅杰 李彬 王印庚 荣小军 张正 范瑞用 陈贵平 (101)
- 维生素 D₃ 对仿刺参幼参生长、体组成及抗氧化能力的影响..... 王丽丽 李宝山 王际英 孙永智 韩秀杰 王雅平 郝甜甜 王世信 (110)
- 一株感染深水网箱养殖许氏平鲈的病原菌分离与鉴定..... 王凯 王印庚 姜勇 张正 于永翔 廖梅杰 (119)
- 南极磷虾油中砷甜菜碱在大鼠体内的代谢..... 邱阿敏 刘小芳 唐一新 王晓滨 张辉珍 冷凯良 (127)
- 不同氮源和环境因子对花津滩芽孢杆菌 SLWX₂ 脱氮性能的影响..... 王越 成钰 李秋芬 张艳 (133)
- 四氢异喹啉衍生物的合成及体外抗多子小瓜虫活性的研究..... 姚嘉赞 徐洋 袁雪梅 蔺凌云 尹文林 潘晓艺 郝贵杰 沈锦玉 (141)
- 基于电子舌技术分析不同采收期紫菜的滋味特征..... 曹荣 赵玲 王联珠 孙慧慧 刘淇 (147)
- 鲟鱼鱼糜漂洗工艺优化及其对品质的影响..... 唐淑玮 高瑞昌 赵元晖 曾名湧 冯秋风 陈依萍 (155)
- 研究综述**
- 中国海带养殖向离岸深水区发展的初步探讨..... 刘福利 梁洲瑞 张朋艳 汪文俊 孙修涛 王飞久 袁艳敏 (161)
- 卵形鲳鲹营养需求与饲料研究进展..... 李远友 李孟孟 汪萌 张媚 麻永财 张关荣 陈汉毅 宁丽军 谢帝芝 王树启 游翠红 (167)

第 2 期

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)
- 半滑舌鳎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 徐大凤 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.....潘晓焯 杨林莘 王晓燕 金银哲 程裕东 (155)

第 3 期

研究论文

- 基于渔港抽样调查南海不同捕捞方式 CPUE 比较分析.....陶雅晋 易木荣 李波 冯波 卢伙胜 颜云榕 (1)
- 新疆博尔塔拉河冬季鱼类群落空间分布及其与环境因子的关系.....刘鸿 牛建功 刘春池 谢鹏 梁杰锋 蔡林钢 马徐发 张人铭 (11)
- 海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响.....王晓芹 Samuel P.S. Rastrick 吴亚林 房景辉 杜美荣 高亚平 蔺凡 姜妮妮 李凤雪 王军威 张义涛 方建光 蒋增杰 (21)
- 桑沟湾养殖海带生长的模型预测.....蔡碧莹 朱长波 刘慧 常丽荣 肖露阳 孙倩雯 蔺凡 (31)
- 水力停留时间对厌氧反应器脱氮效果的影响.....王震林 朱建新 曲克明 陈世波 (42)
- 悬浮物胁迫中国对虾幼体的急性毒性研究.....乔延龙 殷小亚 肖广侠 王立平 (50)
- 牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析.....侯吉伦 郭亚男 付元帅 王桂兴 张晓彦 孙朝徽 司飞 王玉芬 (57)
- 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响.....周朝伟 雷骆 邓星星 袁登越 杨旻珉 曹高祥 朱海星 李岩 朱成科 李代金 唐仁军 张桂众 李路宽 郑宗林 (69)
- 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征.....赵彦花 区又君 李加儿 温久福 周慧 (80)

图丽鱼寄生破坏古氏虫的形态描述及系统发育···谢志胜 马江霞 杨昆明 段成任 郭爱民 岳 城	(87)
十足目甲壳动物的 EST-SSR 分析·····高海钰 李 健 王佳佳 李吉涛	(94)
真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼“褐龙斑”的组织病理分析·····	
·····刘冉阳 史成银 谢国骊 李 晨 王海波	(103)
饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒感染能力及抗病基因表达的影响·····	
·····孙博超 杨运楷 李玉宏 宋晓玲 黄 捷	(113)
基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价·····	
·····宋增磊 董 宣 赵若恒 王秀华 武和英 于党辉 谢国骊 黄 捷	(122)
用于水生病原菌的 3 种高通量活菌计数方法的比较·····邹培卓 杨 倩 董 宣 谢国骊 黄 捷	(133)
江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、相关生化指标的影响·····	
·····郭 斌 梁萌青 徐后国 卫育良 张庆功 李本相 廖章斌	(141)
雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分的比较与评价·····赵亭亭 陈 超 邵彦翔	(151)
5 种海藻在刺参幼参饲料中的应用研究·····	
·····王晓艳 乔洪金 黄炳山 王成强 李培玉 李宝山 王际英	(160)
不同光质及胁迫处理对鼠尾藻及附生藻类光合生理的影响·····	
·····袁艳敏 刘福利 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛	(168)
研究综述	
微塑料在海洋渔业水域中的污染现状及其生物效应研究进展·····	
·····夏 斌 杜雨珊 赵信国 朱 琳 陈碧鹃 孙雪梅 曲克明	(178)

第 4 期

营养与饲料专栏

红鳍东方鲀幼鱼对饲料中蛋氨酸需求的研究·····张庆功 梁萌青 徐后国 卫育良	(1)
复合动植物蛋白部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响·····	
·····郝甜甜 王际英 李宝山 宋志东 黄炳山 孙永智 王雅平 王晓艳	(11)
拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响·····	
·····胡冬雪 马 季 王成强 乔洪金 王际英 李宝山 孙永智	(21)
蚕粉替代鱼粉对加州鲈幼鱼生长、饲料利用及体成分的影响·····饶 远 向 泉 黄先智 段 彪	(31)
豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和肌肉脂肪酸的影响·····	
·····郑建明 赵捷杰 陈四清 常 青 严俊丽 朱之发 刘长琳 胡建成	(39)
饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响·····	
·····王成强 李宝山 王际英 黄炳山 孙永智 郝甜甜 马长兴 周 莹	(47)

研究论文

驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析·····	
·····樊佳佳 白俊杰 李胜杰 马冬梅 姜 鹏	(57)
基于投喂法的牙鲆耳石镮标记·····司 飞 王青林 于清海 刘洪波 姜 涛 杨 健 王 俊	(65)
杂交种“云龙石斑鱼”与亲本的形态差异分析·····	
·····李振通 成美玲 田永胜 唐 江 马文辉 侯云霞 王晓梅 翟介明	(73)
应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构·····	
·····吴欢欢 王伟继 吕 丁 胡玉龙 孔 杰	(84)
松江鲈白介素 15(TfIL-15)的结构特征与重组表达·····刘莹莹 于珊珊 柴迎梅 林啸鹏 祝 茜	(95)
一对虾养殖场的多病原跟踪·····武和英 王秀华 杨 冰 于党辉 黄 捷	(104)
光强对极北海带幼苗生长和生化特性的影响·····	
·····梁洲瑞 刘福利 杜欣欣 袁艳敏 梁启迪 汪文俊 孙修涛 王飞久	(115)
不同培养条件对铜藻生长和营养组分的影响·····栾 青 吕 芳 吴海一 丁 刚 詹冬梅	(123)
广东紫菜 <i>Hsp70</i> 基因 cDNA 克隆与表达分析·····曾 俊 陈伟洲 陈泽攀 刘浩然	(131)
条斑紫菜(<i>Pyropia yezoensis</i>)绿斑病原菌的分离鉴定·····	
·····李 杰 牟宗娟 杨慧超 茅云翔 阎永伟 莫照兰	(140)

luxR 基因调控嗜水气单胞菌耐药性的分子机制初探	毛磊磊 鄢庆枇 黄力行 张梅梅 王素云 张萌萌 覃映雪	(147)
利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白	王中一 刘庆慧 卢翠玉 黄 捷	(156)
青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响	王 震 公丕海 关长涛 李 娇 史佰佰	(163)
研究简报		
棘头梅童鱼染色体核型分析	梁述章 宋 炜 蒋科技 谌 微 李 羽 马凌波	(172)
酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究	焦 奎 高 翔 于 佳 魏玉西 高 洁 张雪梅 王金梅 李钰金	(178)

第 5 期

研究论文

基于贝叶斯 Schaefer 模型的西北太平洋秋刀鱼资源评估和管理	石永闯 朱清澄 黄硕琳 花传祥	(1)
基于耳石 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的黄、渤海秋季小黄鱼补充群体的种群划分	袁 威 王玉堃 张廷廷 金显仕 孙 耀	(11)
西北太平洋柔鱼适宜栖息地动态变化研究	陆 尧 陈新军 汪金涛 余 景	(19)
荣成近岸养殖海域浮游植物群落结构及与环境因子的关系	潘玉龙 刘 潇 沙婧婧 徐东会 王泰森 刘旭东	(26)
青岛文昌鱼自然保护区营养盐时空分布特征及富营养化评价	王 昊 辛 梅 陈碧鹃 朱 琳 夏 斌 张 艳 孙雪梅 陈聚法 曲克明	(34)
夏季渤海网采浮游植物群落和叶绿素 <i>a</i> 分布特征及其对渔业资源的影响	王毅波 孙延瑜 王彩霞 胡晓珂	(42)
夏季渤海中部表层沉积物重金属空间分布及污染评价	徐 勇 江 涛 杨 茜 崔正国 赵 俊 曲克明	(52)
山东半岛沿岸颗石藻化石的长期记录及其对东亚冬季风的响应	赵永松 杨 庶 单秀娟 金显仕 孙 耀	(62)
基于 MaxEnt 模型预测极北海带在我国黄渤海的适生情况	孙 昕 刘福利 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛	(71)
日照紫菜养殖海域营养盐的时空分布特征及其与浮游植物群落结构的相关性分析	梁洲瑞 孙藤芹 汪文俊 刘福利 曹 原 梁启迪 孙 昕 孙修涛 王飞久	(78)
长江中游常见鱼类 DNA 条形码研究及其电子芯片分析	郜星晨 姜 伟 刘绍平	(89)
长江刀鲚选育群体转录组 EST-SSR 的分布特征分析	于爱清 施永海 徐嘉波 陆根海 张海明 谢永德 刘永士	(101)
四种体色瓯江彩鲤形态性状与体质量的相关性与通径分析	陈红林 司周旋 杜金星 许细丹 王 军 王成辉	(110)
许氏平鲈体质量与形态性状的表型特征分析	刘 阳 韩慧宗 王腾腾 张明亮 王 斐 孙 娜 姜海滨	(117)
草鱼 <i>jam-a</i> 分子在胚胎幼鱼期及受 GCRV 感染 PSF 细胞的表达分析	田园园 焦真真 孙成飞 董浚键 江小燕 胡 婕 叶 星	(126)
病例研究：未知病因的凡纳滨对虾溞状幼体的病原和微生物组分析	孙 静 万晓媛 杨 倩 谢国驷 董 宣 黄 捷	(134)
真蛸早期发育形态特征及生长规律研究	徐大风 刘永胜 常 青 陈四清 赵捷杰 边 力 葛建龙 刘长琳	(145)
水解鱼蛋白对大菱鲆生长、体组成及肌纤维组织形态结构的影响	李本相 卫育良 梁萌青 徐后国 曲江波	(155)
暗纹东方鲀冻藏品品质劣化的原因解析	景电涛 杨 方 余达威 姜启兴 许艳顺 于沛沛 夏文水	(166)
热处理对肉类蛋白质构的影响	胡亚芹 葛雨珺 白 妍 李 苑 丁 甜 陈土国	(175)
南极磷虾虾青素微胶囊制备工艺优化及其理化性质研究	赵永强 谈俊晓 李来好 杨贤庆 魏 涯 岑剑伟 李春生	(185)

研究简报

- 大菱鲂脾肾结节病原菌的分离和鉴定·····李 杰 刘耀宽 白 露 陈四清 阎永伟 莫照兰 (195)

第 6 期

研究论文

- 海湾扇贝骨料不同替代率对人工鱼礁物理性能影响及碳汇作用分析·····史佰佰 公丕海 关长涛 赵荣荣 李 娇 (1)
- 长岛挡浪岛人工鱼礁区生态系统健康评价·····赵荣荣 公丕海 张 艳 袁 伟 关长涛 史佰佰 谢振辉 李 娇 (9)
- 波浪作用下双层网底鲆鲽网箱水动力特性的数值模拟·····崔 勇 关长涛 黄 滨 李 娇 公丕海 (18)
- 基于稳定同位素技术的天津大神堂海域人工鱼礁区食物网结构研究·····张博伦 郭 彪 于 莹 徐晓甫 王 硕 (25)
- 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析·····田永胜 唐 江 马文辉 成美玲 李振通 吴玉萍 张晶晶 王林娜 庞尊方 王晓梅 翟介明 (36)
- 牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析·····王桂兴 张晓彦 孙朝徽 赵雅贤 都 威 侯吉伦 王玉芬 (48)
- 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响·····胡鹏莉 吴 瑞 鲁康乐 王 玲 宋 凯 张春晓 (56)
- 大菱鲂幼鱼对饲料中泛酸最适需求量的研究·····王雅平 李宝山 王际英 王成强 王晓艳 王丽丽 王世信 孙永智 郝甜甜 (66)
- 饲用溶菌酶对吉富罗非鱼消化道组织结构和营养物质消化吸收的影响·····王 坛 赵金鑫 刘东来 孔 纯 华雪铭 吴 钊 王 刚 冯 悦 杨景丰 刘 韬 (76)
- BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲂的急性毒性效应·····迟 潇 夏 斌 朱 琳 陈碧鹃 孙雪梅 赵信国 唐学玺 曲克明 (88)
- 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析·····李炎璐 陈 超 陈建国 翟介明 (98)
- 中华绒螯蟹野生群体和不同水系人工选育群体的遗传多样性分析·····李晶晶 陈丽梅 耿绪云 董学旺 孙金生 (105)
- 池养中华绒螯蟹不同性别形态及质量差异分析·····唐永成 彭 姣 赵运林 徐正刚 丁 一 吴 良 (114)
- 魁蚶 Ets 家族 9 个基因的克隆及其在病毒感染应答中的表达分析·····魏智薪 辛鲁生 白昌明 李亚楠 张淑敏 李成华 王崇明 (121)
- 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆及其参与调控程序性细胞死亡研究·····张恒宇 柳逸群 葛 源 (131)
- 温度对浒苔生长及不同氮源吸收特性的影响·····葛红星 陈 钊 李 健 常志强 赵法箴 (138)
- 二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和油脂积累的影响·····岳陈陈 余旭亚 赵永腾 王惠萍 (145)
- 刺参养殖池塘中一株植物乳杆菌的分离及其生物学特性·····张永刚 李 彬 王印庚 王金燕 廖梅杰 张 正 宁鲁光 范瑞用 (154)
- 杂色角孔海胆形态学观察、亲缘关系及性腺营养成分分析·····赵文飞 李 喆 黄小芳 张 杨 丁 君 常亚青 (163)
- 中华鳖 *GHITM* cDNA 基因克隆及表达分析·····熊 钢 周先文 马 晓 曾 丹 陈贞年 康 骊 王晓清 (173)
- 装甲 RNA 在牡蛎中诺如病毒 4 种 RNA 提取方法比较研究中的应用·····曲 梦 江艳华 李风铃 姚 琳 逢凤娇 王联珠 翟毓秀 (180)
- 大菱鲂不同部位营养与质构品质分析评价·····邹朝阳 赵 峰 王 志 欧 帅 王 轰 李国栋 周德庆 (186)
- 低温冷藏对带鱼肌肉蛋白的影响·····沈 妮 吴甜甜 李 苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹 (196)
- 壳聚糖-柑橘精油微胶囊制备工艺优化及其在凡纳滨对虾保鲜中的应用·····姚洁玉 李 苑 江杨阳 陈士国 胡亚芹 (203)

Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 40, 2019

No.1

- Study on Optimizing Sampling Design of Multi-Objective Fishery-Independent Surveys: A Case Study in the Bohai Sea
 HAN Qingpeng, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, WAN Rong, DING Qi, CHEN Yunlong, YANG Tao (1)
- Establishment and Optimization of Environmental DNA Detection Techniques for Assessment of *Fenneropenaeus chinensis*
 Biomass LI Miao, SHAN Xiujuan, WANG Weiji, LÜ Ding, DAI Fangqun, DING Xiaosong, WU Huanhuan (12)
- Calibration of Long-Term Change of Heavy Metal Content and the Heavy Metal Background in the Muddy Area of the Middle
 Yellow Sea Sediments of China YANG Qian, YANG Shu, SUN Yao (20)
- The Response of Different Types of Phytoplankton to the Elevated CO₂ Concentration
 MA Sha, ZHANG Jihong, LIU Yi, WU Wenguang, SUN Ke, WANG Wei, SUI Juanjuan, ZHAO Yunxia, YANG Yanyun (27)
- Dynamic Changes of Phytoplankton Composition During Cyanobacteria Blooms in Aquaculture Ponds
 CHANG Mengyang, LI Chenlu, DONG Jing, SHANG Xiangyang, WANG Jiahui, NIU Mengmeng (36)
- Genetic Diversity of *Liza affinis* in Coastal Waters of China Deduced from Mitochondrial *CO I* Sequences
 HUANG Zhenyu, ZHANG Qun, LU Lifeng, ZHOU Qi, TANG Chulin (46)
- Development of a Universal 96 Single Nucleotide Polymorphism Array for Salmonid Fishes
 TAI Ruyu, XU Jian, JIANG Yanliang, ZHANG Hanyuan, BAI Qingli, YANG Shiyong, XU Peng, ZHAO Zixia (53)
- RAS from *Litopenaeus vannamei* Interacts with WSSV-VP26 *in vitro* WANG Zhongyi, LIU Qinghui, HUANG Jie (62)
- Comparison of WSSV-Resistant Traits of Different Commercial Larvae of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*
 DONG Lijun, LUO Kun, CAO Jiawang, CHEN Baolong, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, SUI Juan, MENG Xianhong (69)
- Effect of Stocking Density on Intermediate Cultivation of *Litopenaeus vannamei* Postlarvae
 ZHANG Long, CHEN Zhao, WANG Lu, CHEN Shibo, ZHANG Peng, QU Keming, LI Qiufen, ZHU Jianxin (76)
- Cloning and Expression Analysis of Hemoglobin Gene I of *Scapharca broughtonii*
 ZHAO Qing, WU Biao, LIU Zhihong, SUN Xiujun, ZHOU Liqing, YANG Aiguo, ZHANG Gaowei (84)
- The Cloning of the *PtDNMT1* Gene of *Portunus trituberculatus* and Its Expression Analysis in Low Salinity Adaptation
 HUAN Pengpeng, LÜ Jianjian, SUN Dongfang, GAO Baoquan, LIU Ping (92)
- Validation of SNPs Associated with Important Economic Traits of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)
 LIU Anran, LIAO Meijie, LI Bin, WANG Yingeng, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong, CHEN Guiping (101)
- Effects of Dietary Vitamin D₃ on Growth Performance, Body Composition, and Antioxidant Capacity of the Juvenile Sea
 Cucumber WANG Lili,
 LI Baoshan, WANG Jiying, SUN Yongzhi, HAN Xiujie, WANG Yaping, HAO Tiantian, WANG Shixin (110)
- Isolation, Identification, and Biological Characteristics of a Pathogenic Bacterial Strain from Cage-Cultured Black Rockfish
 (*Sebastes schlegelii*) WANG Kai, WANG Yingeng, JIANG Yong, ZHANG Zheng, YU Yongxiang, LIAO Meijie (119)
- The Metabolism of Arsenobetaine in Antarctic Krill Oil in Rats
 QIU Amin, LIU Xiaofang, TANG Yixin, WANG Xiaobin, ZHANG Huizhen, LENG Kailiang (127)
- Effects of Different Nitrogen Sources and Environmental Factors on the Nitrogen Removal Performance of *Bacillus hwajinpoensis*
 SLWX₂ WANG Yue, CHENG Yu, LI Qiufen, ZHANG Yan (133)
- Synthesis of 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives and Its Antiparasitic Activity Against *Ichthyophthirius*
multifiliis in vitro
 YAO Jiayun, XU Yang, YUAN Xuemei, LIN Lingyun, YIN Wenlin, PAN Xiaoyi, HAO Guijie, SHEN Jinyu (141)
- Taste Characteristic Analysis of *Porphyra yezoensis* During Different Harvest Periods: A Study Based on Electronic Tongue
 Technology CAO Rong, ZHAO Ling, WANG Lianzhu, SUN Huihui, LIU Qi (147)
- Optimization of Rinsing Process for Sturgeon Surimi and Its Effects on Production Quality
 TANG Shuwei, GAO Ruichang, ZHAO Yuanhui, ZENG Mingyong, FENG Qiufeng, CHEN Yiping (155)
- Preliminary Discussion on the Development of *Saccharina japonica* Offshore Aquaculture in China
 LIU Fuli, LIANG Zhourui, ZHANG Pengyan, WANG Wenjun, SUN Xiutao, WANG Feijiu, YUAN Yanmin (161)
- Research Advances in Nutritional Requirement and Feed of *Trachinotus ovatus* LI Yuanyou, LI Mengmeng, WANG Meng,
 ZHANG Mei, MA Yongcai, ZHANG Guanrong, CHEN Hanyi, NING Lijun, XIE Dizhi, WANG Shuqi, YOU Cuihong (167)

No.2

- 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)

No.3

- Comparative Analysis of CPUE of Different Fishing Types in the South China Sea Based on the Fishing Port Sampling Survey TAO Yajin, YI Murong, LI Bo, FENG Bo, LU Huosheng, YAN Yunrong (1)

Spatial Distribution of the Fish Community and Its Relationship with Environmental Factors in the Bortala River in Winter LIU Hong, NIU Jiangong, LIU Chunchi, XIE Peng, LIANG Jiefeng, CAI Lingang, MA Xufa, ZHANG Renming	(11)
Impact of Seawater Acidification on the Energy Budget of <i>Mytilus galloprovincialis</i> WANG Xiaoqin, Samuel P.S. Rastrick, WU Yalin, FANG Jinghui, DU Meirong, GAO Yaping, LIN Fan, JIANG Weiwei, LI Fengxue, WANG Junwei, ZHANG Yitao, FANG Jianguang, JIANG Zengjie	(21)
Model Simulated Growth of Kelp <i>Saccharina japonica</i> in Sanggou Bay CAI Biying, ZHU Changbo, LIU Hui, CHANG Lirong, XIAO Luyang, SUN Qianwen, LIN Fan	(31)
The Impact of Hydraulic Retention Time on an Anaerobic Reactor's Nitrogen Removal Effect WANG Zhenlin, ZHU Jianxin, QU Keming, CHEN Shibo	(42)
Acute Toxicity Effects of Suspended Solids Stress on <i>Fenneropenaeus chinensis</i> Larvae QIAO Yanlong, YIN Xiaoya, XIAO Guangxia, WANG Liping	(50)
Cloning and Expression Analysis of <i>efhd2</i> and <i>tbc1d25</i> Gene in Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) HOU Jilun, GUO Yanan, FU Yuanshuai, WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SUN Zhaohui, SI Fei, WANG Yufen	(57)
Cloning, Tissue Expression Profiling, Functional Characterization of Corticotropin-Releasing Hormone (<i>crh</i>) on Feeding in Gibel Carp (<i>Carassius auratus gibelio</i>) ZHOU Chaowei, LEI Luo, DENG Xingxing, YUAN Dengyue, YANG Minmin, CAO Gaoxiang, ZHU Haixing, LI Yan, ZHU Chengke, LI Daijin, TANG Renjun, ZHANG Guizhong, LI Lukuan, ZHENG Zonglin	(69)
Histology and Distribution of Mucous Cells in Digestive System of <i>Bahaba flavolabiata</i> ZHAO Yanhua, OU Youjun, LI Jiaer, WEN Jiufu, ZHOU Hui	(80)
Morphological Description and Molecular Phylogeny of the <i>Gussevia asota</i> Parasite on <i>Astronotus ocellatus</i> XIE Zhisheng, MA Jiangxia, YANG Kunming, DUAN Chengren, GUO Aimin, YUE Cheng	(87)
Analysis of SSR Information in EST Resource of Decapod Crustaceans GAO Haiyu, LI Jian, WANG Jiajia, LI Jitao	(94)
Histopathology of Hybrid Grouper (<i>Epinephelus bruneus</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂) Naturally Infected with Red Seabream Iridovirus (RSIV) LIU Ranyang, SHI Chengyin, XIE Guosi, LI Chen, WANG Haibo	(103)
Effects of Single or Mixed <i>Bacillus</i> on WSSV Infection and Immune-Related Gene Expression in <i>Litopenaeus vannamei</i> SUN Bochao, YANG Yunkai, LI Yuhong, SONG Xiaoling, HUANG Jie	(113)
Evaluation on the Detection of <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> in Pooled DNA Samples of <i>Litopenaeus vannamei</i> Based on TaqMan qPCR SONG Zenglei, DONG Xuan, ZHAO Ruoheng, WANG Xiuhua, WU Heying, YU Danghui, XIE Guosi, HUANG Jie	(122)
Comparison of Three High-Throughput Viable Counting Techniques for Aquatic Pathogenic Bacteria ZOU Peizhuo, YANG Qian, DONG Xuan, XIE Guosi, HUANG Jie	(133)
Effects of <i>Gracilaria verrucosa</i> , <i>Enteromorpha prolifera</i> , Algae Residue and Fungi Residue on Growth Performance, and Related Biochemical Indices of Juvenile <i>Takifugu rubripes</i> GUO Bin, LIANG Mengqing, XU Houguo, WEI Yuliang, ZHANG Qinggong, LI Benxiang, LIAO Zhangbin	(141)
Comparison and Evaluation of Nutritional Components in the Muscle of Male and Female <i>Centropristis striata</i> ZHAO Tingting, CHEN Chao, SHAO Yanxiang	(151)
Application Research of Five Seaweeds in Juvenile Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka) WANG Xiaoyan, QIAO Hongjin, HUANG Bingshan, WANG Chengqiang, LI Peiyu, LI Baoshan, WANG Jiyong	(160)
Effects of Different Light Quality and Stress Treatments on Photosynthetic Efficiencies and Physiological Characteristics of <i>Sargassum thunbergii</i> and Epiphyllous Algae YUAN Yanmin, LIU Fuli, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao	(168)
Research Progress on Microplastics Pollution in Marine Fishery Water and Their Biological Effects XIA Bin, DU Yushan, ZHAO Xinguo, ZHU Lin, CHEN Bijuan, SUN Xuemei, QU Keming	(178)

No.4

Dietary Methionine Requirement of Juvenile Tiger Puffer (<i>Takifugu rubripes</i>) ZHANG Qinggong, LIANG Mengqing, XU Houguo, WEI Yuliang	(1)
Effects of Replacement of Fish Meal With an Animal and Plant Protein Mixture on Growth, Body Composition, and Physiological and Biological Indices of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.) HAO Tiantian, WANG Jiyong, LI Baoshan, SONG Zhidong, HUANG Bingshan, SUN Yongzhi, WANG Yaping, WANG Xiaoyan	(11)

- Effects of Replacement of Dietary Fish Meal by *Nannochloropsis* sp. Meal on Growth Performance, Body Composition, and Serum Biochemical Indices of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) HU Dongxue, MA Ji, WANG Chengqiang, QIAO Hongjin, WANG Jiying, LI Baoshan, SUN Yongzhi (21)
- Effects of Replacement of Fish Meal with Silkworm Powder on Growth Performance, Feed Intake, and Body Composition of Juvenile Black Bass (*Micropterus salmonides*) RAO Yuan, XIANG Xiao, HUANG Xianzhi, DUAN Biao (31)
- Growth and Fatty Acid Composition of Juvenile Spotted Halibut (*Verasper variegatus*) Fed Diets with Fish Oil Replaced by Soybean Oil ZHENG Jianming, ZHAO Jiejie, CHEN Siqing, CHANG Qing, YAN Junli, ZHU Zhifa, LIU Changlin, HU Jiancheng (39)
- Effects of Dietary *Bacillus subtilis* and Yeast Culture on Growth, Serum Biochemical Indices and Antioxidant Capacity of Juvenile Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) WANG Chengqiang, LI Baoshan, WANG Jiying, HUANG Bingshan, SUN Yongzhi, HAO Tiantian, MA Changxing, ZHOU Ying (47)
- Analysis on Genetic Diversity of Three Breeding Populations of Largemouth Bass Using Formulated Feeds FAN Jiajia, BAI Junjie, LI Shengjie, MA Dongmei, JIANG Peng (57)
- Use of Strontium Chloride in Otolith Marking of Japanese Flounder SI Fei, WANG Qinglin, YU Qinghai, LIU Hongbo, JIANG Tao, YANG Jian, WANG Jun (65)
- Analysis of the Morphological Differences Between Hybrid “*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and Its Parents LI Zhentong, CHENG Meiling, TIAN Yongsheng, TANG Jiang, MA Wenhui, HOU Yunxia, WANG Xiaomei, ZHAI Jieming (73)
- Turbot (*Scophthalmus maximus*) Biodiversity Assessment Using High-Throughput Illumina Sequencing to Analyze Juvenile Turbot Intestines and Their Bacterial Cultures WU Huanhuan, WANG Weiji, LÜ Ding, HU Yulong, KONG Jie (84)
- Characterization and Recombinant Protein Expression of Interleukin-15 from Roughskin Sculpin, *Trachidermus fasciatus* LIU Yingying, YU Shanshan, CHAI Yingmei, LIN Xiaopeng, ZHU Qian (95)
- Tracking of Shrimp Multiple Pathogens in a Shrimp Farm WU Heying, WANG Xiuhua, YANG Bing, YU Danghui, HUANG Jie (104)
- Effects of Light Intensities on the Growth and Biochemical Characteristics of *Laminaria hyperborea* Young Seedling LIANG Zhou Rui, LIU Fuli, DU Xinxin, YUAN Yanmin, LIANG Qidi, WANG Wenjun, SUN Xiutao, WANG Feijiu (115)
- Effects of Culture Conditions on Nutrient Composition of *Sargassum horneri* LUAN Qing, LÜ Fang, WU Haiyi, DING Gang, ZHAN Dongmei (123)
- The cDNA Cloning and Expression Analysis of the *Hsp70* Gene from *Pyropia guangdongensis* ZENG Jun, CHEN Weizhou, CHEN Zepan, LIU Haoran (131)
- Isolation and Identification the Pathogen of *Pyropia yezoensis* Green Spot Disease LI Jie, MOU Zongjuan, YANG Huichao, MAO Yunxiang, YAN Yongwei, MO Zhaolan (140)
- Molecular Mechanism of *luxR* Regulation of Drug Resistance of *Aeromonas hydrophila* MAO Leilei, YAN Qingpi, HUANG Lixing, ZHANG Meimei, WANG Suyun, ZHANG Mengmeng, QIN Yingxue (147)
- Identification of the Host Interactors of wsv112 of WSSV by Yeast Two-Hybrid WANG Zhongyi, LIU Qinghui, LU Cuiyu, HUANG Jie (156)
- Effect of Different Artificial Reefs on the Community Structure of Organisms in Shique Beach of Qingdao WANG Zhen, GONG Pihai, GUAN Changtao, LI Jiao, SHI Baibai (163)
- Karyotype Analysis of *Collichthys lucidus* LIANG Shuzhang, SONG Wei, JIANG Keji, CHEN Wei, LI Yu, MA Lingbo (172)
- Study of the Preparation of Compound Amino Acid-Chelated Calcium by Protease Hydrolysis of Scallop Skirts JIAO Kui, GAO Xiang, YU Jia, WEI Yuxi, GAO Jie, ZHANG Xuemei, WANG Jinmei, LI Yujin (178)

No.5

- Stock Assessment of Pacific Suary (*Cololabis Saira*) in the Northwest Pacific Using a Bayesian Schaefer Model SHI Yongchuang, ZHU Qingcheng, HUANG Shuolin, HUA Chuanxiang (1)
- Investigating the Population Structure of *Larimichthys polyactis* from the Yellow Sea and Bohai Sea Using Stable Isotope Mass Spectrometry YUAN Wei, WANG Yukun, ZHANG Tingting, JIN Xianshi, SUN Yao (11)
- Dynamics of Suitable Habitat of *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific Ocean LU Yao, CHEN Xinjun, WANG Jintao, YU Jing (19)

Influence of Environmental Factors on Phytoplankton Community Structure and Its Relationship with Coastal Aquaculture in the Waters Adjacent to Rongcheng·····PAN Yulong, LIU Xiao, SHA Jingjing, XU Donghui, WANG Taisen, LIU Xudong	(26)
Temporal and Spatial Variation of Nutrients and Evaluation of the Eutrophication in the Qingdao Lancelet Reserve Area in 2017 ·····WANG Hao, XIN Mei, CHEN Bijuan, ZHU Lin, XIA Bin, ZHANG Yan, SUN Xuemei, CHEN Jufa, QU Keming	(34)
Distribution of the Net-Phytoplankton Community and Chlorophyll- <i>a</i> in the Bohai Sea in Summer and Its Impacts on Fishery Resources ····· WANG Yibo, SUN Yanyu, WANG Caixia, HU Xiaoke	(42)
Distribution Characteristics and Pollution Assessment of Heavy Metals in the Surface Sediments of the Central Region of the Bohai Sea During the Summer ·····XU Yong, JIANG Tao, YANG Qian, CUI Zhengguo, ZHAO Jun, QU Keming	(52)
Sedimentary Record of <i>Coccolithophore</i> Assemblages in the Coastal of Shandong Peninsula and Their Response to the East Asian Winter Monsoon·····ZHAO Yongsong, YANG Shu, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, SUN Yao	(62)
Potential Geographic Distribution of <i>Laminaria hyperborea</i> in the Bohai and Huanghai Seas of China Based on MaxEnt Model ·····SUN Xin, LIU Fuli, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao	(71)
The Temporal and Spatial Distribution Characteristics of the Nutrients and Community Structures of Phytoplankton and Their Relationships in the <i>Pyropia</i> culture Areas of Rizhao, China ····· LIANG Zhourui, SUN Tengqin, WANG Wenjun, LIU Fuli, CAO Yuan, LIANG Qidi, SUN Xin, SUN Xiutao, WANG Feijiu	(78)
DNA Barcoding and Electronic Microarrays for Common Fish Species in the Middle Reaches of the Yangtze River····· ·····GAO Xingchen, JIANG Wei, LIU Shaoping	(89)
Characteristic Analysis of Microsatellites in Selected <i>Coilia ectenes</i> Using a Transcriptome Dataset ····· ·····YU Aiqing, SHI Yonghai, XU Jiabo, LU Genhai, ZHANG Haiming, XIE Yongde, LIU Yongshi	(101)
Correlation and Path Coefficient Analysis of the Morphometric Traits and Body Weight for the Four Color Patterns of Oujiang Color Common Carp·····CHEN Honglin, SI Zhouxuan, DU Jinxing, XU Xidan, WANG Jun, WANG Chenghui	(110)
Phenotypic Analysis of the Main Morphological Traits and Body Weight of Black Rockfish (<i>Sebastes schlegelii</i>) ····· ·····LIU Yang, HAN Huizong, WANG Tengteng, ZHANG Mingliang, WANG Fei, SUN Na, JIANG Haibin	(117)
Expression Analysis of <i>jam-as</i> in GCRV-infected Grass Carp (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>) PSF Cells and During the Embryo and Juvenile Stages····· ·····TIAN Yuanyuan, JIAO Zhenzhen, SUN Chengfei, DONG Junjian, JIANG Xiaoyan, HU Jie, YE Xing	(126)
Case Studies: Pathogenic Agent and Microbiome Analysis for Zoea of <i>Litopenaeus vannamei</i> Suffering from an Unknown Disease····· SUN Jing, WAN Xiaoyuan, YANG Qian, XIE Guosi, DONG Xuan, HUANG Jie	(134)
Morphology, Growth and Development in the Early Life of <i>Octopus vulgaris</i> ····· ·····XU Dafeng, LIU Yongsheng, CHANG Qing, CHEN Siqing, ZHAO Jiejie, BIAN Li, GE Jianlong, LIU Changlin	(145)
The Effects of Fish Protein Hydrolysate on the Growth, Body Composition and Morphological Structure of Muscle Fiber of Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.) ····LI Benxiang, WEI Yuliang, LIANG Mengqing, XU Houguo, QU Jiangbo	(155)
Reasons for Quality Deterioration of Obscure Pufferfish Fillets During Frozen Storage ····· ·····JING Diantao, YANG Fang, YU Dawei, JIANG Qixing, XU Yanshun, YU Peipei, XIA Wenshui	(166)
Effect of Heat Treatments on the Protein Structures and Meat Textural Properties ····· ·····HU Yaqin, GE Yujun, BAI Yan, LI Yuan, DING Tian, CHEN Shiguo	(175)
Optimization of the Preparation Process and the Physicochemical Properties of Antarctic Krill Astaxanthin Microcapsules ·····ZHAO Yongqiang, TAN Junxiao, LI Laihao, YANG Xianqing, WEI Ya, CEN Jianwei, LI Chunsheng	(185)
Isolation and Identification of <i>Mycobacterium marinum</i> Associated with Splenic and Renal Granuloma Disease of Cultured Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) ····LI Jie, LIU Yaokuan, BAI Lu, CHEN Siqing, YAN Yongwei, MO Zhaolan	(195)

No.6

Influence of Different Replacement Rates of <i>Argopecten irradians</i> Aggregate on Physical Properties of Artificial Reefs and Carbon Sequestration ····· SHI Baibai, GONG Pihai, GUAN Changtao, ZHAO Rongrong, LI Jiao	(1)
Ecosystem Health Assessment of Artificial Reef Area in Long Island ····· ·····ZHAO Rongrong, GONG Pihai, ZHANG Yan, YUAN Wei, GUAN Changtao, SHI Baibai, XIE Zhenhui, LI Jiao	(9)
Numerical Simulation of the Hydrodynamic Characteristics of Double-Bottom Cage for Flounder Fish Under Waves····· ·····CUI Yong, GUAN Changtao, HUANG Bin, LI Jiao, GONG Pihai	(18)

- Study of the Food-Web Structure in the Dashentang Artificial Reef Area in Tianjin Using a Stable Isotope Technique ZHANG Bolun, GUO Biao, YU Ying, XU Xiaofu, WANG Shuo (25)
- Development and Growth of Hybrid Offspring of Brown Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × Blue Speckled Grouper *Epinephelus tulcula* (♂) Using Cryopreserved Sperm TIAN Yongsheng, TANG Jiang, MA Wenhui, CHENG Meiling, LI Zhentong, WU Yuping, ZHANG Jingjing, WANG Linna, PANG Zunfang, WANG Xiaomei, ZHAI Jieming (36)
- Genetic Analysis of Four Generations of a Successive Meiogynogenetic Population in the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SUN Zhaohui, ZHAO Yaxian, DU Wei, HOU Jilun, WANG Yufen (48)
- Effects of Replacing Fish Meal with Composite Protein on Growth, Diet Digestibility, and Gut Health in Japanese Seabass (*Lateolabrax maculatus*) HU Pengli, WU Rui, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao (56)
- Study on the Optimum Dietary Pantothenic Requirement of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) WANG Yaping, LI Baoshan, WANG Jiying, WANG Chengqiang, WANG Xiaoyan, WANG Lili, WANG Shixin, SUN Yongzhi, HAO Tiantian (66)
- Effects of Dietary Lysozyme on the Digestive Tract Structure and Nutrient Digestibility of GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*) WANG Tan, ZHAO Jinxin, LIU Donglai, KONG Chun, HUA Xueming, WU Zhao, WANG Gang, FENG Yue, YANG Jingfeng, LIU Tao (76)
- Acute Toxicity of Four Polybrominated Diphenyl Ether Congeners to Marine Organisms: *Chlorella pyrenoidosa*, *Daphnia magna*, and *Scophthalmus maximus* CHI Xiao, XIA Bin, ZHU Lin, CHEN Bijuan, SUN Xuemei, ZHAO Xinguo, TANG Xuexi, QU Keming (88)
- DNA Methylation Analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and Their F₁ Hybrid LI Yanlu, CHEN Chao, CHEN Jianguo, ZHAI Jieming (98)
- Genetic Diversity Analysis of Wild and Cultured Population of *Eriocheir sinensis* from Different Water Systems LI Jingjing, CHEN Limei, GENG Xuyun, DONG Xuewang, SUN Jinsheng (105)
- Morphological Attributes and Quality Parameters of Different Sexes of *Eriocheir sinensis* Cultured in a Pond TANG Yongcheng, PENG Jiao, ZHAO Yunlin, XU Zhenggang, DING Yi, WU Liang (114)
- Cloning of Nine Genes in the Ets Family of Ark Clam (*Scapharca broughtonii*) and Their Expression in Response to Oyster Herpes Virus (OsHV-1) Infection WEI Zhixin, XIN Lusheng, BAI Changming, LI Yanan, ZHANG Shumin, LI Chenghua, WANG Chongming (121)
- Cloning of the Metacase Type I Gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and Its Involvement in the Regulation of Programmed Cell Death ZHANG Hengyu, LIU Yiqun, GE Yuan (131)
- Effects of Temperature on the Growth Rate and Nitrogen Uptake of *Ulva prolifera* GE Hongxing, CHEN Zhao, LI Jian, CHANG Zhiqiang, ZHAO Fazhen (138)
- Effects of Butylated Hydroxytoluene on Accumulation of Astaxanthin and Lipids in *Haematococcus pluvialis* LUGU YUE Chenchen, YU Xuya, ZHAO Yongteng, WANG Huiping (145)
- Screening and Characteristic Analysis of *Lactobacillus plantarum* from Ponds for Sea Cucumber Farming ZHANG Yonggang, LI Bin, WANG Yingeng, WANG Jinyan, LIAO Meijie, ZHANG Zheng, NING Luguang, FAN Ruiyong (154)
- Morphological Observation, Relationship and Nutritional Composition Analysis of Gonadal of *Salmacis sphaeroides variegata* ZHAO Wenfei, LI Zhe, HUANG Xiaofang, ZHANG Yang, DING Jun, CHANG Yaqing (163)
- Molecular Cloning and Expression Analysis of *HGITM* cDNA in *Trionyx sinensis* XIONG Gang, ZHOU Xianwen, MA Xiao, ZENG Dan, CHEN Zhennian, KANG Li, WANG Xiaoqing (173)
- Application of Armored RNA to Compare Four Norovirus RNA Extraction Methods in Oysters QU Meng, JIANG Yanhua, LI Fengling, YAO Lin, PANG Fengjiao, WANG Lianzhu, ZHAI Yuxiu (180)
- Analysis and Evaluation of Nutrition and Texture Quality in Different Parts of Turbot (*Scophthalmus maximus*) ZOU Zhaoyang, ZHAO Feng, WANG Zhi, OU Shuai, WANG Hong, LI Guodong, ZHOU Deqing (186)
- Effect of Chilling Storage on the Muscle Protein of Hairtail SHEN Ni, WU Tiantian, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin (196)
- Optimization of Chitosan-Citrus Essential Oil Microcapsules for Application in the Preservation of *Litopenaeus vannamei* YAO Jieyu, LI Yuan, JIANG Yangyang, CHEN Shiguo, HU Yaqin (203)

《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6期 2019年12月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.40 No.6 Dec. 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.yyqxjz.cn>
E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn
主 编 金显仕
印 刷 青岛国彩印刷有限公司
国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司
订 购 全国各地邮政局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture 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.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn
Editor-in-Chief Jin Xianshi
Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China
Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation
P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发行

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869

