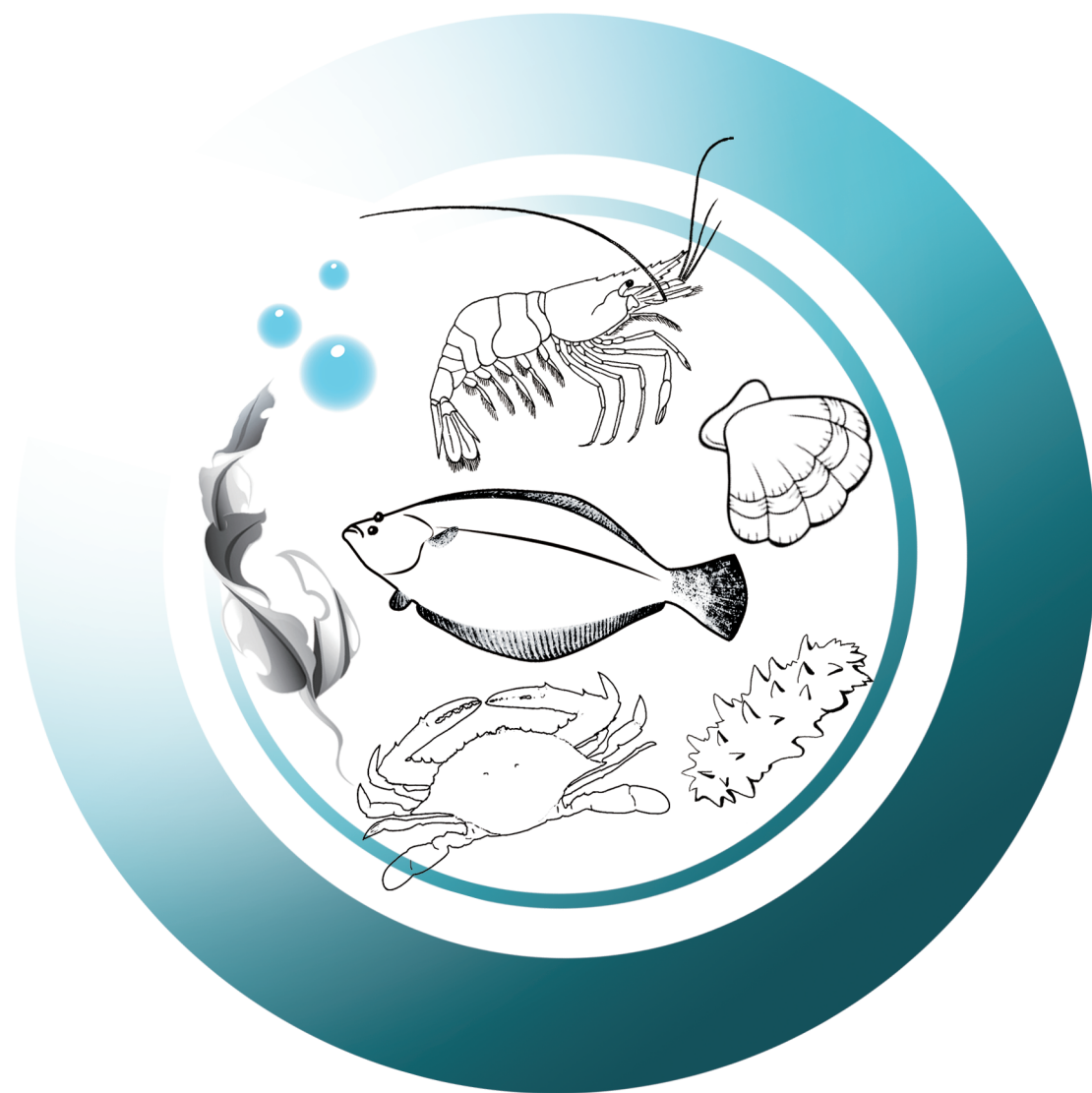


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第41卷 VOL.41 第1期 NO.1



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 41 卷 第 1 期

2020 年 2 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

- 黄、东海渔业资源群落结构变化研究·····戴芳群 朱 玲 陈云龙 (1)
- 基于遥感的黄海中西部越冬鳀资源密度分布与环境因子的关系研究·····
·····牛明香 王 俊 吴 强 孙坚强 (11)
- 崂山近岸浮游植物群落结构季节变化及其环境影响因素·····
·····柴 然 冯 娟 陈碧鹃 夏 斌 孙雪梅 王晓晓 陈聚法 崔正国 曲克明 (21)
- 桑沟湾浮游植物粒径结构及其与环境因子的关系·····
·····李凤雪 蒋增杰 高亚平 杜美荣 王晓芹 李文豪 侯 兴 董世鹏 王军威 张义涛 (31)
- 基于 GIS 的桑沟湾及周围海域海带养殖适宜性评价·····
·····孙倩雯 刘 慧 尚伟涛 于良巨 姜晓鹏 蔡碧莹 常丽荣 肖露阳 (41)
- 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例·····
·····李 苗 单秀娟 王伟继 丁小松 戴芳群 吕 丁 吴欢欢 (51)
- 海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较·····唐隆晨 钟晨辉 林 琪 陆 振 黄瑞芳 宦忠艳 (58)
- 养殖水电化学同步脱氮响应面优化与验证·····张 鹏 张 龙 陈世波 朱建新 (66)
- 基于多个线粒体序列的中韩俄沿海不同地理群体刺参的遗传多样性及种群结构分析·····
·····王锦锦 廖梅杰 李 彬 王印庚 荣小军 张 正 葛建龙 (75)
- 高温胁迫条件下大菱鲂肾脏转录组研究·····杨 凯 黄智慧 马爱军 刘晓菲 杨双双 (86)
- 不同培育水温和饲料对刺参人工促熟效果的影响·····
·····谭 杰 李凤辉 陈四清 马添翼 陈爱华 葛建龙 孙慧玲 王 亮 (96)
- 绿鳍马面鲀幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究·····张鹏飞 常 青 陈四清 徐郑鑫 赵捷杰 (104)
- 盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响·····温久福 蓝军南 曹 明 周 慧 区又君 李加儿 (112)
- 尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系建立及优化·····
·····康 恺 吴 江 苑麟勇 刘丽欢 陈永灵 效 梅 安立龙 (119)
- 脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及其表达特征分析·····
·····孙金秋 徐莞媛 马杭柯 高 威 欧阳乐飞 高 焕 阎斌伦 (127)
- 养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究·····
·····张艳楠 王印庚 刘福利 廖梅杰 李 彬 张 正 梁洲瑞 于永翔 荣小军 (135)
- 日本米虾胚胎发育及离体孵化·····曹林泉 秦 政 姜玉声 刘 鑫 李晓东 林 源 黄楷涛 刘 胥 (145)
- LED 光源在海水养殖水体中传播特征解析·····
·····张延青 秦 菲 费 凡 李笑天 黄 滨 赵奎峰 刘宝良 (153)
- LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响·····
·····魏平平 李 鑫 张俊鹏 费 凡 马 贺 高东奎 宋昌斌 陈 涛 刘 鹰 (162)
- 苦草粉对草鱼幼鱼生长性能与生理生化性能的影响·····
·····黄仲园 何文辉 彭自然 刘玉超 华雪铭 冯 悦 李 向 左 琳 (169)
- 冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化·····
·····陈依萍 崔文萱 高瑞昌 李渐鹏 曾名湧 唐淑玮 冯秋凤 赵元晖 (178)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.41 No.1 February 2020

Variations of Fishery Resource Structure in the Yellow Sea and East China Sea	DAI Fangqun, ZHU Ling, CHEN Yunlong	(1)
The Relationship of Stock Density Distribution of Wintering Anchovy (<i>Engraulis japonicus</i>) and Environmental Factors Based on Remote Sensing in Central and Southern Yellow Sea	NIU Mingxiang, WANG Jun, WU Qiang, SUN Jianqiang	(11)
Seasonal Variations in the Phytoplankton Community Structure and Their Environmental Impact Factors in the Offshore Area of Laoshan, Qingdao	CHAI Ran, FENG Juan, CHEN Bijuan, XIA Bin, SUN Xuemei, WANG Xiaoxiao, CHEN Jufa, CUI Zhengguo, QU Keming	(21)
Distribution of Size-Fractionated Phytoplankton and Its Relationship with Environmental Variables in Sanggou Bay	LI Fengxue, JIANG Zengjie, GAO Yaping, DU Meirong, WANG Xiaojin, LI Wenhao, HOU Xing, DONG Shipeng, WANG Junwei, ZHANG Yitao	(31)
GIS-Based Assessment for Culture Suitability of Kelp (<i>Saccharina japonica</i>) in Sanggou Bay and the Surrounding Waters	SUN Qianwen, LIU Hui, SHANG Weitao, YU Liangju, JIANG Xiaopeng, CAI Biying, CHANG Lirong, XIAO Luyang	(41)
Studying the Retention Time of <i>Fenneropenaeus chinensis</i> eDNA in Water	LI Miao, SHAN Xiujuan, WANG Weiji, DING Xiaosong, DAI Fangqun, LÜ Ding, WU Huanhuan	(51)
Comparative Study on the Community Structure of Epiphytic Bacteria in Sporophyte and Gametophyte Stages of Kelp <i>Saccharina japonica</i>	TANG Longchen, ZHONG Chenhui, LIN Qi, LU Zhen, HUANG Ruifang, HUAN Zhongyan	(58)
Optimization and Validation of Electrochemical Technology for Simultaneous Nitrogen Removal in Aquaculture by Using Response Surface Methodology	ZHANG Peng, ZHANG Long, CHEN Shibo, ZHU Jianxin	(66)
Genetic Diversity and Population Structure of Different Geographical Populations of Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>) from China, South Korea and Russia Based on Mitochondrial Genes	WANG Jinjin, LIAO Meijie, LI Bin, WANG Yingeng, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, GE Jianlong	(75)
Transcriptome Study of Kidney of Turbot under High-Temperature Stress	YANG Kai, HUANG Zhihui, MA Aijun, LIU Xiaofei, YANG Shuangshuang	(86)
Effect of Temperature and Diet on the Reproductive Condition of Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> Broodstock	TAN Jie, LI Fenghui, CHEN Siqing, MA Tianyi, CHEN Aihua, GE Jianlong, SUN Huiling, WANG Liang	(96)
Diet Feeding Rhythm and Analysis of Gastric Evacuation Associated Mathematical Models in Juvenile <i>Thamnaconus septentrionalis</i>	ZHANG Pengfei, CHANG Qing, CHEN Siqing, XU Zhengxin, ZHAO Jiejie	(104)
Effects of Salinity on the Histological Structure of the Gills, Spleen, and Muscle in <i>Lateolabrax maculatus</i> Juveniles	WEN Jiufu, LAN Junnan, CAO Ming, ZHOU Hui, OU Youjun, LI Jiaer	(112)
Establishment and Optimization of an Isolation and Culture System for Sertoli Cells of Nile Tilapia	KANG Kai, WU Jiang, YUAN Linyong, LIU Lihuan, CHEN Yongling, XIAO Mei, AN Lilong	(119)
Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (<i>SHMT</i>) Genes from <i>Exopalamon carinicauda</i>	SUN Jinqiu, XU Wanyuan, MA Hangke, GAO Wei, OUYANG Lefei, GAO Huan, YAN Binlun	(127)
Etiology of Black-Brown Disease in Cultured <i>Caulerpa lentillifera</i>	ZHANG Yannan, WANG Yingeng, LIU Fuli, LIAO Meijie, LI Bin, ZHANG Zheng, LIANG Zhourui, YU Yongxiang, RONG Xiaojun	(135)
Embryonic Development of <i>Caridina japonica</i> and <i>in vitro</i> Incubation of Its Fertilized Eggs	CAO Linquan, QIN Zheng, JIANG Yusheng, LIU Xin, LI Xiaodong, LIN Yuan, HUANG Kaitao, LIU Xu	(145)
Analysis of Propagation Characteristics of LED Light Source in Aquaculture Water	ZHANG Yanqing, QIN Fei, FEI Fan, LI Xiaotian, HUANG Bin, ZHAO Kuifeng, LIU Baoliang	(153)
Effects of LED Spectra on Morphological Characters and Gene Expression of Growth in <i>Takifugu rubripes</i> Larvae	WEI Pingping, LI Xin, ZHANG Junpeng, FEI Fan, MA He, GAO Dongkui, SONG Changbin, CHEN Tao, LIU Ying	(162)
Effects of Adding <i>Vallisneria natans</i> Meal to Diet on Growth Performance, Physiological and Biochemical Properties of Juvenile Grass Carps (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	HUANG Zhongyuan, HE Wenhui, PENG Ziran, LIU Yuchao, HUA Xueming, FENG Yue, LI Xiang, ZUO Lin	(169)
Changes in Quality of Sturgeon Fillet During 4°C and -3°C Partial Freezing Storage	CHEN Yiping, CUI Wenxuan, GAO Ruichang, LI Jianpeng, ZENG Mingyong, TANG Shuwei, FENG Qiufeng, ZHAO Yuanhui	(178)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181120001

http://www.yykxjz.cn/

戴芳群, 朱玲, 陈云龙. 黄、东海渔业资源群落结构变化研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 01-10

Dai FQ, Zhu L, Chen YL. Variations of fishery resource structure in the Yellow Sea and East China Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 01-10

黄、东海渔业资源群落结构变化研究*



戴芳群¹ 朱玲^{1,2} 陈云龙^{1,2①}

(1. 农业农村部海洋渔业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 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为了解黄海和东海渔业资源群落结构的变化, 基于 2013 年 6 月(夏季)和 9 月(秋季)黄、东海渔业资源底拖网调查数据, 对渔业资源种类组成、优势种、渔获量空间分布、群落多样性和群落结构进行了研究。结果显示, 共鉴定渔业种类 185 种, 其中底层鱼类 93 种、中上层鱼类 31 种、甲壳类 48 种、头足类 12 种和贝类 1 种。在鱼类中, 鲈形目种类最多, 27 科 47 属 56 种, 占鱼类总种类数的 45.2%。夏季优势种为鳀(*Engraulis japonicus*)、脊腹褐虾(*Crangon affinis*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)和小黄鱼(*Larimichthys polyactis*), 秋季优势种为三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、小黄鱼、鳀和带鱼, 优势种季节波动不大。秋季平均单位时间渔获量为 46.60 kg/h, 高于夏季(39.35 kg/h)。秋季航次调查中渔业资源较夏季更为集中, 主要分布在长江口和吕泗渔场附近, 其他断面渔获量较低。夏季航次群落多样性指数高于秋季航次。CLUSTER 聚类分析表明, 黄、东海渔业生物群落可分为 2 组, 夏、秋季 2 组界线变动不大, 2 组聚类的形成可能受水温和长江径流影响。

关键词 黄海; 东海; 渔业资源; 群落结构; 优势种

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0001-10

黄海作为全球 50 个大海洋生态系统之一, 位于中国大陆架边缘, 渔业种类较为丰富, 是我国重要的渔业水域(唐启升等, 2000)。黄海中部和南部海域是小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)和鳀(*Engraulis japonicus*)等多种重要经济鱼类的产卵场和索饵场, 也是洄游性鱼类进出渤海的通道, 形成了长江口渔场、吕泗渔场、海州湾渔场和烟威渔场, 为我国及周边国家提供了丰富的渔业资源(Jin *et al*, 2003)。黄海海洋环境复杂, 中部海域水深变化剧烈, 底质类型多

为基岩岸与砂砾质; 而黄海南部受古黄河冲击, 底质类型多为淤泥粉砂质, 形成了苏北浅滩及独特的辐射沙洲地形(肖欢欢等, 2017)。黄海中部和南部海区受黄海冷水团、海州湾和吕泗海区的上升流、苏北沿岸流和长江冲淡水影响, 海洋环境因子区域变化明显, 形成了生境差异较大的不同断面, 造成了黄海中部和南部鱼类群落不同的生物地理分布格局(于振海等, 2010; 单秀娟等, 2016)。东海位于中国大陆中部东侧, 北连黄海, 长江、钱塘江等多条河流注入东海, 带来丰富的营养盐, 东海受黑潮暖流及其西侧分支-台湾

* 青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才”培养计划项目(2017ASTCP-ES07)、国家重点基础研究发展计划(2017YFC1404402)和山东省泰山学者专项基金项目共同资助 [This work was supported by Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-ES07), the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1404402), and Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province]. 戴芳群, E-mail: dai@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 陈云龙, E-mail: chenyl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-11-20, 收修改稿日期: 2018-12-20

暖流、长江冲淡水及黄海冷水团的综合作用影响,基础饵料丰富,在河口附近的浅海海域为主要经济鱼类的产卵场,在沿岸或近海海域分布着多种经济鱼类的索饵场所,东海近海的外侧和南部水域又是多种经济鱼类的越冬场,东海是中国重要的天然渔场,也是世界上高生产力水域之一(姜亚洲等,2008)。

国内学者对该区域的研究主要集中在黄、东海及长江口海域鱼类群体结构(刘勇等,2006;单秀娟等,2014;汤昌盛等,2017),而对黄海和东海海域整个渔业资源群落结构的季节变动研究较少(单秀娟等,2013)。2003~2017年,35°N以北的黄海和渤海海域休渔期为7月1日~9月1日,26°30'N~35°N的黄海和东海海域休渔期为6月16日~9月15日(郑元甲等,2003),6月和9月的调查资料更能代表黄海南部和东海海域休渔期早期和后期的资源量水平,对于评估伏季休渔制度对资源的养护效果具有重要的基础意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源与分析

样品取自2013年6月(夏季)和9月(秋季)在黄、东海进行的渔业生物底拖网调查。调查区域为27°24'59"~37°00'00"N,120°30'00"~124°30'00"E,以与等深线近乎垂直的方式布设了11条大致等间隔的断面,共计47个站位(图1)。调查船为中国水产科学研究院黄海水产研究所“北斗”号,其网具参数为网目836目×20cm,网口周长为167.2m,网衣长度为83.2m,囊网网目为24mm,拖速为3kn,每站拖网1h左右。在实验室内对渔获生物进行种类鉴定和生物学测定,记录每一种的重量和尾数,计算单位时间渔获量(kg/h)和单位时间渔获尾数(ind./h)。

1.2 相对重要性指数

相对重要性指数(Index of relative importance, IRI)(Pianka, 1971)计算公式如下:

$$IRI=(N\%+W\%)\times F\%$$

式中, $N\%$ 为某一种类的尾数占总尾数的百分比; $W\%$ 为某一种类的重量占总重量的百分比; $F\%$ 为某一种类出现的站数占调查总站数的百分比。根据程济生等(2000),当 $IRI>500$ 时,该种为优势种,500~100为常见种,100~10为一般种,10~1为少见种, $IRI<1$ 为稀有种。

1.3 群落多样性指数

不同种类及同种类个体大小差异很大,用生物量

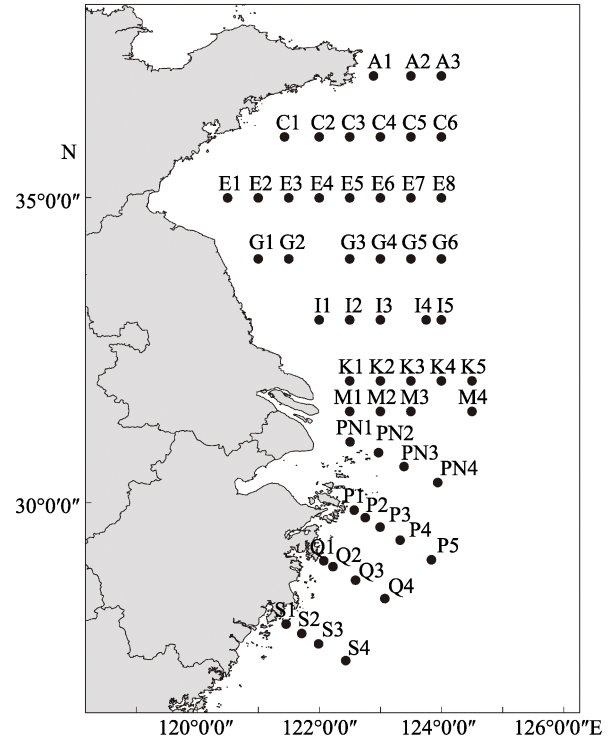


图1 黄、东海渔业资源调查站位

Fig.1 Sampling stations in Yellow Sea and East China Sea

表示的多样性更接近种类间能量分布,因此,本研究根据生物量计算渔业生物群落种类多样性。多样性计算方法如下:

(1) Margalef 的种类丰富度指数(Margalef, 1958):

$$D=(S-1)/\ln W$$

式中, S 为总种数, W 为总渔获量。

(2) Shannon-Wiener 多样性指数(Shannon *et al*, 1949):

$$H'=-\sum_i^s P_i \ln P_i$$

式中, H' 为 Shannon-Wiener 多样性指数, $P_i = n_i / N$, n_i 是第 i 种类占总渔获量的比例。

(3) Pielou 均匀度指数(Pielou, 1975):

$$J=H'/\ln S$$

式中, J 为种类均匀度, S 为总种数。

1.4 群落结构分析

应用未加权的组平均方法(UPGMA)进行聚类(CLUSTER)分析,使用单因子相似性分析(ANOSIM)对不同组群落结构差异进行显著性检验,并利用相似性百分比分析(SIMPER)分析造成各组内群落结构相似的典型种以及造成不同组之间群落结构差异的分歧种(Clarke *et al*, 1993)。用 Bray-Curtis 相似性指数计算不同季节间渔业资源群落结构组成的差异(Field *et al*, 1982):

$$B = 100 \times \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^s |x_{ij} - x_{im}|}{\sum_{i=1}^s |x_{ij} + x_{im}|} \right]$$

式中, B 为 Bray-Curtis 相似性指数, S 为种类数, x_{ij} 、 x_{im} 分别为第 i 个种类在 j 和 m 航次的单位时间的渔获量, 为消除极端值对相似指数影响, 数据经 4 次方根转换进行标准化。

以上数据统计分析采用软件 PRIMER5 完成。

2 结果

2.1 渔业资源种类组成和优势种季节变化

2013 年夏季和秋季调查共捕获渔业种类 185 种, 隶属于 25 目 98 科 148 属, 其中底层鱼类 93 种、中上层鱼类 31 种、头足类 12 种、甲壳类 48 种和贝类 1 种, 分别占总种数的 50.3%、16.8%、6.5%、25.9% 和 0.5%。鱼类中, 鲈形目种类最多, 27 科 47 属 56 种, 占鱼类总种类数的 45.2%, 其次为鲈形目, 10 科 14 属 16 种, 其余各目均在 9 种以下; 甲壳类共有 3 目 22 科 32 属 48 种, 主要为十足目种类; 头足类 3 目 6 科 9 属 12 种(表 1)。夏季调查种类共计 149 种, 其中底层鱼类 74 种、中上层鱼类 21 种、头足类 42 种、甲壳类 11 种和贝类 1 种, 分别占总种数的 49.7%、14.1%、28.2%、7.4% 和 0.7%(表 2)。秋季调查种类共计 143 种, 底层鱼类 71 种、中上层鱼类 23 种、头足类 39 种和甲壳类 10 种, 分别占总种数的 49.7%、16.1%、27.3% 和 7.0%(表 2)。

表 1 2013 年夏季和秋季黄、东海渔业种类各分类阶元的组成
Tab.1 Taxonomic category of fishery resources in the Yellow Sea and East China Sea during summer and autumn in 2013

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
灯笼鱼目 Myctophiformes	1	1	1
鲈形目 Lophiiformes	3	4	4
真鲨目 Carcharhiniformes	1	1	1
鳕形目 Rajiformes	1	1	1
鳗鲡目 Anguilliformes	4	6	6
鲱形目 Clupeiformes	2	7	7
鲱形目 Mugiliformes	1	1	1
仙女鱼目 Aulopiformes	3	5	8
胡瓜鱼目 Osmeriformes	1	1	1
鳕形目 Gadiformes	3	3	4
刺鱼目 Gasterosteiformes	2	2	2
鲈形目 Scorpaeniformes	10	14	16
鲈形目 Perciformes	27	47	56
鲈形目 Ophidiformes	1	1	1
海鲂目 Zeiformes	1	1	1
鲈形目 Pleuronectiformes	4	7	8
鲈形目 Siluriformes	1	1	1
鲈形目 Tetraodontiformes	3	3	5
八腕目 Octopoda	1	1	3
枪形目 Teuthoidea	3	4	4
乌贼目 Sepioide	2	4	5
磷虾目 Euphausiacea	1	1	1
十足目 Decapoda	20	30	46
口足目 Stomatopoda	1	1	1
新腹足目 Neogastropoda	1	1	1
总计 Total	98	148	185

表 2 2013 年夏季和秋季黄、东海各生态类型种类统计

Tab.2 Species composition of different fishery ecotypes in the Yellow Sea and East China Sea during summer and autumn in 2013

季节 Season	底层鱼类 Bottom fish	中上层鱼类 Pelagic fish	头足类 Cephalopods	甲壳类 Crustaceans	贝类 Shellfish	小计 Total
夏季 Summer	74	21	42	11	1	149
秋季 Autumn	71	23	39	10	0	143

根据相对重要性指数, 夏季渔获优势种为鳀、脊腹褐虾(*Crangon affinis*)、带鱼和小黄鱼(表 3), 4 个优势种平均单位时间渔获量分别为 13.33、7.73、14.76 和 2.06 kg/h, 这 4 个优势种占夏季总渔获量和渔获尾数的比例分别为 51.4% 和 56.7%, 其中, 鳀、脊腹褐虾、小黄鱼和带鱼分别占总渔获量的 20.9%、9.2%、17.6% 和 3.7%。秋季优势种为三疣梭子蟹(*Portunus*

trituberculatus)、小黄鱼、鳀和带鱼, 其平均单位时间渔获量为 17.76、7.55、5.99 和 20.25 kg/h, 分别占总渔获量的 19.5%、11.6%、7.6% 和 20.0%。夏季和秋季优势种主要由底层鱼类和甲壳类组成, 中上层鱼类仅出现了鳀。小黄鱼、带鱼和鳀均为夏季和秋季的优势种, 3 种合计占夏季和秋季调查渔获量比例分别为 42.2% 和 39.2%。

表3 2013年夏季和秋季黄、东海渔业资源优势种季节变化
Tab.3 Seasonal variations of dominant fishery resources during summer and autumn in 2013

季节 Seasons	种名 Species	F(%)	W(%)	N(%)	IRI
夏季 Summer	鳀 <i>E. japonicus</i>	61.7	20.9	28.3	3033.9
	脊腹褐虾 <i>C. affinis</i>	70.2	9.2	21.8	1450.0
	带鱼 <i>T. lepturus</i>	46.8	17.6	3.0	963.6
	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	46.8	3.7	3.6	509.1
秋季 Autumn	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	51.3	19.5	16.0	1822.7
	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	71.8	11.6	12.7	1744.3
	鳀 <i>E. japonicus</i>	59.0	7.6	19.9	1623.6
	带鱼 <i>T. lepturus</i>	46.1	20.0	2.5	1042.9

2.2 渔获量空间分布和季节变化

秋季平均单位时间渔获量为 46.60 kg/h，高于夏季(39.35 kg/h)。夏季和秋季渔获中，底层鱼类和中上层鱼类平均单位时间渔获量较高。夏季调查中，底层鱼类和中上层鱼类平均单位时间渔获量分别为 17.27 kg/h 和 10.68 kg/h，其渔获量占总渔获量的百分比分别为 43.88%和 27.15%。秋季调查中，底层鱼类和中上层鱼类平均单位时间渔获量分别为 23.43 和 11.40 kg/h，其渔获量分别占总渔获量的 50.27%和 24.46%。2 个季节中，

头足类渔获量较低，平均单位时间渔获量分别为 1.21 和 0.48 kg/h。

夏季调查东海断面中部站位渔获量百分比比较高，黄海中部冷水团位置渔获量百分比均较低；秋季渔业资源较夏季更为集中，主要分布在长江口和吕泗渔场附近位置，平均单位时间渔获量最高(178.51 kg/h)，其他断面渔获量较低(图 2)。

2.3 群落多样性特征及其分布

夏季和秋季调查渔获种类数分别为 149 种和 143 种。

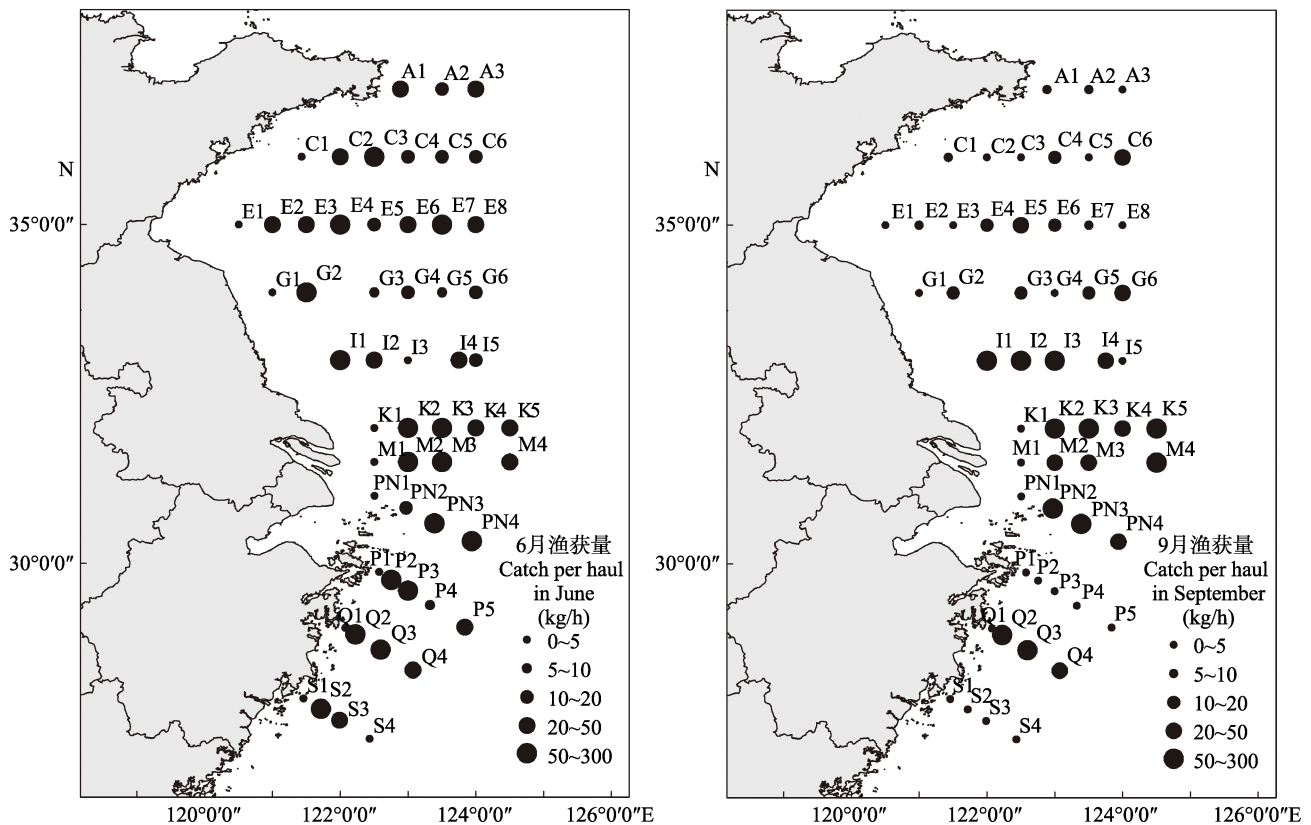


图2 2013年夏季和秋季黄、东海渔业资源平均单位时间渔获量的空间分布
Fig.2 Distribution of average catch per haul in the summer and autumn of 2013

夏季总丰富度指数和总多样性总指数均最大,各站位分别在 0.16~4.43 和 0.33~2.36 之间波动;秋季丰富度指数和多样性总指数较小,各站位分别在 0~3.87 和 0~2.33 之间波动,夏季平均丰富度指数(1.99)较秋季(1.69)高(表 4)。在夏季调查中,多样性指数最高站位出现在东海北部浙江近岸站位,苏北浅滩区 2 个断面

近岸站位多样性指数较高,而长江口外断面站位多样性指数较低(图 4)。秋季调查中,长江口区域断面中部和外部站位多样性指数较高,其他断面多样性指数偏低。以重量计算的相似性指数,夏季和秋季的相似性指数为 0.54;以尾数计算的相似性指数,夏季和秋季的相似性指数为 0.30。

表 4 2013 年夏季和秋季黄、东海渔业种类多样性指数的变化
Tab.4 Variations of fishery species diversity indices during summer and autumn in 2013

季节 Season	丰富度指数 D		Shannon-Wiener 多样性指数 J'		均匀度指数 H'	
	范围 Range	平均 Mean	范围 Range	平均 Mean	范围 Range	平均 Mean
夏季 Summer	0.16~4.43	1.99	0.17~0.87	0.51	0.33~2.36	1.45
秋季 Autumn	0~3.87	1.69	0.08~0.73	0.50	0~2.33	1.36

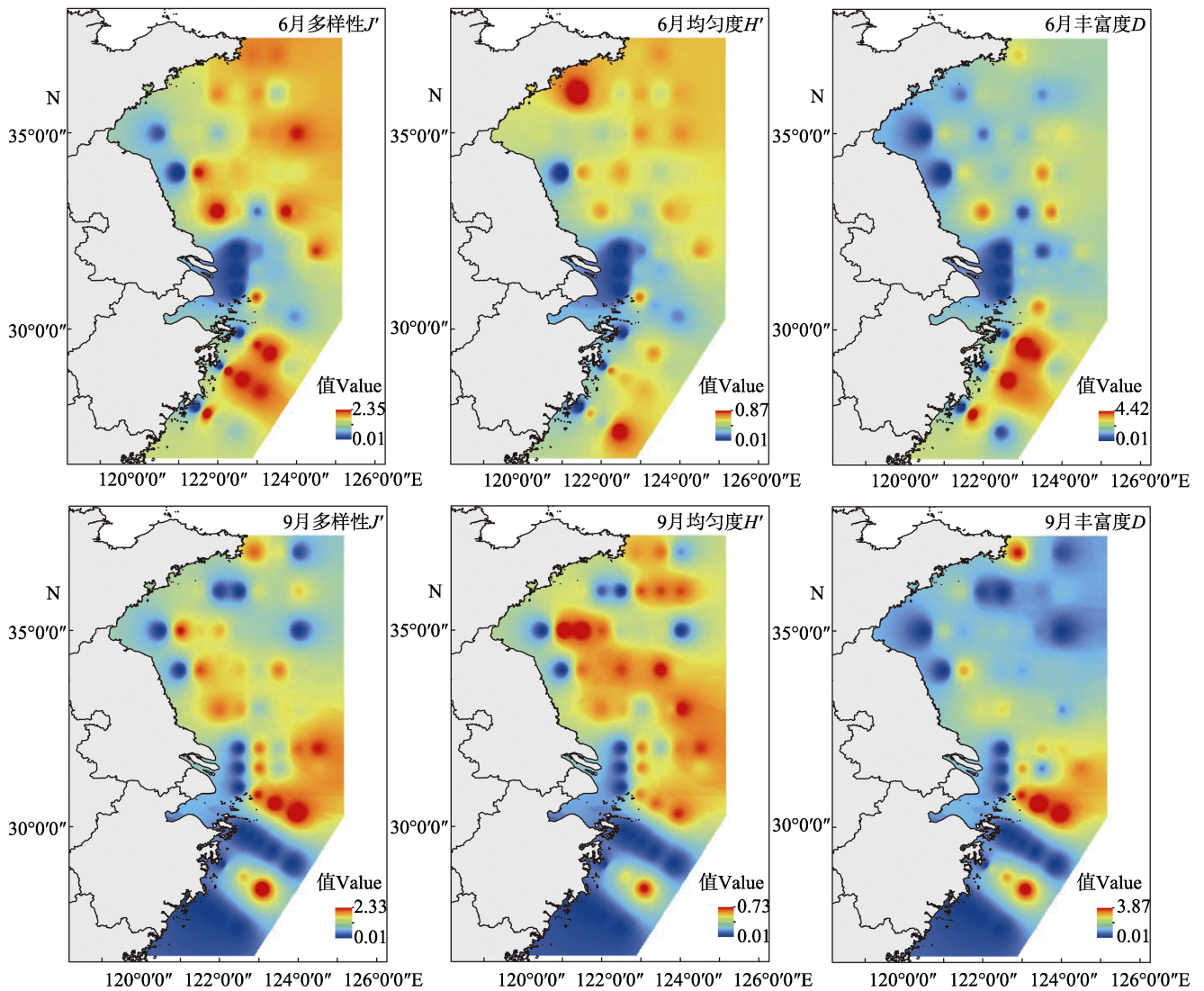


图 3 2013 年夏季和秋季黄、东海渔业生物多样性指数 H' 、 D 和 J' 的空间分布

Fig.3 Spatial distribution of H' , D and J' of fishery resources in the summer and autumn of 2013

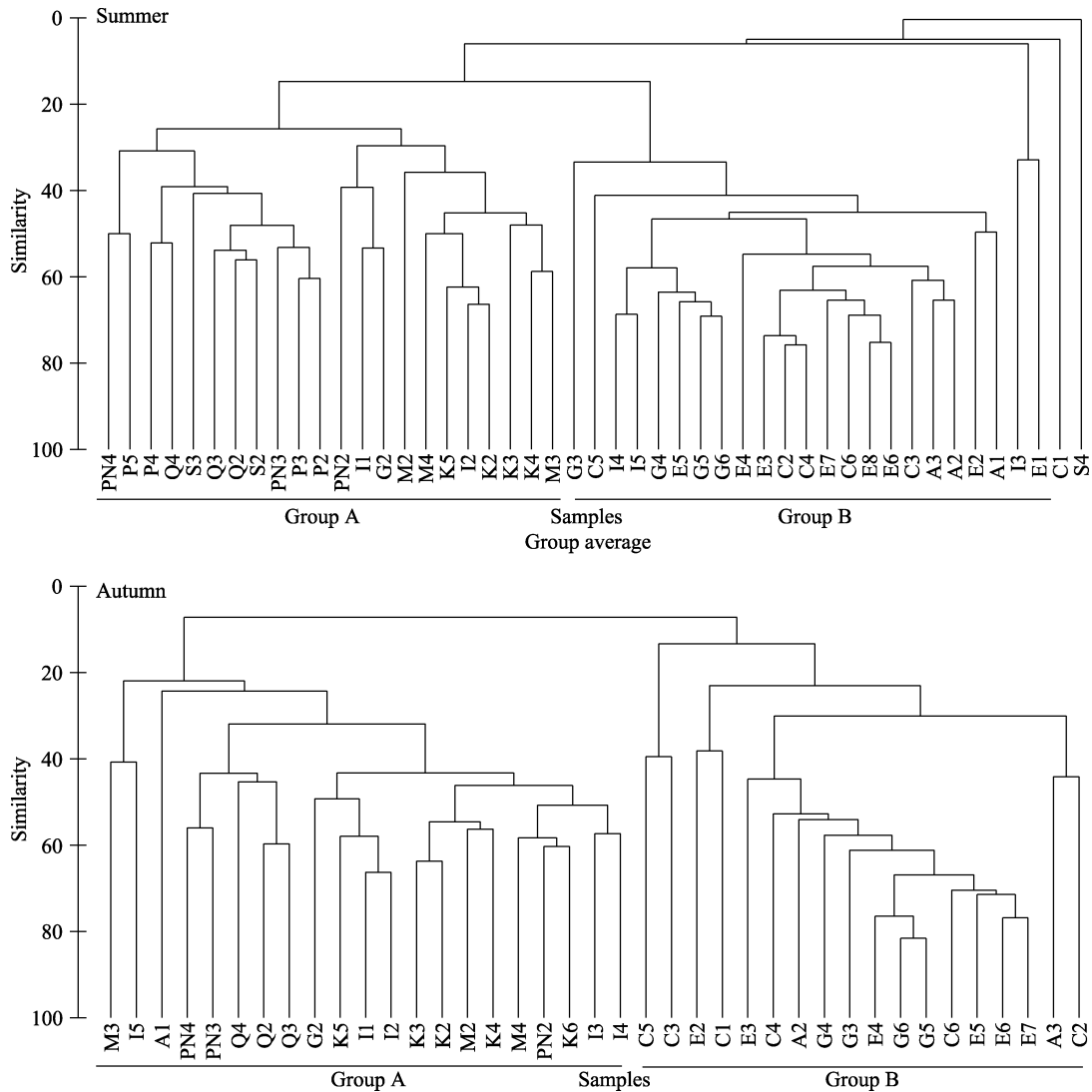


图 4 2013 年夏季和秋季黄、东海渔业生物群落聚类分析

Fig.4 Cluster analysis for the fishery species communities in Yellow Sea and East China Sea based on Bray-Curtis similarity matrices during summer and autumn in 2013

2.4 群落结构分析

通过 CLUSTER 聚类分析, 将夏季黄海中部、南部和东海北部海域渔业生物群落分为 2 组(A 组和 B 组, 图 5), 其中, I3、E1、C1 和 S4 站捕捞种类为 1~3 种, 且个体过少, 不予分组。单因子相似性分析 (ANOSIMA) 表明不同站位组群间渔业资源生物群落组成差异极显著 ($R=0.803, P<0.001$)。A 组主要位于长江口渔场以及苏北浅滩区和浙江近岸渔场, B 组主要位于山东近海站位和黄海深水区站位 (图 6)。SIMPER 分析结果显示, A 组和 B 组各站位组的组内平均相似性分别为 32.54% 和 46.09%。A 组的典型种主要包括三疣梭子蟹、带鱼、鳀和小黄鱼, 这 4 种对组内平均相似性贡献达 32.93%。B 组的典型种主要包括细纹狮

子鱼 (*Liparis tanakae*)、脊腹褐虾和黄鲛鰈 (*Lophius litulon*), 这 3 种对组内平均相似性贡献达 37.85%。组 A 和组 B 之间的平均非相似性为 84.54%, 对组 A 和组 B 间平均非相似性贡献较高的分歧种主要为脊腹褐虾、细纹狮子鱼、带鱼、三疣梭子蟹、黄鲛鰈和大头鳕 (*Gadus macrocephalus*)。

在秋季资源调查中, CLUSTER 聚类分析也将站位分为 2 个组 (图 5)。单因子相似性分析 (ANOSIMA) 表明不同站位组群间渔业资源生物群落组成差异极显著 ($R=0.864, P<0.001$)。秋季 A 组同夏季 A 组分布基本一致, 范围进一步向外海扩展, 主要位于长江口渔场以及苏北浅滩区和浙江近岸渔场, B 组主要位于山东近海站位和黄海深水区站位, 同夏季相比分布范围进一步缩小 (图 6)。SIMPER 分析结果显示, A 组

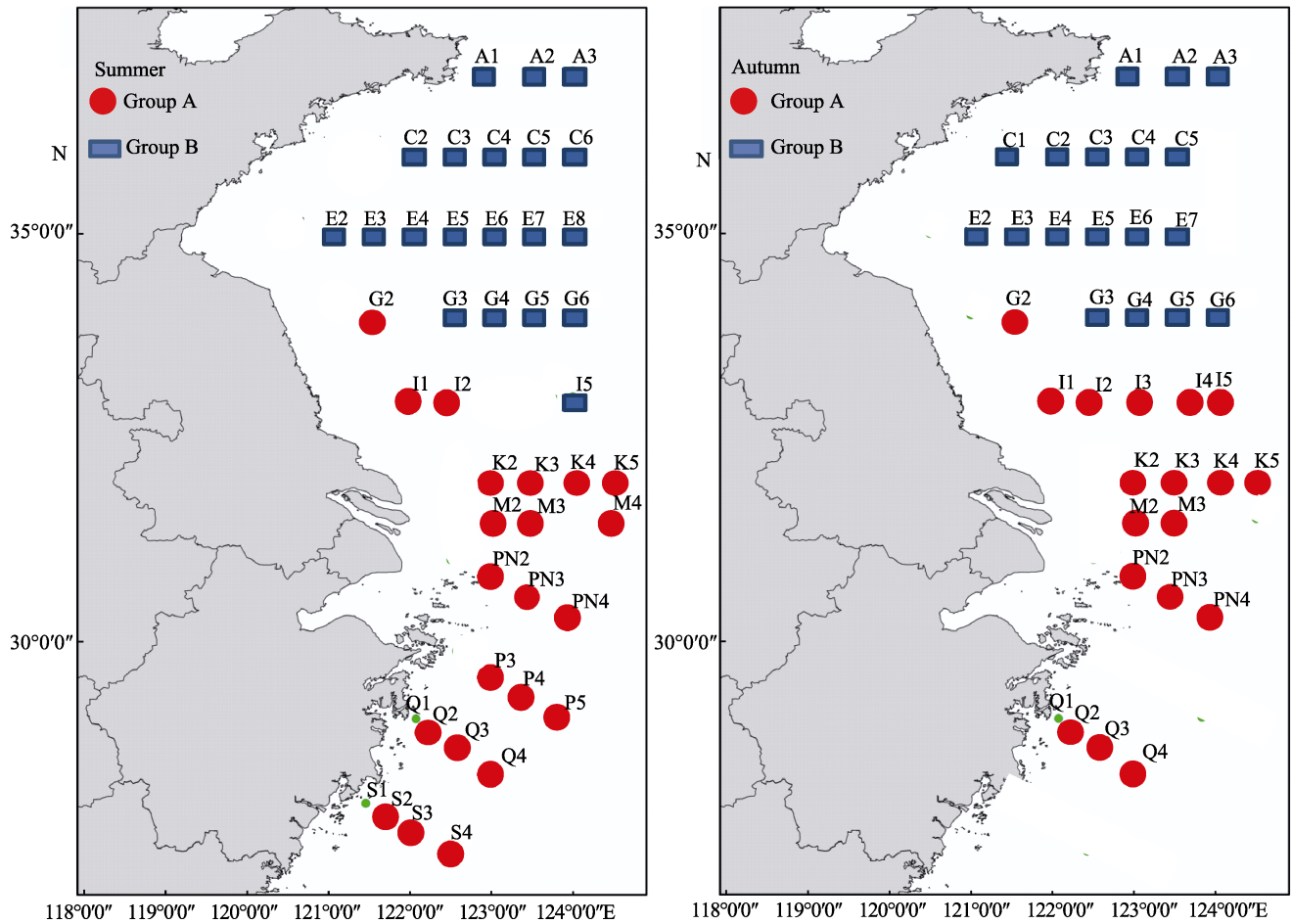


图 5 2013 年夏季和秋季黄、东海渔业资源群落结构划分示意

Fig.5 Fish assemblages in the Yellow Sea and East China Sea during summer and autumn in 2013

和 B 组各站位的组内平均相似性分别为 37.19% 和 35.45%。A 组的典型种主要包括三疣梭子蟹、带鱼、小黄鱼和银鲳(*Pampus argenteus*), 这 4 种对组内平均相似性贡献达 41.71%。B 组的典型种主要包括鳀、细纹狮子鱼和黄鲛鲷, 这 3 种对组内平均相似性贡献达 54.59%。A 组和 B 组之间的平均非相似性为 92.32%, 对 A 组和 B 组间平均非相似性贡献较高的分歧种主要为三疣梭子蟹、带鱼、鳀、细纹狮子鱼、小黄鱼和黄鲛鲷。

3 讨论

在本调查中, 共鉴定渔业种类 185 种, 从物种组成看, 渔获物以底层鱼类和甲壳类为主, 该结果同长江口区域、黄海南部区域和浙江近岸海域的调查结果相符(金显仕等, 2009; 单秀娟等, 2013; 孙鹏飞等, 2015; 汤昌盛等, 2017)。单秀娟等(2013)对山东以南黄海海域的 4 个季度渔业资源调查结果进行统计, 鉴定出渔获种类 156 种, 其中底层鱼 97 种, 甲壳类为

36 种。近 20 年来, 对长江口及其邻近海域渔业资源调查物种统计结果显示, 底层鱼类和甲壳类占优势地位。根据李建生等(2004)的研究, 2000~2002 年长江口海域各季节均以鱼类为绝对优势类群, 甲壳类春季所占百分比最高, 为 11.1%。而孙鹏飞等(2015)研究显示, 2012~2013 年, 在长江口区域甲壳类在渔获中所占比例为 40.1%~54.2%。本研究中, 甲壳类物种数占总渔获种类数的 25.9%。比较不同年代黄、东海渔业资源调查研究结果同本研究发现, 甲壳类在黄海南部区域物种数和资源量逐渐增加。甲壳类在渔业生态系统中处于承上启下的位置, 高强度的捕捞致使传统营养级较高的经济鱼类资源量下降, 甲壳类被捕食的压力减小, 同时, 近海富营养化为营养级较低的甲壳类资源量的增加提供了物质基础, 渔业生物中甲壳类种类数及资源量相对增加(李涛等, 2011)。从鱼类物种组成看, 调查各断面鱼类种类以鲈形目最多, 其次是鲷形目, 鱼类主要由暖温种和暖水种组成, 仅大头鳕、玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)等少量冷温种, 同单秀娟等(2013)对黄海中南部鱼类种类组成研究结果一致。

各断面渔获种类组成存在明显的夏秋季节变化,这与鱼类、甲壳类和头足类季节间产卵、索饵及越冬洄游有关(张波等, 2009; 杨涛等, 2018)。

在夏季调查中, 优势种由鳀、脊腹褐虾、带鱼和小黄鱼组成, 鳀为第一优势种。秋季优势种由三疣梭子蟹、小黄鱼、鳀和带鱼组成, 三疣梭子蟹为第一优势种。除优势种外, 相对重要性指数较高的种类有黄鲛鲷、细点圆趾蟹(*Ovalipes punctatus*)、大头鳕、细纹狮子鱼、高眼鲷(*Cleisthenes herzensteini*)、龙头鱼(*Harpadon nehereus*)、太平洋褶柔鱼(*Todarodes pacificus*)、七星底灯鱼(*Benthosema pterotum*)和发光鲷(*Acropoma japonicum*), 可以看出渔获组成主要以小型中上层鱼类和底层经济价值较低的种类为主。夏季和秋季优势种的渔获量在总渔获量所占比例分别为 51.4%和 58.7%, 这表明了黄海中南部和东海北部各断面能量流动和生态位主要由少数主要种类控制, 渤海和东海区域也有相似的结论(金显仕, 2000; 刘勇等, 2006)。

同历史资料相比, 黄海区域渔业资源优势种已发生了较大的变化, 20 世纪 50~60 年代, 渔业种类主要是小黄鱼、带鱼和鲆鲽类等经济价值较高的优质底层、近底层鱼类, 70~80 年代, 以太平洋鲱(*Clupea pallasii*)、蓝点马鲛、鲈鱼(*Scomber japonicus*)先后成为优势种(徐宾铎等, 2003), 到 1990 年代末, 低值鱼类黄鲛鲷和细纹狮子鱼逐渐成为优势种(张波等, 2004)。本研究发现, 黄鲛鲷和细纹狮子鱼分布较为广泛, 黄鲛鲷从 A 断面到 M 断面广泛分布, 细纹狮子鱼从 A 断面到 K 断面均有分布。相关研究发现, 这些经济价值较低的大型底层种类不仅摄食许多经济鱼类的幼鱼, 而且与多种鱼类的成鱼存在明显的食物竞争关系, 这从食物结构方面加速了黄海渔业资源优势种的更替(单秀娟等, 2013)。

秋季平均单位时间渔获量明显高于夏季, 可能与伏季休渔政策有关, 经过 3 个月休渔, 渔业生物幼体个体数量增加, 并且渔业生物得到充分生长, 体重也明显增加, 夏季调查中, A、C、K、M 断面的中部站位, 断面 G、I、P、Q、S 近岸站位渔获量较高, 各断面外海站位普遍偏低。秋季调查中, 渔获量向长江口, 北部断面渔获量较低。这可能与鳀、小黄鱼、带鱼、银鲳和三疣梭子蟹等越冬场鱼群的洄游有关, 这些鱼类随沿岸水温升高 5~6 月在长江口和吕泗渔场附近形成产卵群体或索饵群体, 6 月以后, 索饵群体北上山东半岛南部海域索饵, 9 月以后逐渐回到长江口及其邻近海域, 一部分群体游向外海越冬场, 一部分群体继续南下(宋海棠等, 1989; 邓景耀等, 1991; 水柏年,

1999; 郑元甲等, 2003; 徐兆礼等, 2009)。

黄海中部、南部和东海北部的渔业生物群落夏季多样性指数、均匀度指数和丰富度指数均高于秋季。夏秋季群落丰富度指数和多样性指数均显著低于 2006 年的黄海对应季节的研究结果(D 2.79~6.20; H' 0.78~3.05), 均匀度指数同 2006 年的调查结果一致(单秀娟等, 2013)。夏季长江口附近的 K、M、PN 3 个断面近岸和中部站位群落多样性指数较低, 这可能是由于夏季长江径流较强, 冲淡水影响较广, 造成该区域近海种类偏低。随着长江径流减少, 秋季长江附近的 K、M、PN 3 个断面物种多样性明显升高。

聚类分析结果表明, 黄海中部、南部和东海北部海域渔业生物群落划分为 2 个地理组, 分界线在断面 I, 夏秋季 2 组界线变动不大。2 组聚类反映了黄海不同区域鱼类适温类型的差异。A 组包括黄海南部和东海北部水域, 该组以暖水性和暖温性种类为主, 并且多为中上层小型种类, A 组站位主要受长江径流影响, 营养盐较丰富, 初级生产力较高。B 组包括黄海中部的 4 个断面, 主要以暖温种类为主, 存在一定量的冷温性种类, 受黄海冷水团影响。黄海冷水团为夏季冷温性种类提供了庇护场所, 限制了部分底层暖温性种类的向北扩散。本研究聚类结果与单秀娟等(2014)对黄海中南部鱼类群落结构划分一致。聚类结果支持在深度梯度变化不大的温带水域的鱼类群落组成在很大程度上存在温度依赖性的结论(程济生等, 2004)。除温度外, 深度也是影响渔业资源群落的重要因素, 东海大陆架鱼类群落的种类组成沿着水深梯度变化明显, 每种鱼类均有一定的水深范围(李圣法等, 2007)。在本研究中, 由于南北温度变化尺度较大, 深度梯度变化区域不明显, 因此, 在深度梯度变化不明显的情况下鱼类群聚主要与水温相关。

参 考 文 献

- Cheng JS, Yu LF. The change of structure and diversity of demersal fish communities in the Yellow Sea and East China Sea in winter. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(1): 29-34 [程济生, 俞连福. 黄、东海冬季底层鱼类群落结构及多样性变化. *水产学报*, 2004, 28(1): 29-34]
- Cheng JS. The structure and diversity of demersal fish communities in winter in the East China Sea and the Yellow Sea. *Marine Fisheries Research*, 2000, 21(3): 1-8 [程济生. 东、黄海冬季底层鱼类群落结构及其多样性. *海洋水产研究*, 2000, 21(3): 1-8]
- Clarke KR, Ainsworth M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology-Progress Series*, 1993, 92(3): 205-219

- Deng JY, Zhao CY. Marine fishery biology. Beijing: China Agriculture Press, 1991 [邓景耀, 赵传纲. 海洋渔业生物学. 北京: 农业出版社, 1991]
- Field JG, Clarke KR, Warwick RM. A practical strategy for analysing multispecies distribution patterns. Marine Ecology-Progress Series, 1982, 8: 37–52
- Jiang YZ, Cheng JH, Li SF. Variation in fish community structure and biodiversity in the north of the East China Sea between two periods. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(3): 453–459 [姜亚洲, 程家骅, 李圣法. 东海北部鱼类群落多样性及其结构特征的变化. 中国水产科学, 2008, 15(3): 453–459]
- Jin XS, Xu B, Tang QS. Fish assemblage structure in the East China Sea and southern Yellow Sea during autumn and spring. Journal of Fish Biology, 2003, 62(5): 1194–1205
- Jin XS, Shan XJ, Guo XW, *et al.* Community structure of fishery biology in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(9): 4761–4772 [金显仕, 单秀娟, 郭学武, 等. 长江口及其邻近海域渔业生物的群落结构特征. 生态学报, 2009, 29(9): 4761–4772]
- Jin XS. The dynamics of major fishery resources in the Bohai Sea. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(4): 22–26 [金显仕. 渤海主要渔业生物资源变动的研究. 中国水产科学, 2000, 7(4): 22–26]
- Li JS, Li SF, Ren YP, *et al.* Seasonal variety of fishery biology community structure in fishing ground of the Yangtze estuary. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(5): 432–439 [李建生, 李圣法, 任一平, 等. 长江口渔场渔业生物群落结构的季节变化. 中国水产科学, 2004, 11(5): 432–439]
- Li SF, Cheng JH, Yan LP. Spatial structures of fish communities on the continental shelf of the East China Sea. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(11): 4377–4386 [李圣法, 程家骅, 严利平. 东海大陆架鱼类群落的空间结构. 生态学报, 2007, 27(11): 4377–4386]
- Li T, Zhang XM, Zhang PD, *et al.* Seasonal variation on community structure of fishery resources in the coastal waters of southern Shandong Peninsula. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(1/2): 41–50 [李涛, 张秀梅, 张沛东, 等. 山东半岛南部近岸海域渔业资源群落结构的季节变化. 中国海洋大学学报, 2011, 41(1/2): 41–50]
- Liu Y, Li SF, Cheng JH. A study on seasonal changes of the fish communities in the East China Sea and the Huanghai Sea. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(4): 108–114 [刘勇, 李圣法, 程家骅. 东海、黄海鱼类群落结构的季节变化研究. 海洋学报, 2006, 28(4): 108–114]
- Margalef R. Information theory in ecology. General Systems, 1958, 3: 36–71
- Pianka ER. Ecology of the agamid lizard *Amphibolurus isolepis* in Western Australia. Copeia, 1971(3): 527–536
- Pielou EC. Ecological diversity. New York: John Wiley and Sons, 1975
- Shan XJ, Chen YL, Dai FQ, *et al.* Variations in fish community structure and diversity in the sections of the central and southern Yellow Sea. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(2): 377–389 [单秀娟, 陈云龙, 戴芳群, 等. 黄海中南部不同断面鱼类群落结构及其多样性. 生态学报, 2014, 34(2): 377–389]
- Shan XJ, Chen YL, Jin XS, *et al.* Reshaping the distribution of fish abundance by climate change: A case study in the Yangtze River estuary. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 1–10 [单秀娟, 陈云龙, 金显仕, 等. 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 1–10]
- Shan XJ, Sun PF, Jin XS, *et al.* Seasonal variations of fishery resource structure in the sections of the southern Yellow Sea. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 425–435 [单秀娟, 孙鹏飞, 金显仕, 等. 黄海典型断面渔业资源结构的季节变化. 水产学报, 2013, 37(3): 425–435]
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949
- Shui BN. Preliminary study on the distribution of *Engraulis japonicus* and fishing grounds in the Yellow Sea and East China Sea. Journal of Fisheries of Zhoushan, 1999, S(57): 17–20 [水柏年. 黄、东海鳀鱼洄游及渔场分布初探. 舟山渔业, 1999, S(57): 17–20]
- Song HT, Ding YP, Xu YJ. Migration and population composition of *Portunus trituberculatus* in the northern Zhejiang Province. Marine Science Bulletin, 1989, 8(1): 66–74 [宋海棠, 丁耀平, 许源剑. 浙北近海三疣梭子蟹洄游分布和群体组成特征. 海洋通报, 1989, 8(1): 66–74]
- Sun PF, Dai FQ, Chen YL, *et al.* Seasonal variations in structure of fishery resource in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 8–16 [孙鹏飞, 戴芳群, 陈云龙, 等. 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 8–16]
- Tang CS, Zhang F, Feng S, *et al.* Biological community of fishery resources in the Yangtze River estuary and adjacent sea areas in the summer of 2015. Marine Fisheries, 2017, 39(5): 490–499 [汤昌盛, 张芳, 冯颂, 等. 2015年夏季长江口及其邻近海域渔业生物群落结构分析. 海洋渔业, 2017, 39(5): 490–499]
- Tang QS, Su JL. Marine ecosystem dynamics research of China I. Key scientific issues and research development strategies. Beijing: Science Press, 2000 [唐启升, 苏纪兰. 中国海洋生态系统动力学研究 I. 关键科学问题与研究发展战略. 北京: 科学出版社, 2000]
- Xiao HH, Zhang CL, Xu BD, *et al.* Spatial pattern of ichthyoplankton assemblage in the coastal waters of central and southern Yellow Sea in the spring. Haiyang Xuebao, 2017, 39(8): 34–47 [肖欢欢, 张崇良, 徐宾铎, 等. 黄海中南部近岸海域春季鱼类浮游生物群落空间格局研究. 海洋学报, 2017, 39(8): 34–47]

- Xu BD, Jin XS, Liang ZL. Changes of demersal fish community structure in the Yellow Sea during the autumn. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(2): 148–154 [徐宾铎, 金显仕, 梁振林. 秋季黄海底层鱼类群落结构的变化. *中国水产科学*, 2003, 10(2): 148–154]
- Xu ZL, Chen JJ. Analysis on migratory routine of *Larimichthys polyactis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 931–940 [徐兆礼, 陈佳杰. 小黄鱼洄游路线分析. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 931–940]
- Yang T, Shan XJ, Jin XS, *et al.* Long-term changes in keystone species in fish community in spring in Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 1–11 [杨涛, 单秀娟, 金显仕, 等. 莱州湾春季鱼类群落关键种的长期变化. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 1–11]
- Yu ZH, Jin XS, Li XS. Analysis of ecological niche for major fish species in the central and southern Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 1–8 [于振海, 金显仕, 李显森. 黄海中南部主要鱼种的生态位分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 1–8]
- Zhang B, Tang QS, Jin XS. Functional groups of communities and their major species at high trophic level in the Yellow Sea ecosystem. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(3): 1099–1111 [张波, 唐启升, 金显仕. 黄海生态系统高营养层次生物群落功能群及其主要种类. *生态学报*, 2009, 29(3): 1099–1111]
- Zhang B, Tang QS. Study on trophic level of important resources species at high troph levels in the Bohai Sea, Yellow Sea and East China Sea. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(4): 393–404 [张波, 唐启升. 渤、黄、东海高营养层次重要生物资源种类的营养级研究. *海洋科学进展*, 2004, 22(4): 393–404]
- Zheng YJ, Chen XZ, Cheng JH, *et al.* East China Sea continental shelf biological resources and environment. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2003 [郑元甲, 陈雪忠, 程家骅, 等. 东海大陆架生物资源与环境. 上海: 上海科学技术出版社, 2003]

(编辑 马瑾艳)

Variations of Fishery Resource Structure in the Yellow Sea and East China Sea

DAI Fangqun¹, ZHU Ling^{1,2}, CHEN Yunlong^{1,2①}

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

Abstract To elucidate the dynamics of fishery resources structure in the Yellow Sea and East China Sea, species composition, dominate species, spatial distribution of catch, community diversity and community structure of fishery species in the Yellow Sea and East China Sea were studied based on the bottom trawl survey data collected from June and September in 2013. A total of 185 fishery species were collected, including 93 demersal fish species, 31 pelagic species, 48 crustacean species, 12 cephalopod species and one mollusk species. Among these fish species, the richest species was found in Perciformes (27 families, 47 genera and 56 species). There was no obvious seasonal variation of dominate species. In summer, the dominate species were sand shrimp *Crangon affinis* and hairtail *Trichiurus lepturus*, whereas in autumn, the dominate species were the swimming crab *Portunus trituberculatus*, yellow small croaker *Larimichthys polyactis*, Japanese anchovy *Engraulis japonicus* and hairtail *Trichiurus lepturus*. The average catch per haul was higher in autumn (46.60 kg/h) than that in summer (39.35 kg/h). The spatial distribution of fishery resource in autumn concentrated in the Yangtze River estuary and Lvsu fishing ground. The diversity indices of fishery species in summer were higher than that in autumn. The fishery biological communities could be divided into two groups based on the cluster analysis. The separation between two groups was primarily influenced by the temperature and discharge of Yangtze River.

Key words Yellow Sea; East China Sea; Fishery resources; Community structure; Dominate species

① Corresponding author: CHEN Yunlong, Email: chenyl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181116001

http://www.yykxjz.cn/

牛明香, 王俊, 吴强, 孙坚强. 基于遥感的黄海中南部越冬鲢资源密度分布与环境因子的关系研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 11-20

Niu MX, Wang J, Wu Q, Sun JQ. The relationship of stock density distribution of wintering anchovy (*Engraulis japonicus*) and environmental factors based on remote sensing in central and southern Yellow Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 11-20

基于遥感的黄海中南部越冬鲢 资源密度分布与环境因子的关系研究*



牛明香¹ 王 俊^{1,2①} 吴 强¹ 孙坚强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

山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237)

摘要 基于遥感和 GIS(Geographic information system)技术, 利用 2000~2015 年的底拖网调查数据和海表温度、叶绿素 *a* 浓度以及海水温度梯度等遥感数据, 在定性分析黄海中南部越冬鲢 (*Engraulis japonicus*) 资源密度分布与环境因子关系的基础上, 利用时空和环境因子构建 GAM (Generalized additive model) 模型进行定量分析。结果显示, 时空因子(年、下网时间、经度和纬度)和环境因子对越冬鲢资源密度的总偏差解释率为 44.76%, 其中, 时空因子对其的影响均显著, 以空间因子影响最大, 对总偏差的解释率为 35.4%; 环境因子中, 水深、海表温度和温度梯度对其影响显著, 而叶绿素 *a* 浓度影响不显著; 越冬鲢分布的最适海表温度、叶绿素 *a* 浓度和海表温度梯度范围分别为 7~11℃、1.2~2.3 mg/m³ 和 0.7~2.5℃。研究结果对环境变动下的渔业管理具有重要意义。

关键词 时空分布; 环境因子; 广义可加模型; 海洋遥感; 鲢; 黄海

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0011-10

海洋环境要素是控制鱼类种群分布的重要因子, 影响鱼类的生存、生长及繁殖等, 环境变动影响鱼类的空间分布和集群(Brander, 2010)。基于生态系统的管理是实现渔业资源可持续发展目标的有效方法(Link, 2002), 确认和理解栖息地环境因子如何影响不同空间和时间尺度上鱼类种群的分布模式是其必要组成部分(Martin *et al*, 2009)。由此, 鱼类种群分布与环境关系的研究成为鱼类研究的重要内容之一。

有关鱼类空间分布与环境的关系, 研究方法众

多, 常用的方法有 GAM(Generalized additive model)、GLM(Generalized linear model)、QR(Quantile regression)和分类树等。由于 GAM 模型能解释鱼类分布和环境因子之间的非线性关系, 其近年作为生态学空间格局分析的重要方法之一, 被广泛用于探究鱼类种群分布的时空特征及其与环境因子关系的研究(陈新军等, 2007; Furey *et al*, 2013; Grüss *et al*, 2014; 王浩展等, 2017; 杨胜龙等, 2017)。随着海洋遥感技术的发展, 水色、水温遥感数据已被大量用于海洋渔业研究(樊伟,

* 国家自然科学基金青年基金(41506162)、国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、国家基金委—山东省联合基金项目(U1606404)和农业农村部财政项目“黄渤海渔业资源调查”共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41506162), the National Basic Research Program of China (2015CB453303), the NSFC-Shandong Joint Fund for Marine Ecology and Environmental Sciences (U1606404), and Financial Project “Fishery Resource Survey in Yellow Sea and Bohai Sea”, Ministry of Agriculture and Rural Affairs]. 牛明香, E-mail: niuwx@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2018-11-16, 收修改稿日期: 2018-11-26

2004; 丁琪等, 2015; 崔雪森等, 2018)。

鳀(*Engraulis japonicus*)是一种洄游性小型中上层鱼类, 曾是黄、东海生态系统动力学研究的资源关键种(Tang, 2000; Zhao *et al*, 2003), 在海洋生态系统中起着承上启下的重要作用。研究表明, 越冬鳀空间分布与水温关系明显(马绍赛, 1987; Kim *et al*, 2005; 李骁等, 2007; 牛明香等, 2012; Niu *et al*, 2017)。近年来, 在环境变动和过度捕捞的影响下, 鳀资源量发生明显变化。本研究基于卫星遥感资料和海上调查数据, 在定性分析的基础上, 利用 GAM 模型, 定量研究黄海越冬鳀资源密度分布与环境因子的关系, 旨在为环境变动下的渔业管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源及处理

1.1.1 调查数据 调查数据来自“北斗”号调查船 2000~2015 年(2000、2002~2006、2008、2010~2011、2015)1 月在黄海中南部(121°~125.5°E、32°~37°N)的底拖网调查, “北斗”号渔业调查船的网具参数: 网具网目 836 目×20 cm, 网口周长为 167.2 m, 网具总长度为 83.2 m, 囊网网目 2.4 cm。站位布设以经、纬度 0.5°×0.5°为一个渔区, 各年间站位设置一致。调查按预设站位昼夜进行, 各站计划拖网 1 h 左右, 平均拖速 3n mile/h, 实际拖网时间根据调查时的海况确定, 详细记录每个站位的渔获组成、位置等相关信息。本研究提取经纬度、水深、下网时间和鳀渔获重量数据。资源密度以单位捕捞努力量渔获量(CPUE, catch per unit effort)表征, 即每网每小时的捕获重量[g/(h·net)]。

1.1.2 遥感数据 调查对应时段的水温(SST, sea surface temperature)、叶绿素 *a*(Chl-*a*)浓度数据来自美国航空航天局(NASA)反演的全球卫星遥感三级数据产品, 该数据为月平均数据, 空间分辨率为 9 km (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov>)。利用 IDL 读取原始数据提取研究区(118°~128°E, 30°~39°N)的水温、叶绿素 *a* 浓度, 取 1 个渔区(0.5°×0.5°)范围内的水温、叶绿素 *a* 浓度平均值作为该渔区的值。利用 SST 计算获得相应渔区的海表温度梯度(TGR, temperature gradient), 计算公式如下:

$$TGR(^{\circ}C) = \sqrt{\left(\frac{T_{i+1} - T_{i-1}}{2}\right)^2 + \left(\frac{T_{j+1} - T_{j-1}}{2}\right)^2}$$

式中, T_i 、 T_j 为渔区 i 、 j 的中心点海表温度。

1.2 研究方法

1.2.1 GIS 分析 利用 ArcGIS 地统计分析模块, 在

进行数据探索的基础上, Kriging 插值生成 SST、Chl-*a* 和 TGR 时间系列分布图, 并转换成 Raster 格式; 和相应时间段的鳀资源密度分布图叠加, 分析越冬鳀资源密度空间分布与环境因子的关系。

1.2.2 GAM 模型 广义可加模型(GAM)是广义线性模型(GLM)的扩展, 是一种非参数化或半参数化的回归分析方法, 能很好地模拟响应变量和一个或多个预测变量之间的关系(Hastie *et al*, 1990)。本研究采用 GAM 模型分析各时空和环境因子对鳀资源密度的非线性影响。由于调查中“零”渔获站位的出现, 一般对 CPUE 加上一个常数, 本研究中对所有 CPUE 加上常数 1 后取对数, 构建的 GAM 模型如下:

$\ln(\text{CPUE}+1) = s(\text{Year}) + s(\text{Hour}) + s(\text{Longitude}) + s(\text{Latitude}) + s(\text{SST}) + s(\text{Depth}) + s(\text{TGR}) + s(\text{Chl-}a)$, family=gaussian 式中, Year 表示年份, Hour 表示下网时间, Longitude 表示经度, Latitude 表示纬度, SST 表示海表温度, Depth 表示水深, TGR 表示海水温度梯度, Chl-*a* 表示叶绿素 *a* 浓度。模型变量选择基于模型因子的显著性($P < 0.05$), 模型选择采用赤池信息量准则(AIC, Akaike information criterion), 将解释变量随机逐个加入 GAM 模型, 得到包含不同因子的模型, AIC 值最小者为最佳模型(Damalalas *et al*, 2007)。

受其他因素的影响, 有些对鱼类分布影响较大的环境变量有可能对 CPUE 影响不显著, 对该类型变量根据实际情况进行处理。

数据分析利用 ArcGIS 10.2、SPSS 17.0 和 S-plus 8.0 软件完成。

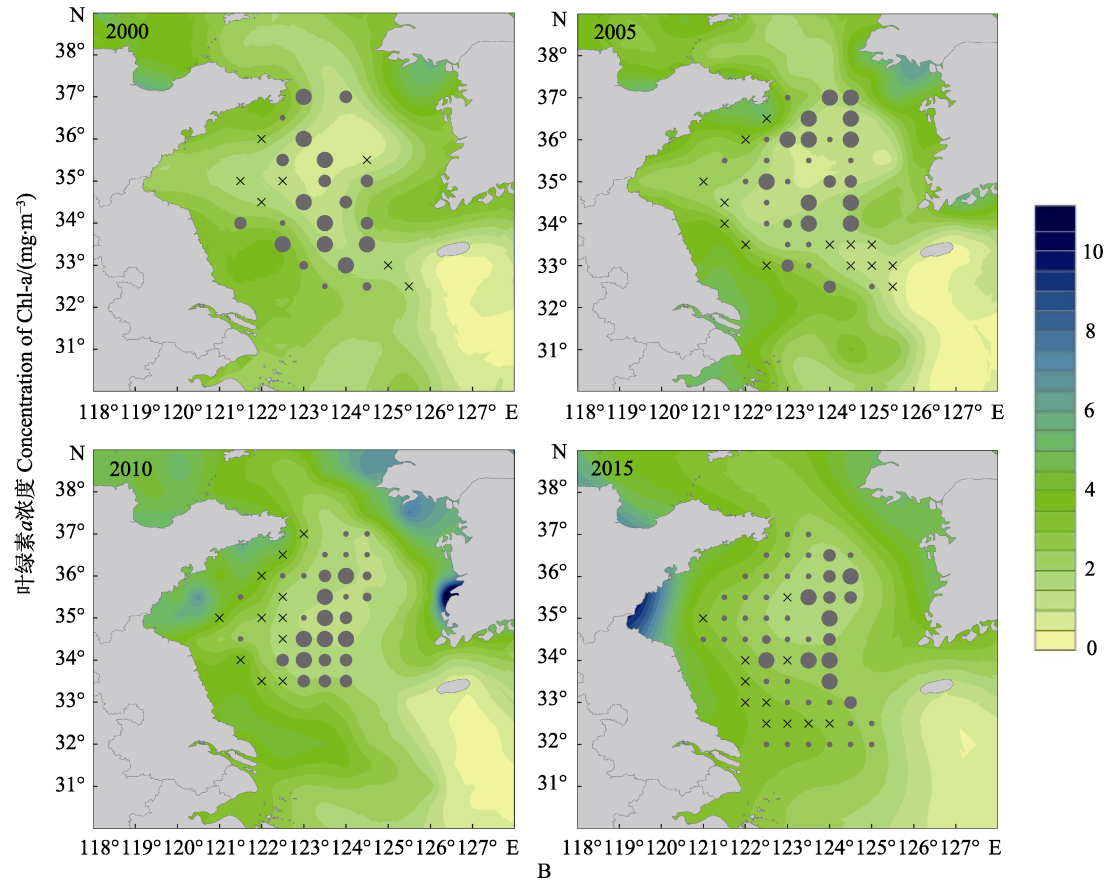
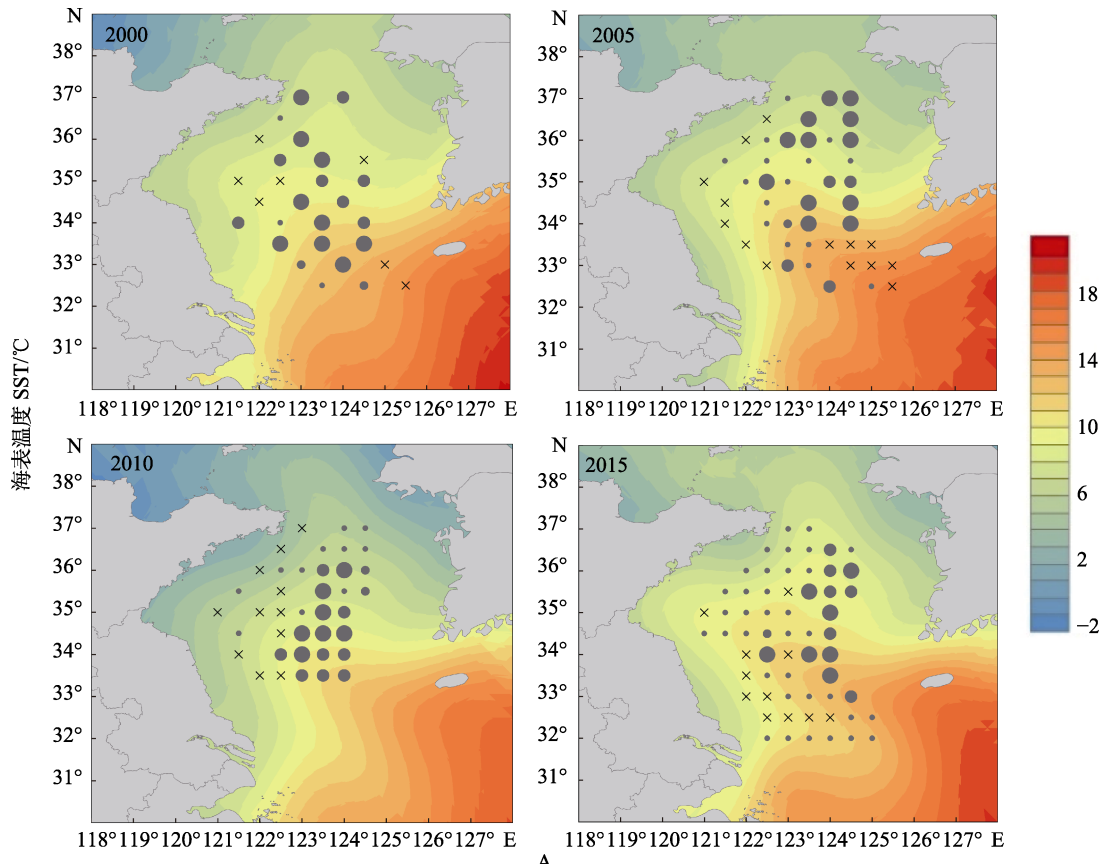
2 结果

2.1 越冬鳀时空分布与海洋环境因子的关系

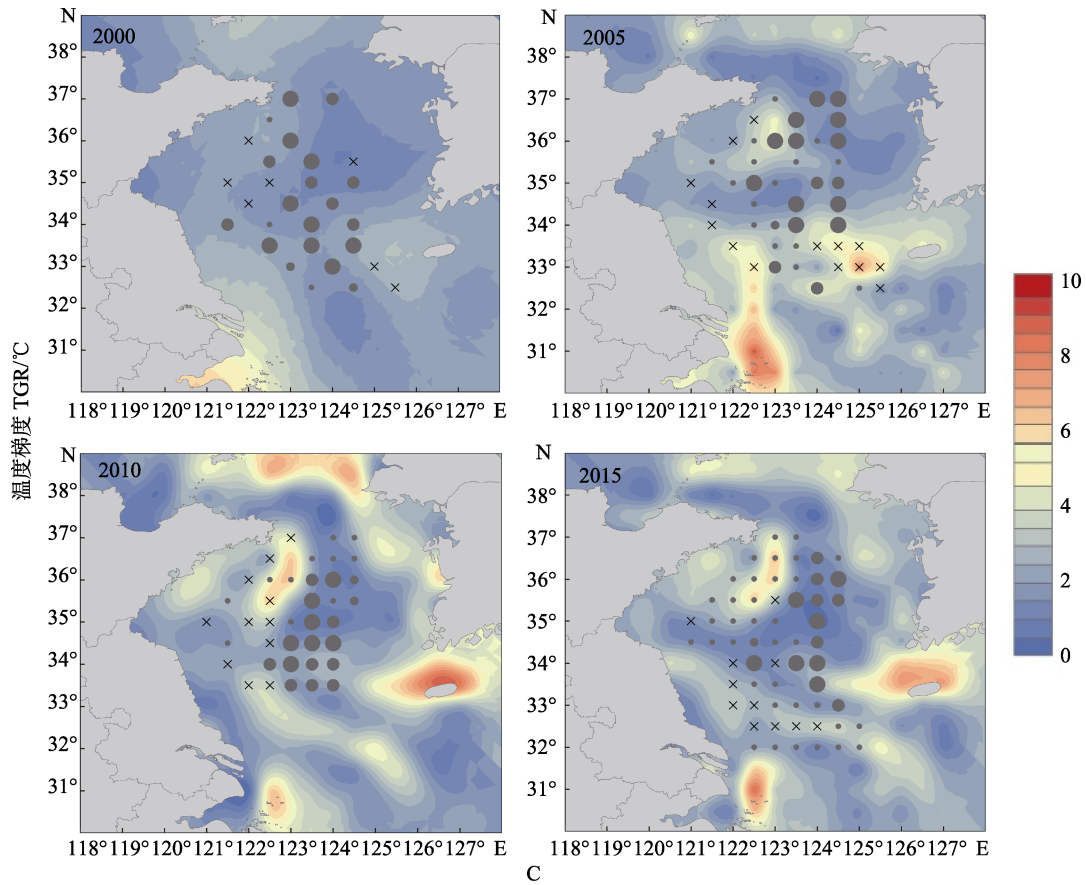
由图 1A 所知, 越冬鳀分布的温度范围较广, 从 2~17°C 都有分布, 但高资源密度区主要分布在 7~13°C 的海域内, 且集中在暖水舌及以东的区域。图 1B 所示, 越冬鳀分布在低叶绿素 *a* 浓度海域内, 主要范围为 0.5~2.5 mg/m³。2000~2015 年, 越冬鳀分布的温度梯度范围略有变化, 2005 年开始, 鳀分布区域内有高温梯度水团出现, 但纵观所有年份, 越冬鳀主要分布在低温梯度海域, 分布范围为 0.5~4°C(图 1C)。

2.2 GAM 模型

2.2.1 模型检验 GAM 模型的残差分布及其正态 Q-Q 图(Quantile-Quantile)常用来检验模型分布假设。图 2A 显示, 模型残差服从正态分布; 图 2B 的正态 Q-Q 曲线分布表明, 残差值集中于对角线上并呈线性分布, 表明残差趋向于服从均值为零的正态分布; 二者均表明 GAM 模型的分布假设比较合适。



B



图例 Legend

资源密度 Stock density Unit: g(h-net)

× Zero ● 1~500 ● 501~1000 ● 1001~5000 ● >5000

图 1 黄海越冬鲷资源密度和环境因子 SST、Chl-a 和 TGR 的空间分布
Fig.1 Spatial distribution of stock density of wintering anchovy and environmental factors such as SST, Chl-a and TGR in the Yellow Sea

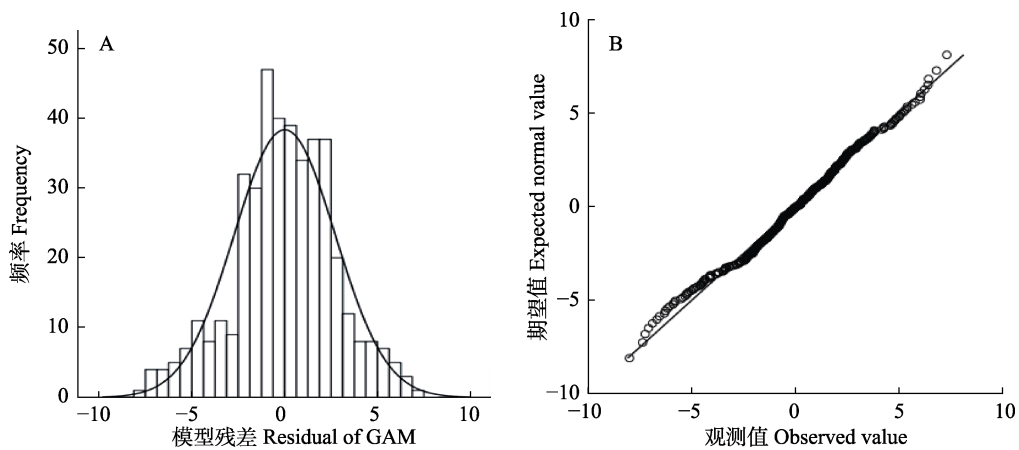


图 2 GAM 模型残差的频次分布及正态 Q-Q 图
Fig.2 Distribution and normal Q-Q plot of residuals in GAM model

2.2.2 模型和显著性因子选择 依次将各个解释变量逐一加入模型中，每一行表明了加入该因子后解释变量对模型的贡献信息。由表 1 可知，年份、下网

时间、经度、纬度、温度和水深均为显著性变量，对越冬鲷资源密度分布影响显著，卡方检验 $P < 0.05$ ；而温度梯度虽然非参数化影响不显著 [$\text{Pr}(\text{Chi}) > 0.05$]，但

加入模型后, F 检验 $P < 0.05$, 且对模型总偏差解释率大于 SST, 因此, 将温度梯度同样作为显著性因子; 叶绿素 *a* 浓度对越冬鳀资源密度分布影响不显著, 卡方检验、F 检验均 $P > 0.05$, 但模型加入该因子后, AIC 值持续变小, 且叶绿素 *a* 浓度对越冬鳀的分布也有一定的影响, 因此, 该变量仍保留在模型中。该模型对 CPUE 的总偏差解释为 44.76%, 其中, 经度和纬度对 CPUE 的影响最为显著, 分别解释了 22.76% 和 12.64% 的偏差; 年份、温度梯度、下网时间、水深、温度对 CPUE 的影响次之, 叶绿素 *a* 浓度对 CPUE 的影响最

小, 解释了 0.51% 的偏差。

2.2.3 各因子对资源密度的影响 图 3 为各因子对越冬鳀资源密度分布的影响。时间效应方面, 越冬鳀资源密度年间变化较大(图 3A), 2000~2015 年, 资源密度总体呈下降趋势; 2000~2002 年, 资源密度迅速下降; 2002~2011 年, 资源密度年间有差异, 但变化幅度较小; 2011~2015 年, 资源密度下降明显。由下网时间与越冬鳀资源密度的关系可以看出(图 3B), 0:00~07:00 资源密度呈下降趋势, 之后处在稳定和缓慢上升的阶段, 大约 19:00 左右, 资源密度开始明显上升。

表 1 GAM 模型拟合结果的偏差分析及显著性因子选择

Tab.1 Summary analysis of deviance for generalized additive models (GAM) and the obvious factors selection

模型因子 Factors added	残偏差 Residual deviance	累积解释偏差 Cumulative of deviance explained%	AIC 检验 AIC	F 检验 Pr(F)	卡方检验 Pr(Chi)
Null	5641				
+年份 + Year	5490	2.68	2277	0.001	0.048
+下网时间 + Hour	5393	4.40	2272	0.018	0.049
+经度 + Longitude	4109	27.16	2159	0.000	0.000
+纬度 + Latitude	3396	39.80	2081	0.000	0.000
+温度 + SST	3333	40.92	2075	0.102	0.001
+水深 + Depth	3250	42.39	2067	0.037	0.017
+温度梯度 + TGR	3145	44.25	2055	0.012	0.300
+叶绿素 <i>a</i> 浓度 + Chl- <i>a</i>	3116	44.76	2053	0.463	0.323

注: Pr(F)指模型本行与上一行方差分析的 F 检验值, Pr(Chi)表示模型因子非参数化影响的非线性贡献值

Note: Pr(F) is the *P*-value from an ANOVA *F*-ratio test between that row and the previous row of the model; Pr(Chi) indicates the score of the test to assess the non-linear contribution of non-parametric effects

空间效应方面, 资源密度随经度和纬度变化剧烈。越冬鳀主要分布在 122°~124.5°E 之间, 在 124°E 以西海域, 资源密度和经度呈明显的正相关关系; 在 124°E 以东海域, 资源密度和经度呈负相关(图 3C)。越冬鳀集中分布在 33°~36°N 之间, 在 34.5°N 以南的海域, 随着纬度升高, 资源密度迅速上升; 而在 34.5°N 以北海域, 随着纬度升高, 资源密度快速下降(图 3D)。

环境效应方面, 越冬鳀资源密度主要集中于 60~80 m 水深范围内, 但水深的影响以大约 50 m 为分界点, 在 50 m 以浅的水域, 随着水深的增加, 资源密度升高; 而在 50 m 以深的水域, 变化趋势则相反(图 3E)。在 7~11°C 内, 越冬鳀集中分布, 水温低于 9.5°C 时, 资源密度与其呈正相关; 水温高于 9.5°C 时, 资源密度与其呈负相关(图 3F)。越冬鳀主要分布在温度梯度 0.7~2.5°C 内, 资源密度处于平稳阶段, 随着温度梯度增大, 达到 2°C 后, 资源密度明显下降(图 3G)。在不同范围内, 叶绿素 *a* 浓度对资源密度的

影响不同, 二者之间的关系比较复杂, 正相关和负相关交替变化, 但总体来看, 越冬鳀集中分布在叶绿素 *a* 浓度 1.2~2.3 mg/m³ 之间(图 3h)。

3 分析与讨论

3.1 越冬鳀的时空分布特征

2000~2015 年, 越冬鳀资源密度呈下降趋势, 其中, 2002~2011 年资源密度年间波动不大, 但 2000~2002 年和 2011~2015 年均明显下降。20 世纪 90 年代以前, 黄海鳀资源尚未进行规模化开发, 之后鳀渔业经过快速发展, 在连续几年超过百万吨的捕捞压力下, 2003 年 1 月调查发现, 资源密度出现历史最低记录, 资源接近崩溃边缘(赵宪勇, 2006)。本研究 GAM 模型结果表明, 自 2000 年开始, 2003 年资源密度处在最低水平, 与上述研究结果一致。鱼类资源密度的影响因素众多, 但捕捞压力是最主要的因素, 决定鳀

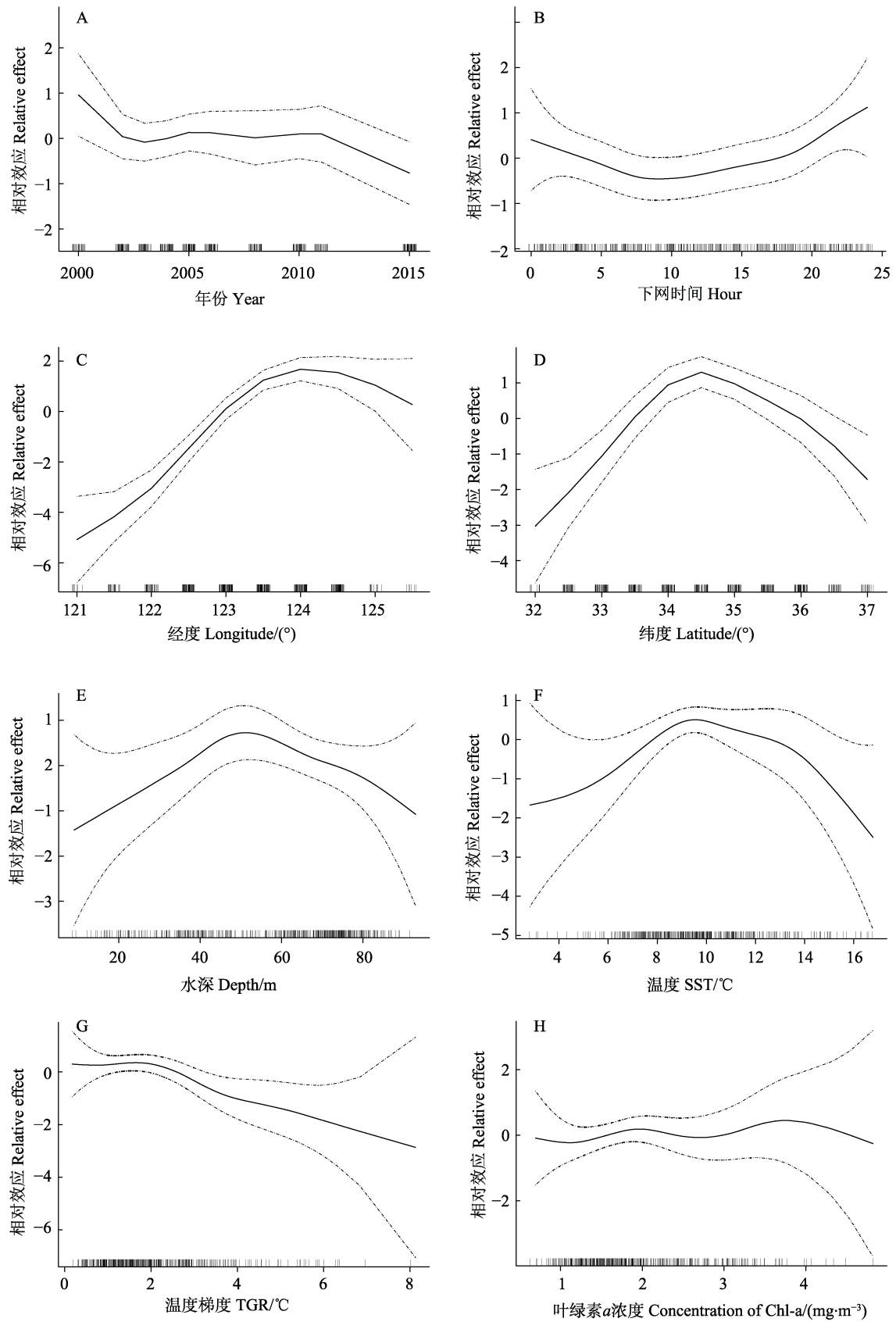


图3 时空和环境因子对黄海越冬鳀资源密度分布的影响

Fig.3 Impacts of spatio-temporal and oceanographic variables on stock density of wintering anchovy derived from the GAM analysis in the Yellow Sea

的资源丰度。黄渤海鲢年捕捞量(图 4)显示, 1989~1997 年, 鲢捕捞产量快速上升, 之后两年略有下降, 但自 1999 年开始, 捕捞量又开始增加, 2003 年达到最高值; GAM 模型结果显示, 2000~2003 年资源密度逐年下降(图 3)。自 2003 年开始, 捕捞量快速下降, 2009 年达到最低, 2010 年基本持平, 之后又明显上升(图 4); 2004~2011 年期间, 鲢资源密度存在年间波段, 但总体看来, 2010 年和 2011 年呈上升趋势, 而 2015 年却快速下降(图 3)。资源密度与捕捞量的关系充分印证了捕捞压力对鲢资源密度的影响。

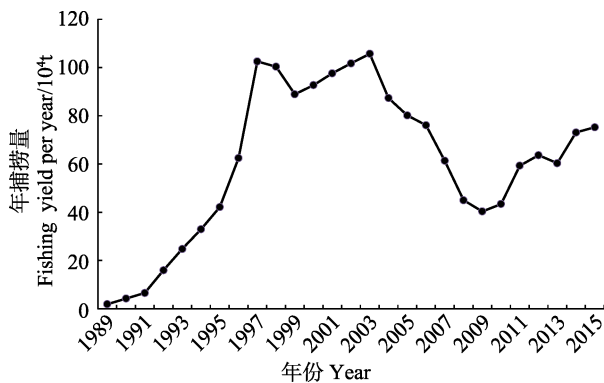


图 4 黄渤海鲢年捕捞量(数据来源: 中国渔业统计年鉴)
Fig.4 Fishing yield per year of anchovy in the Yellow Sea and Bohai Sea (Data source: China Fishery Statistics Yearbook)

GAM 结果表明, 调查捕获的鲢资源密度一天之内变化明显, 白天所捕获的资源密度较夜间稳定, 且从白天到夜晚, 资源密度不断升高, 而从夜晚到白天, 资源密度逐渐下降。这是因为冬季受强烈北风的影响, 水层垂直混合作用明显, 黄海水域基本无温跃层出现(邹娥梅, 2001; 葛人峰等, 2006)。鲢垂直分布昼夜变化明显, 在无温跃层水域, 白天常分布于中下层或近底层, 且易集成小群; 夜间则主要分散分布于中层至中上层(马绍赛, 1989; 赵宪勇, 2006)。林德芳(1997)研究显示, 对于鲢的不同集群模式, 其集群密度不同, 中层型高于近底层型, 近底层型高于表层型。因此, 白天到夜间, 鲢的集群模式由近底层型转变为中层型, 资源密度不断升高; 夜间到白天, 则反之。

黄海暖流对黄海越冬鲢的分布有重要影响, 越冬鲢主要密集于黄海暖流入侵所形成的暖水舌边缘(陈聚法, 1997; 李晓等, 2007), 图 1A 中鲢的分布与其相符。GAM 分析显示, 经纬度对越冬鲢资源密度影响最大, 贡献率占模型总贡献率的 79%。在 124°E 以西海域, 越冬鲢资源密度随经度升高而快速上升; 而在 124°E 以东海域, 由于调查数据减少, 数据相关性变差。在纬度分布上则以 34.5°N 为分界线, 34.5°N

以南的海域, 越往北, 资源密度越高; 而 34.5°N 以北海域, 越往北, 资源密度越低, 且变化明显。赵宪勇(2006)的研究表明, 越冬期间不同大小个体鲢的分布有明显的区域特征, 大个体鲢主要分布于 123°E 以东海域, 而小个体则主要分布于调查水域的北部和西部, 以西部浅水区为主。本研究结果与其一致。

3.2 越冬鲢分布与环境因子的关系

越冬鲢资源密度分布与水深关系密切, 模型贡献率为 1.47%。与其他因子不同的是, 虽然资源密度主要集中在水深 60~80 m 范围内, 但水深对资源密度的影响却以大约 50 m 为界。由图 5 可知, 从浅水区到深水区, 资源密度逐渐增大, 因此, 在浅于 50 m 的水域内, 水深与资源密度呈正相关。随着水深的继续增加, 每个调查站位的资源密度没有降低; 但由于 GAM 结果表现的是一种相对效应, 随着水深增加, 该深度范围内的站位数量减少, 因此, 总体看来, 深于 50 m 的水域, 资源密度随水深增加而降低。

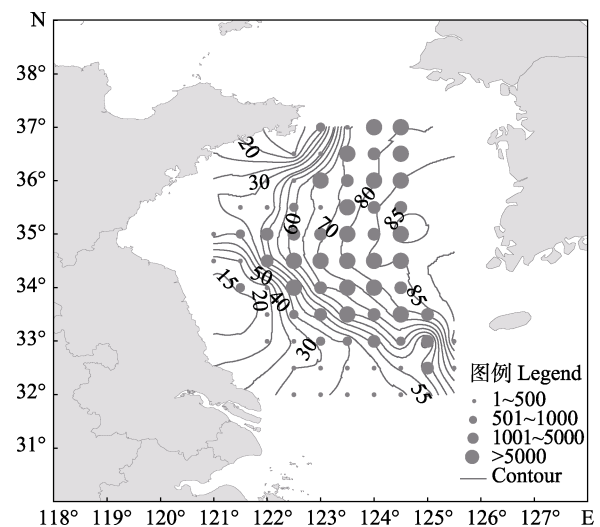


图 5 越冬鲢资源密度与水深等值线分布[g/(h·net)]
Fig.5 Map of wintering anchovy stock density and water depth contour [g/(h·net)]

水温对越冬鲢资源密度分布影响显著, 越冬鲢密集分布在 7~11°C 范围内; 小于 9.5°C 时, 资源密度随温度升高而增加; 大于 9.5°C 后, 资源密度随温度升高而降低。这是因为水温是鱼类生活环境中最基本最重要的因素, 其变化对鱼类的生活、生长及饵料的生长均产生影响, 这直接或间接地影响着鱼类资源量的分布。鲢作为小型中上层鱼类, 对水温变化敏感(李向心, 2007), 海水温度的变化影响着越冬鲢的纬向分布(牛明香等, 2012; 陈云龙, 2014; Niu *et al.*, 2017)。马绍赛(1989)和李晓等(2007)的研究表明, 越

冬鳀的适温范围为 8~15℃, 密集分布区为 11~13℃, 本研究结果略有差异。这是因为鱼类不同生活史阶段适温范围不同(Bellido *et al.*, 2001), 种群大小、年龄结构和捕捞状况等均影响越冬鳀的分布(Loots *et al.*, 2010)。本研究所用为 2000~2015 年数据, 时间跨度大, 前期研究数据分别为 1985~1987 年和 2002~2003 年; 随着捕捞压力的变化, 黄海越冬鳀的年龄结构变化明显(赵宪勇, 2006; 张俊, 2011), 因此, 适温范围有所差异。

越冬鳀的高资源密度区主要分布在温度梯度相对小的区域内(图 1C)。GAM 结果表明, 越冬鳀主要分布在大约 0.7~2.5℃ 的温度梯度范围内。在适宜的范围内, 随着温度梯度增大, 越冬鳀资源密度由基本稳定到明显下降。这是因为越冬鳀主要密集分布于黄海暖流暖水舌边缘(李骁等, 2007), 该区域温度梯度不大; 而在温度梯度大的浅水区域, 则主要分布着小个体鳀鱼(赵宪勇, 2006)。

4 结 论

越冬鳀资源密度分布与环境因子关系密切, 资源密度集中分布在一定的海表温度、叶绿素 *a* 浓度和海表温度梯度范围内。GAM 定量分析表明, 年份、下网时间、经度、纬度、水深、温度和温度梯度对越冬鳀资源密度分布影响显著。2000~2015 年, 越冬鳀资源密度总体呈下降趋势, 年间波动明显, 个别年份资源密度呈上升趋势; 下网时间对捕获的鳀资源密度影响明显, 从白天到夜晚, 资源密度逐渐升高, 而从夜晚到白天, 资源密度不断降低; 调查范围内, 经度对资源密度的影响以 124°E 为界, 纬度对资源密度的影响则以 34.5°N 为界, 两端呈现相反的变化趋势; 50 m 以浅的水域, 资源密度随水深增加而增加, 50 m 以深的水域, 资源密度随水深增加而降低; 越冬鳀集中分布在 7~11℃ 范围内, 水温明显影响着资源密度的变化趋势; 最适宜的海水温度梯度和叶绿素 *a* 浓度分别为 0.7~2.5℃ 和 1.2~2.3 mg/m³。

致谢: 感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所资源室成员及“北斗号”全体船员在野外调查取样过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- Bellido JM, Pierce GJ, Wang J. Modelling intra-annual variation in abundance of squid *Loligo forbesi* in Scottish waters using generalized additive models. *Fisheries Research*, 2001, 52(1): 23–29
- Brander K. Impacts of climate change on fisheries. *Journal of Marine Systems*, 2010, 79(3–4): 389–402
- Chen JF. Variation characteristics of three large water systems influencing the behavior and distribution of anchovy *Engraulis japonicus* in the Yellow Sea and East China Sea in autumn and winter. *Marine Fisheries Research*, 1997, 18(1): 54–59 [陈聚法. 秋冬季黄东海区影响鳀鱼行动分布的三大水系变化特征. *海洋水产研究*, 1997, 18(1): 54–59]
- Chen XJ, Tian SQ. Effects of SST and temp-spatial factors on abundance of nylon flying squid *Ommastrephes bartrami* in the Northwestern Pacific using generalized additive models. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(2): 104–112 [陈新军, 田思泉. 利用 GAM 模型分析表温和时空因子对西北太平洋海域柔鱼资源状况的影响. *海洋湖沼通报*, 2007(2): 104–112]
- Chen YL. Interannual variation in population characteristics of anchovy (*Engraulis japonicus*) and redistribution of its wintering stock under climate change scenarios in the Yellow Sea. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [陈云龙. 黄海鳀鱼种群特征的年际变化及越冬群体的气候变化情景分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Cui XS, Zhou WF, Tang FH, *et al.* The construction of habitat suitability index forecast model of *Ommastrephes bartrami* fishing ground based on constrained linear regression. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 64–72 [崔雪森, 周为峰, 唐峰华, 等. 基于约束线性回归的柔鱼栖息地指数渔场预报模型构建. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 64–72]
- Damalas D, Megalofonou P, Apostolopoulou M. Environmental, spatial, temporal, and operational effects on swordfish (*Xiphias gladius*) catch rates of eastern Mediterranean Sea longline fisheries. *Fisheries Research*, 2007, 84(2): 223–246
- Ding Q, Chen XJ, Wang JT. Comparison habitat suitability index model of *Illex argentinus* and its application into fishing ground forecasting. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 8–13 [丁琪, 陈新军, 汪金涛. 阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)适宜栖息地模型比较及其在渔场预报中的应用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 8–13]
- Fan W. A study on application of satellite remote sensing in marine fishing-ground analysis and fishing condition forecasting—A case of *Ommastrephes bartrami* fisheries in Northwest Pacific Ocean. Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2004 [樊伟. 卫星遥感渔场渔情分析应用研究——以西北太平洋柔鱼渔业为例. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2004]
- Furey NB, Rooker JR. Spatial and temporal shifts in suitable habitat of juvenile southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Sea Research*, 2013, 76: 161–169
- Ge RF, Guo JS, Yu F, *et al.* Classification of vertical temperature structure and thermocline analysis in the Yellow Sea and East China Sea shelf sea areas. *Advances in Marine Science*, 2006, 24(4): 424–435 [葛人峰, 郭景松, 于非, 等. 黄、东海陆架海域温度垂直结构类型划分与温跃层分析. *海洋*

- 科学进展, 2006, 24(4): 424–435]
- Grüss A, Drexler M, Ainsworth CH. Using delta generalized additive models to produce distribution maps for spatially explicit ecosystem models. *Fisheries Research*, 2014, 159: 11–24
- Hastie T, Tibshirani R. *Generalized additive models*. London: Chapman and Hall, 1990, 352
- Kim JY, Kang YS, Oh HJ, *et al.* Spatial distribution of early life stages of anchovy (*Engraulis japonicus*) and hairtail (*Trichiurus lepturus*) and their relationship with oceanographic features of the East China Sea during the 1997–1998 El Niño Event. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2005, 63: 13–21
- Li XX. Study on individual-based model of anchovy population dynamics in the Huanghai Sea and Bohai Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2007 [李向心. 基于个体发育的黄渤海鲱鱼种群动态模型研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007]
- Li Y, Zhao XY, Zhang T, *et al.* Wintering migration and distribution of anchovy in the Yellow Sea and its relation to physical environment. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(2): 104–112 [李峤, 赵宪勇, 张涛, 等. 黄海鲱鱼越冬洄游分布及其与物理环境的关系. *海洋水产研究*, 2007, 28(2): 104–112]
- Lin DF. Studies on the distribution pattern of Japanese anchovy in Yellow Sea and East China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(1): 44–48 [林德芳. 东、黄海鲱鱼集群分布模式的研究. *水产学报*, 1997, 21(1): 44–48]
- Link JS. Ecological considerations in fishery management: When does it matter? *Fisheries*, 2002, 27: 10–17
- Loots C, Vaz S, Planque B, *et al.* What controls the spatial distribution of the North Sea plaice spawning population? Confronting ecological hypotheses through a model selection framework. *ICES Journal of Marine Science*, 2010, 67(2): 244–257
- Ma SS. Relationship between distribution and hydrological conditions of the wintering anchovy in Yellow Sea and East China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 1989, 13(3): 201–206 [马绍赛. 黄、东海越冬鲱鱼的分布与水温条件的关系. *水产学报*, 1989, 13(3): 201–206]
- Martin CS, Carpentier A, Vaz S, *et al.* The channel habitat atlas for marine resource management (CHARM): An aid for planning and decision-making in an area under strong anthropogenic pressure. *Aquatic Living Resources*, 2009, 22: 499–508
- MSS. The hydrologic characteristics of the southern Huanghai Sea and East China Sea during winter and their relations to fishing grounds of anchovy. *Marine Forecasts*, 1987, 4(4): 37–44 [马绍赛. 南黄海和东海冬季水文状况及其与鲱鱼渔场的关系. *海洋预报*, 1987, 4(4): 37–44]
- Niu MX, Wang J. Variation in the distribution of wintering anchovy *Engraulis japonicas* and its relationship with water temperature in the central and southern Yellow Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2017, 35(5): 1134–1143
- Niu MX, Li XS, Zhao GX. Spatial distribution of wintering anchovy *Engraulis japonicas* and its relationship with the inter-annual variations of water temperature in central and southern Yellow Sea. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(2): 552–558 [牛明香, 李显森, 赵庚星. 黄海中部越冬鲱鱼空间分布及其与水温年际变化的关系. *应用生态学报*, 2012, 23(2): 552–558]
- Tang QS. The new age of China-GLOBEC study. *Newsletter of the North Pacific Marine Science Organization*, 2000, 8(1): 28–29
- Wang HZ, Dai XJ, Guan WJ, *et al.* Relationship between the environmental factors and the CPUE (catch per unit) of *Pseudocarcharias kamoharui* in tropical Atlantic Ocean based on the GAM-Tweedie model. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(6): 2024–2031 [王浩展, 戴小杰, 官文江, 等. 基于 Tweedie-GAM 模型的热带大西洋拟锥齿鲨单位捕捞努力量渔获量与环境因子的关系. *应用生态学报*, 2017, 28(6): 2024–2031]
- Yang SL, Zhang BB, Tang BJ, *et al.* Influence of vertical structure of the water temperature on bigeye tuna longline catch rates in the tropical Atlantic Ocean. *Journal of Fishery Science of China*, 2017, 24(4): 875–883 [杨胜龙, 张怵怵, 唐宝军, 等. 基于 GAM 模型分析水温垂直结构对热带大西洋大眼金枪鱼渔获率的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 875–883]
- Zhang J. Estimation of the anchovy resources in the Yellow Sea based on acoustic data post-processing system. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [张俊. 基于声学数据后处理系统的黄海鲱鱼资源声学评估. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhao X, Hamre J, Li F, *et al.* Recruitment, sustainable yield and possible ecological consequence of the sharp decline of the anchovy (*Engraulis japonicus*) stock in the Yellow Sea in the 1990s. *Fisheries Oceanography*, 2003, 12(4–5): 495–501
- Zhao XY. Population dynamic characteristics and sustainable utilization of the anchovy stock in the Yellow Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2006 [赵宪勇. 黄海鲱鱼种群动力学特征及其资源可持续利用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006]
- Zou EM, Xiong XJ, Guo BH, *et al.* Characteristics and seasonal variations of the thermocline and halocline in the Huanghai Sea and East China Sea. *Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas*, 2001, 19(3): 8–18 [邹娥梅, 熊学军, 郭炳火, 等. 黄、东海温盐跃层的分布特征及其季节变化. *黄渤海海洋*, 2001, 19(3): 8–18]

The Relationship of Stock Density Distribution of Wintering Anchovy (*Engraulis japonicus*) and Environmental Factors Based on Remote Sensing in Central and Southern Yellow Sea

NIU Mingxiang¹, WANG Jun^{1,2}①, WU Qiang¹, SUN Jianqiang¹

(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, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao 266071; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao 266237)

Abstract Marine environmental factors affect the survival, growth, and reproduction of fish, etc., which play an important role in controlling fish population distribution. In addition, variation of marine environmental factors influences the spatial distribution and aggregation of fish. Based on remote sensing (RS) technology and geographic information system (GIS), the relationship between the spatial distribution of wintering anchovy (*Engraulis japonicas*) and environmental factors are analyzed, and then generalized additive models (GAMs) were established to quantitatively investigate the effects of spatio-temporal and environmental factors on stock density, using data collected by bottom trawl surveys and RS in central and southern Yellow Sea during 2000~2015. The results showed that wintering anchovy was concentrated in certain ranges of sea surface temperature (SST), chlorophyll *a* (Chl-*a*) concentration, as well as temperature gradient (TGR). The final model accounted for 44.76% of the variance in anchovy stock density. The spatio-temporal factors (year, hour, longitude, latitude) all had significant effects ($P<0.05$) on stock density, and spatial factors had the greatest impacts, accounting for 35.4% of the variance. Environmental factors such as water depth, SST, and TGR all had significant impacts on stock density ($P<0.05$). However, Chl-*a* concentration did not have a significant effect on anchovy stock density. The distribution of Chl-*a* concentration represents certain hydrodynamic characteristics; therefore, Chl-*a* concentration was included in the final model. Wintering anchovy was most abundant where the SST was between 7°C and 11°C. The effect of SST on stock density was positive for temperatures lower than 9.5°C, and then there was a negative effect at warmer temperatures. Stock density was high where Chl-*a* concentration was between 1.2 and 2.3 mg/m³ and where TGR was from about 0.7°C to 2.5°C; however, there were slight changes between the abundant ranges. The results of this study have important implications for fisheries management under marine environment dynamic scenarios in the Yellow Sea.

Key words Spatio-temporal distribution; Environmental factors; Generalized additive model; Marine remote sensing; *Engraulis japonicus*; Yellow Sea

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190125003

http://www.yykxjz.cn/

柴然, 冯娟, 陈碧鹃, 夏斌, 孙雪梅, 王晓晓, 陈聚法, 崔正国, 曲克明. 崂山近岸浮游植物群落结构季节变化及其环境影响因素. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 21-30

Chai R, Feng J, Chen BJ, Xia B, Sun XM, Wang XX, Chen JF, Cui ZG, Qu KM. Seasonal variations in the phytoplankton community structure and their environmental impact factors in the offshore area of Laoshan, Qingdao. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 21-30

崂山近岸浮游植物群落结构季节变化 及其环境影响因素*



柴 然^{1,2} 冯 娟¹ 陈碧鹃^{2,3} 夏 斌^{2,3}
孙雪梅^{2,3①} 王晓晓⁴ 陈聚法² 崔正国² 曲克明²

(1. 青岛大学环境科学与工程学院 青岛 266071; 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 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071; 4. 青岛市崂山区自然资源局 青岛 266106)

摘要 为了解山东省青岛市崂山近岸海域浮游植物群落结构变化特征及其与环境因子的关系,于2016~2017年的春、夏、秋3个季节在该海域设置15个监测站位进行调查,并同步监测海区环境因子。结果显示,共检出浮游植物2门31属69种。其中,硅藻门(Bacillariophyta)为绝对优势门类,共25属60种,甲藻门(Pyrophyta)有6属9种。调查海区浮游植物细胞丰度变化范围为(732.10~1142.19)×10⁴ cell/m³,平均为937.15×10⁴ cell/m³。浮游植物细胞丰度季节变化明显,2016年最高峰出现在秋季;2017年最高峰出现在夏季;空间分布上,春、夏2个季节呈现由北向南递减的趋势。浮游植物群落结构特征指数分析结果显示,调查海域浮游植物的多样性指数和丰富度指数均较好,表明该海域浮游植物群落结构比较稳定。聚类分析结果显示,春季浮游植物细胞丰度季节变化不大,2016和2017年相似性高达70%左右,但夏、秋季的浮游植物细胞丰度季节变化较大,相似性仅为40%左右,这主要与环境因子变化有关。浮游植物群落结构与环境因子相关性分析表明,浮游植物细胞丰度平均值与化学需氧量(COD)的相关系数最高,最高值为0.536,其次与之相关的双因子组为pH与COD、COD与无机氮(DIN)、溶解氧(DO)与COD。因此,崂山近岸海区浮游植物细胞丰度的关键限制因子为COD、pH、DIN和DO。

关键词 浮游植物; 崂山近岸; 群落结构; 环境因子

中图分类号 S931.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0021-10

在海洋生态系统中,浮游植物是一种含有色素或色素体的自养单细胞微生物,其特点是生命力强、繁

* 国家重点研发计划-生态环境损害鉴定评估业务化技术研究(2016YFC0503600)和国家基金委-山东省联合基金项目“海洋生态与环境科学”(U1606404)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program-Business Technology Research on Eco-Environmental Damage Assessment (2016YFC0503600), and the Joint Project of State Fund Committee and Shandong Province "Marine Ecology and Environmental Science" (U1606404)]. 柴 然, E-mail: 1215113055@qq.com

① 通讯作者: 孙雪梅, E-mail: sunxm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-01-25, 收修改稿日期: 2019-03-21

殖周期短、对环境变化反应敏感,其作为食物链中的初级生产者,承担着海洋生态系统中能量转化与流动和物质循环的重要环节。海洋环境的变化可以影响浮游植物群落的种类组成、结构和细胞丰度等(王文海等,2011)。因此,浮游植物可作为环境监测评估中的指示生物,其群落结构特征是评价海域营养水平、污染状况、资源现状以及生产潜力和海洋生态系统稳定性的重要指标。

崂山近岸为山东青岛崂山区周边开放海域,北接即墨区近岸海域,西接青岛市区近海,王哥庄湾、仰口湾分布于其北部海域,南部分布有太清宫湾、流清河湾、沙子口湾以及多条河流入海口。海湾总面积约为 188 km²,最大水深为 14 m,生物资源丰富,湾内与外海水体交换情况良好,为山东省魁蚶(*Scapharca broughtonii*)等贝类资源放流的重点海域(张波等,2015)。近岸海域是海陆之间相互作用最强烈的区域之一,是许多海洋生物重要的索饵场和洄游通道,物质循环和能量传递较为活跃(宋秀凯等,2016)。近年来,人类对近岸海域的开发利用不断深入,使得水质污染日趋严重,生物多样性日益降低(乔芮等,2015)。在近海环境不断恶化的胁迫下,浮游植物群落结构常处于不稳定状态(郭术津等,2014),因此,需要针对近岸海域生态系统开展深入研究。

近年来,山东半岛近海海域浮游植物群落结构方面的研究多集中在莱州湾和胶州湾(陈碧鹃等,2001)。研究表明,莱州湾浮游植物数量变动与温度呈显著的正相关,与盐度呈显著的负相关,但与单一营养盐之间的相关关系并不显著(宁璇璇等,2011;于潇等,2018)。胶州湾浮游植物生物量(细胞丰度、叶绿素 *a* 质量浓度)在不同月份的变化与海水温度、营养盐结构和营养盐浓度呈显著正相关(王妍等,2014)。为客观反映近岸海域生态环境变化对浮游植物群落演变的影响,本研究对 2016~2017 年春、夏和秋 3 个季节崂山近岸浮游植物的群落结构特征进行了分析,并探讨其与关键环境因子的相关性,以期研究人类活动对近岸海域生态系统演化的影响提供基础数据,同时,为崂山近岸海域开展贝类资源增殖放流和渔业资源保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 监测区域

本次调查的采样时间为 2016 年春季(5 月)、夏季(8 月)、秋季(11 月)和 2017 年的春季(5 月)、夏季(9 月)、秋季(11 月),采样地点为山东青岛市崂山湾的沿岸近海海域(120.507°~120.707°E, 36.083°~36.142°N),共布设 15 个监测站位(图 1)。

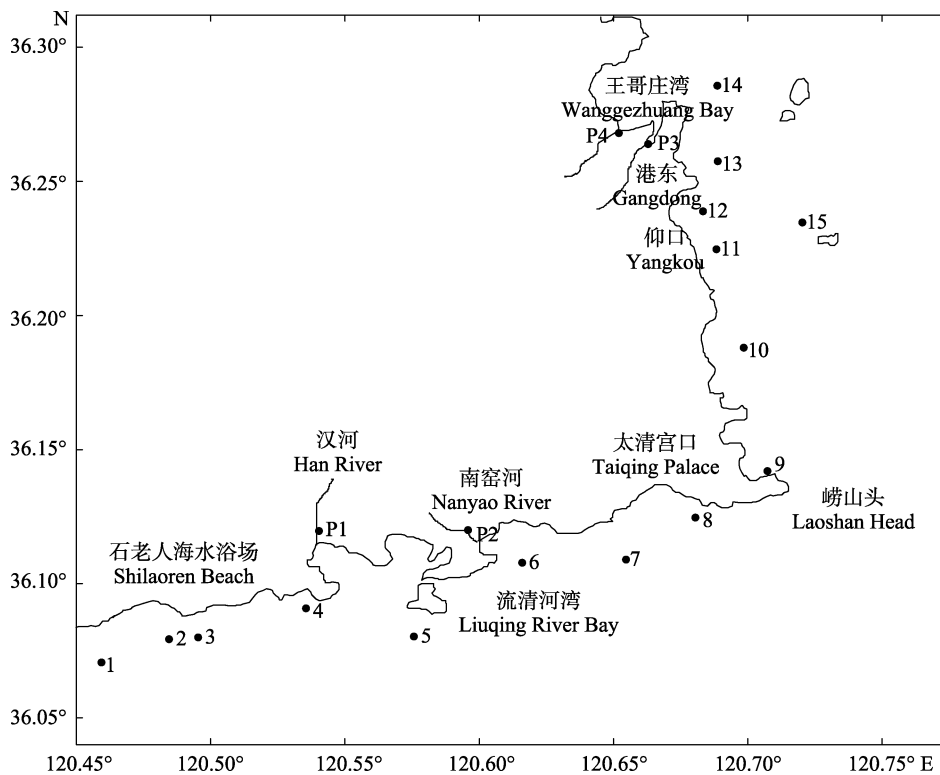


图 1 2016~2017 年崂山近岸浮游植物采样站位

Fig.1 Sampling sites of phytoplankton in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

1.2 样品采集

浮游植物的采集参照《海洋调查规范》(GB/T12763.6-2007)的方法。具体操作方法: 在每个站位, 通过浅水Ⅲ型浮游生物网在采样点进行垂直拖网采样, 所采集生物样品采用含量为 5%的甲醛溶液进行固定, 用显微镜对浮游植物进行分类鉴定与数量统计。现场采样时, 使用多参数水质监测仪(YSI 556 型, 美国)同步测定海水表层温度(T)、表层盐度(S)、化学需氧量(COD)、溶解氧(DO)、pH 等指标, 同步采集水样, 带回实验室测定无机氮(DIN)、活性磷酸盐(DIP)和叶绿素 a (Chl- a)等。海水样品的采集、储存和环境参数测定严格按照《海洋监测规范》(GB/T17378-2007)中的方法进行。

1.3 数据分析

1.3.1 优势种的确定 采用种类优势度(Y)公式:

$$Y = (N_i / N) f_i$$

式中, N_i 为所测第 i 种生物的个体数; N 为所采集生物种的总物种数; f_i 为第 i 种生物所出现的频率。 $Y > 0.02$ 为优势种(Shannon *et al.*, 1963)。

1.3.2 群落结构特征指数的计算 Margalef 丰富度指数公式:

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

式中, S 为总物种数; N 为同一样品中的总个体数(Margalef *et al.*, 1968)。

Shannon-Winner 多样性指数(H')公式:

$$H' = -\sum P_i \log_2 P_i (P_i = N_i / N)$$

式中, N 为同一采集样品中的总生物个体数; N_i 为第 i 种物种的总个体数(Shannon *et al.*, 1963)。

Pielou 均匀度指数(J)公式:

$$J = H / \log_2 S \text{ (Pielou } et al., 1969)$$

1.4 群落结构分析

本研究通过生物统计学分析软件 PRIMER 7.0, 对 2016~2017 年崂山近岸浮游植物群落结构进行分析, 以浮游植物种类、细胞丰度及监测站位组成原始数据矩阵, 所监测的站点为矩阵的样本, 各站点浮游植物种类和丰度为矩阵的变量, 将 2016~2017 年崂山近岸浮游植物原始丰度数据进行平方根转化, 以 Bray-Curtis 相似性系数为基础, 构建崂山近岸各站站位的等级相似矩阵。同时, 采用 BIOENV 分析 2016~2017 年崂山近岸浮游植物群落的细胞丰度与环境因子之间的相关性(周红等, 2003)。崂山近岸海域浮游植物丰度平面分布图采用 Surfer 8.0 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 浮游植物种类组成

2016~2017 年, 崂山近岸调查海域共检出浮游植物 2 门 31 属 69 种。其中, 硅藻门(Bacillariophyta) 共有 25 属 60 种, 占浮游植物的 86.95%; 以圆筛藻属(*Coscinodiscus*)的种类数最多, 达 11 种; 其次是角毛藻属(*Chaetoceros*), 达 9 种。甲藻门(Pyrrophyta)有 6 属 9 种, 占浮游植物的 13.04%; 其中, 角藻属(*Ceratium*)有 2 种。由此可见, 2016~2017 年崂山近岸海域浮游植物群落构成以硅藻门和甲藻门为主, 硅藻门在物种数量和细胞丰度上占绝对优势。浮游植物的生态类型主要是广温、广盐的广布性种类, 如中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、丹麦细柱藻(*Leptocylindrus danicus*)、柔弱角毛藻(*Chaetoceros debilis*)、尖刺伪菱形藻(*Pseudonitzschia pungens*)、扁面角毛藻(*Chaetoceros compressus*)、星脐圆筛藻(*Coscinodiscus asteromphalus*)等; 近岸广温性种类, 如派格棍形藻(*Bacillaria paxillifera*)、旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)、劳氏角毛藻(*Chaetoceros lorenzianus*)和冰河拟星杆藻(*Asterionellopsis glacialis*)等; 温带沿岸性种类, 如柔弱伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia delicatissima*)、丹麦细柱藻(*Leptocylindrus danicus*)、泰晤士旋鞘藻(*Helicotheca tamesis*)、柔弱几内亚藻(*Guinardia delicatula*)和旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)等; 外洋性种类, 如虹彩圆筛藻(*Coscinodiscus oculus-iridis*)、偏心圆筛藻(*Coscinodiscus excentricus*)等; 浮游性种类, 如中华齿状藻(*Biddulphia sinensis*)和翼根管藻印度变形(*Rhizosolenia alata f. indica*)等; 暖水性种类, 如薄壁几内亚藻(*Guinardia flaccida*)等。

表 1 为 2016~2017 年崂山近岸海域浮游植物群落优势种组成具有明显的季节演替现象。春季主要优势种为虹彩圆筛藻($Y=0.048\sim 0.174$)、梭角角藻(*Ceratium fusus*, $Y=0.029\sim 0.089$)、星脐圆筛藻($Y=0.081\sim 0.149$)等。圆筛藻属在各站位出现频率为 100%, 且丰度较高。角毛藻属以北温带广布性种为主, 如柔弱角毛藻等。夏季主要优势种有虹彩圆筛藻($Y=0.024\sim 0.131$)、劳氏角毛藻($Y=0.039\sim 0.117$)、柔弱伪菱形藻($Y=0.02\sim 0.133$)、星脐圆筛藻($Y=0.02\sim 0.102$)、中肋骨条藻($Y=0.02\sim 0.099$)等。夏季出现的优势种以广布性类群与近岸广温性类群为主。秋季主要优势种有虹彩圆筛藻($Y=0.147\sim 0.241$)、卡氏角毛藻(*Chaetoceros castracanei*, $Y=0.036\sim 0.053$)、星脐圆筛藻($Y=0.137\sim 0.221$)、翼根管藻印度变形($Y=0.032\sim 0.203$)等。浮游

性类群在秋季浮游植物群落中占有一定的地位,但优势种类出现不多。温带沿岸性物种数量有一定程度的升高,但优势地位却有所下降,对秋季崂山近岸海域

浮游植物群落构成的贡献有一定程度的下降。与夏季相比,近岸广温性类群中的一些物种如劳氏角毛藻依然作为优势种出现。

表 1 2016~2017 年调查海域浮游植物优势种及优势度
Tab.1 Dominant species and predominance of phytoplankton in the survey area in 2016 and 2017

2016~2017 崂山近岸优势种 2016~2017 dominant species in offshore area of Laoshan	优势度 Y					
	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn	
	2016-05	2017-05	2016-08	2017-09	2016-11	2017-11
斑点海链藻 <i>Thalassiosira punctigera</i>			0.049		0.061	0.053
丹麦角毛藻 <i>Chaetoceros danicus</i>					0.063	
卡氏角毛藻 <i>C. castracanei</i>	0.023				0.060	0.036
劳氏角毛藻 <i>C. lorenzianus</i>			0.039	0.083	0.035	
柔弱角毛藻 <i>C. debilis</i>				0.021		
高齿状藻 <i>Odontella regia</i>	0.020	0.028				
格氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus granii</i>	0.021				0.023	0.023
虹彩圆筛藻 <i>C. oculus-iridis</i>	0.079	0.155	0.110	0.024	0.147	0.158
琼氏圆筛藻 <i>C. jonesianus</i>			0.022			
星脐圆筛藻 <i>C. asteromphalus</i>	0.081	0.149	0.086		0.221	0.221
中心圆筛藻 <i>C. centralis</i>		0.024	0.041			
海洋曲舟藻 <i>Pleurosigma pelagicum</i>	0.021					
派洛棍形藻 <i>Bacillaria paxillifera</i>	0.064	0.050		0.083		0.047
柔弱伪菱形藻 <i>P. delicatissima</i>	0.027			0.060		
三角角藻 <i>Ceratium tripos</i>			0.047			
梭角角藻 <i>C. fusus var. schuttii</i>	0.089	0.053	0.035			
大角角藻 <i>C. macroceros</i>			0.043			
透明辐杆藻 <i>Bacteriastrum hyalinum</i>	0.037	0.026				
针杆藻 <i>Synedra</i> spp.	0.076	0.061				0.024
翼根管藻印度变形 <i>R. indica</i>			0.028		0.162	0.097
中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>				0.075		

2.2 浮游植物丰度的时空分布

2.2.1 平面分布 从图 2 可以看出,调查期间,同一季度不同年份中,崂山近岸浮游植物丰度的平面分布均有不同。2016、2017 年春季,浮游植物丰度的平面分布均呈现从北部向南部逐渐减少的趋势。高值区出现在王哥庄湾一带,其数值范围为 $(44.19\sim 70.16)\times 10^4 \text{cell/m}^3$ 。2017 年 5 月,南部沿岸浮游植物细胞丰度整体大于 2016 年同期。夏季浮游植物丰度均远高于 5 月,在两年夏季中,最大峰值出现的海域不同。2016 年夏季,浮游植物东部近岸数量较大且分布较为均匀,南岸除在南窑河及石老人附近海域丰度较高外,其余整体丰度较低。2017 年夏季,浮游植物丰度分布仍呈现由北向南递减的趋势,但东部近岸水域丰度整体低于上年同期,南部浮游植物的数量分布相对较均匀,高值区出现在王哥庄、太清宫口

水域。在 2016 和 2017 年秋季,浮游植物的分布格局与春、夏季有明显的差异,南部近岸整体浮游植物丰度明显增高,与北部、东部近岸持平,高值区在南窑河与石老人海水浴场一带。综上所述,崂山近岸浮游植物丰度平面分布较密集的海区主要出现在王哥庄湾、南窑河与石老人海水浴场一带,春、夏季浮游植物丰度分布特征为北部沿岸大于南部沿岸;秋季南、北部沿岸分布较均匀。

2.2.2 季节变化 浮游植物细胞丰度季节变化明显,2016 年秋季>夏季>春季,而 2017 年夏季>春季>秋季。据中国海湾志记载(中国海湾志编纂委员会,1993),崂山湾浮游植物群落上、下半年分别出现 1 个数量高峰,宋秀凯等(2016)的调查结果与这一变化趋势相一致。由于本次只调查了 3 个季节,无法体现出双峰变化,但仍然可以看出,上半年有 1 个高峰期,且夏季浮游植物丰度大于春季。

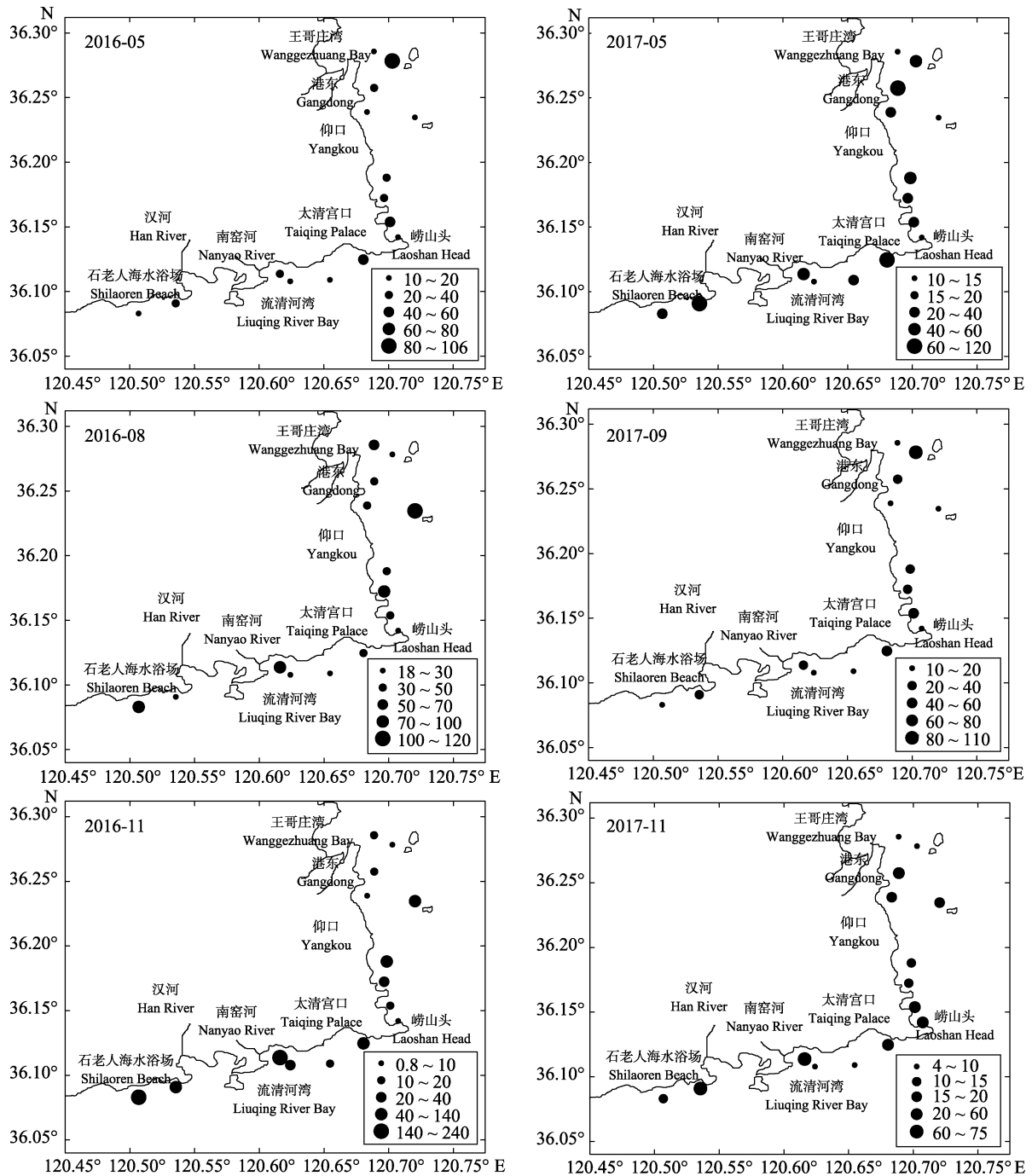


图 2 崂山近岸浮游植物丰度平面分布($\times 10^3$ cell/ m^3)

Fig.2 Horizontal distribution of cell abundance of phytoplankton in offshore area of Laoshan ($\times 10^3$ cell/ m^3)

从图 3a 可以看出, 调查海域春季的细胞丰度平均值为 496×10^4 cell/ m^3 , 略高于同处于黄海北部的胶州湾 (175×10^4 cell/ m^3) (王妍等, 2014)。此时, 甲藻数量占比达最高, 与渤海湾(周然等, 2013)、胶州湾(孙晓霞等, 2011)春季的甲藻数量增多的结论相一致。夏季细胞丰度平均值为 937×10^4 cell/ m^3 , 略高于 2012 年的调查结果 [$(200 \sim 500) \times 10^4$ cell/ m^3] (孙雪梅等, 2013)。该季节的浮游植物以硅藻为主, 丰度占总量的 95.6%~

97.0%, 甲藻占总量的 3.0%~4.4%(图 3b)。在采集到的浮游植物的总物种数中, 仍以硅藻为主, 约占总物种数的 97.0%~98.8%, 甲藻占总物种数的 1.2%~3.0%。在该季度监测期间, 浮游植物结构变化相对稳定。秋季细胞丰度平均值为 621×10^4 cell/ m^3 , 大于宋秀凯等(2016)的 2012~2014 年对崂山近岸浮游植物细胞丰度调查值 (26.6×10^4 cell/ m^3), 说明近几年浮游植物数量略有提升, 但仍远远低于胶州湾 (2900×10^4 cell/ m^3) (孙晓霞

等, 2011)与莱州湾($6623.22 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$) (宁璇璇等, 2011)浮游植物细胞丰度值。

2.3 丰富度指数、多样性指数、均匀度指数的季节变化

Shannon-Winner 多样性指数用于判断群落结构的复杂程度(赵其彪等, 2015), 均匀度指数用于判断群落是否成熟稳定(杨晓改等, 2014)。多样性指数 >1 、均匀度指数 >0.3 , 则认为该群落多样性较好(李广楼等, 2006)。2016~2017年浮游植物群落结构参数变化情况见图4。从图4可以看出, 各季节的多样性指数平均值为1.15~2.50, 年平均值为2.16, 各月均大于1。各

季节均匀度指数的平均值为0.68~0.90, 年平均值为0.82, 各月均大于0.3。可以认为, 2016~2017年崂山近岸浮游植物群落结构较为稳定, 组成物种数较多, 生物多样性较好, 物种生物量分布比较均匀。从全年来看, 多样性指数与均匀度指数呈现较为明显的季节变化。2016年春季多样性指数为2.46, 夏季略微升高, 达到2.50, 最低值出现在秋季, 为2.24。而2017年春季多样性指数为2.34, 夏季较春季有所下降, 为2.26, 在秋季降至最低, 为1.15。两年中均在秋季呈骤降趋势。从图4可以看出, 均匀度指数的季节变化趋势与多样性指数相同, 最低值都出现在秋季, 但季节间的差异不显著。

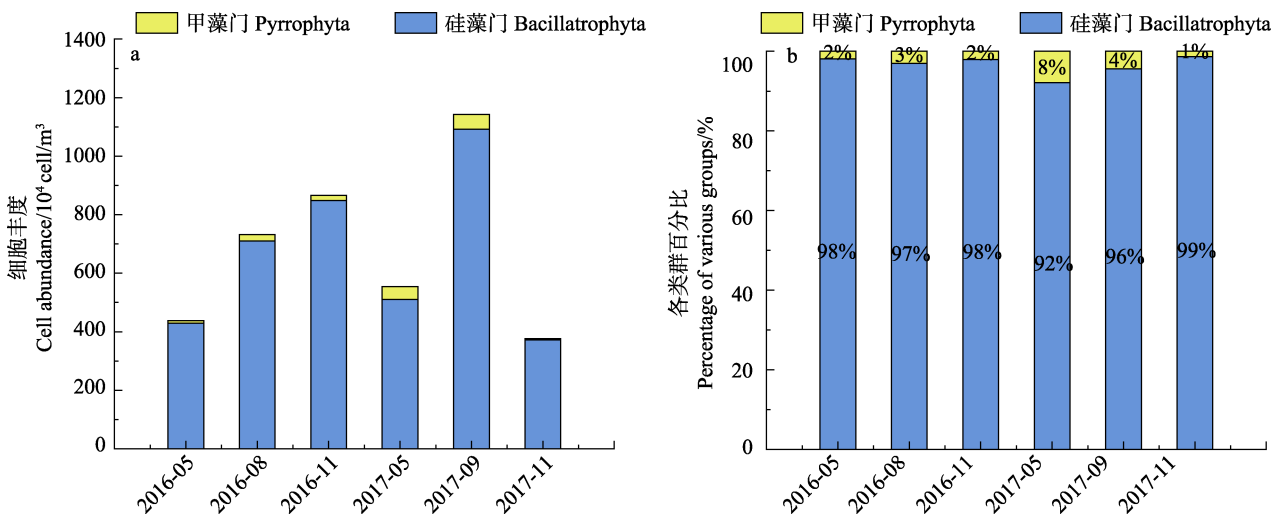


图3 2016~2017年崂山近岸浮游植物细胞丰度变化(a)与各类群数量百分比(b)

Fig.3 Variation of phytoplankton cell abundance (a), and the percentage (b) in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

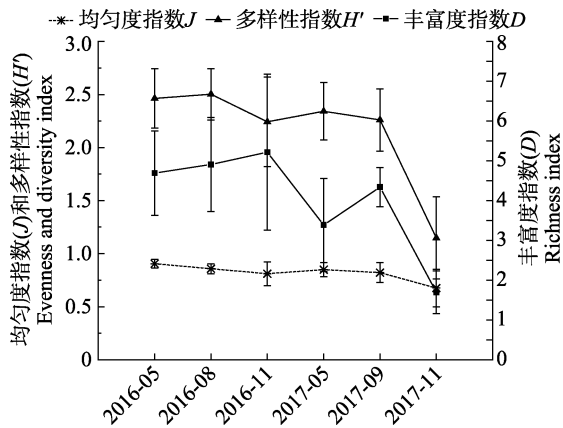


图4 2016~2017年崂山近岸丰富度指数、多样性指数、均匀度指数季节变化

Fig.4 Variation in richness index, diversity index, and evenness of phytoplankton community in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

从图4可以看出, 丰富度指数呈较明显的变化趋势, 反映出不同季节浮游植物种类数量差异较大。

2016年为秋季 $>$ 夏季 $>$ 春季, 而2017年丰富度指数整体下降, 最高值出现在夏季, 秋季最低。综合对比图3a与图4可以看出, 浮游植物细胞丰度与多样性指数的变化趋势一致。即在2016年3个季节都稳步上升, 浮游植物细胞丰度峰值出现在11月, 同时, 本月的丰富度指数也是全年最高值, 这与硅藻的大量繁殖有关。春季丰富度指数与多样性指数变化趋势不同, 这通常与单一藻类优势过高有关。2017年9月, 浮游植物细胞丰度、多样性指数和丰富度指数均处于高峰期, 即物种种类多、各物种多样性好、分布均匀, 这可能是因为夏季是浮游植物种类交替的季节, 从而使浮游植物呈现细胞丰度高且多样性较好的特点。

2.4 浮游植物群落结构季节变化聚类分析

不同季节浮游植物群落的聚类分析结果见图5。从图5可以看出, 浮游植物群落相似性在40%水平, 主要分为2个组群。第1组群为2017年的9、11月, 其余月份为第2组群, 在第2组群中, 2016年5月

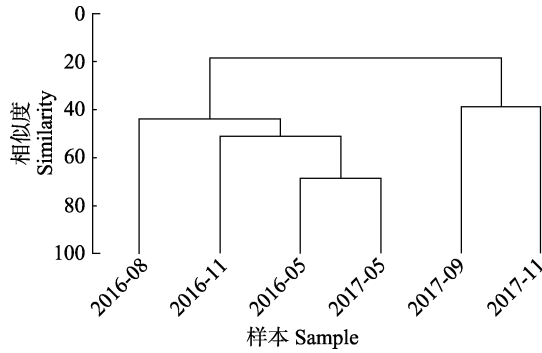


图 5 2016~2017 年崂山近岸浮游植物群落的 CLUSTER 聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of phytoplankton community in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

与 2017 年 5 月相似度高达 70%。第 1 组群 2017 年 9、11 月的特征种为虹彩圆筛藻和劳氏角毛藻, 该组群种类组成以近岸广温性种为主, 外洋性种类的细胞数量在这一组群中占有一定优势。2017 年春季与夏季的相似度较低。从图 4 还可以看出, 2017 年丰富度指数 9 月明显高于 5 月。这可能是由不同藻类生长依赖于不同的影响因子所致(许海等, 2012)。如新月

菱形藻、舟形藻的主要影响因子为磷酸盐, 中肋骨条藻的主要影响因子为 COD(王欣等, 2014)。由于崂山近岸海域 5~9 月关键环境因子有所改变, 部分浮游植物因环境改变而减少或死亡, 一些适合新环境的其他浮游植物迅速生长繁殖, 从而使 5、9 月崂山近岸浮游植物群落构成相似度较低。第 2 组群中, 2016 年 5 月与 2017 年 5 月浮游植物群落组成相似度较高, 该组群的特征种为高齿状藻、虹彩圆筛藻、派洛棍形藻、棱角角藻、星脐圆筛藻等。

2.5 浮游植物群落结构与环境因子关系

崂山近岸调查环境因子的平均值见表 2。从表 2 可以看出, 温度的变化范围为 13.35℃~26.76℃, 盐度的变化范围为 31.74~32.11, DO 变化范围为 5.75~9.30 mg/L, pH 的变化范围为 7.97~8.31, COD 的变化范围为 0.36~1.27 mg/L, DIP 的变化范围为 5.75~17.53 μg/L, DIN 的变化范围为 30.28~182.44 μg/L, Chl-*a* 的变化范围为 0.40~1.58 μg/L。

将环境因子和浮游植物丰度进行回归统计学分析结果见表 3。从表 3 可以看出, 崂山近岸浮游植物

表 2 2016~2017 年崂山近岸水域环境参数

Tab.2 Environmental parameters in waters in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

日期 Date	温度 <i>T</i> (°C)	盐度 <i>S</i>	溶解氧 DO(mg/L)	pH	化学需氧量 COD(mg/L)	溶解态无机磷 DIP(μg/L)	溶解态无机氮 DIN(μg/L)	氮磷比 N:P	叶绿素 <i>a</i> Chl- <i>a</i> (μg/L)
2016-05	15.29	32.05	7.77	8.24	0.63	11.77	97.77	8.31	1.58
2016-08	26.76	31.74	6.04	8.09	0.96	5.75	84.65	14.71	1.50
2016-11	15.79	32.08	9.30	8.30	0.36	17.53	182.44	10.41	0.53
2017-05	13.35	31.94	8.15	8.00	0.65	13.06	30.28	2.32	0.40
2017-09	24.93	32.11	5.75	7.97	0.93	7.81	102.58	13.14	0.46
2017-11	18.25	32.02	7.40	8.31	1.27	12.63	76.82	6.08	0.48

表 3 2016~2017 年崂山近岸浮游植物群落与环境因子的相关关系

Tab.3 The Pearson correlation between phytoplankton community and environmental factors in offshore area of Laoshan in 2016 and 2017

因子 Factor	Spearman 相似性系数 Spearman similarity coefficient	相关性最高因子 Most relevant factor
单因子组 Single factor group	0.536	化学需氧量 COD
双因子组 Two-factor group	0.411	pH, 化学需氧量 COD
	0.400	化学需氧量 COD, 无机氮 DIN
	0.321	溶解氧 DO, 化学需氧量 COD
三因子组 Three-factor group	0.393	pH, 化学需氧量 COD, 无机氮 DIN
	0.382	溶解氧 DO, pH, 化学需氧量 COD
	0.293	pH, 化学需氧量 COD, 无机磷 DIP
	0.275	盐度 <i>S</i> , pH, 化学需氧量 COD
四因子组 Four-factor group	0.271	溶解氧 DO, pH, 化学需氧量 COD, 无机磷 DIP
	0.268	溶解氧 DO, pH, 化学需氧量 COD, 叶绿素 <i>a</i> Chl- <i>a</i>

细胞丰度的变化与 COD 的相关性最高, 相关系数为 0.536。产生主要影响的双因子组为 pH 与 COD, 相关系数为 0.411; COD 与 DIN, 相关系数为 0.400; DO 与 COD, 相关系数为 0.321。

COD 是评价水质污染常用的指标, 大致反映了水体中有机质的含量(王欣等, 2014)。调查期间, COD 呈明显的季节变化。孙伟等(2016)研究表明, 崂山近岸 COD 浓度主要受海流扩散及浮游植物消耗影响。2017 年秋季, COD 高值原因可能是该季度风力较强, 海流扩散作用高于其他季度所致。此外, 王哥庄湾、南窑河、石老人海水浴场一带由于径流入海, COD 陆源排放量较大, 藻类更适应在富含有机颗粒营养物质的水体中生长, 因此, 细胞丰度较高。

在本次调查中, 海水环境是主要测定参数之一, pH 的变化范围较大, 一年中最低值出现在夏季, 最高值出现在秋季, 而海洋环境是弱酸、弱碱及盐形成的体系, 海水中 pH 的高低很大程度上影响生物的代谢过程。近岸的营养盐主要来源于降水及生活废水排海、沉积物再悬浮释放和周边海域的补充(过锋等, 2015)。夏季风力较弱, 海底沉积物悬浮释放量相对较少, 且洋流扩散作用弱, 使外海对崂山近岸海域营养盐补给量小(孙伟等, 2016), 因此, 夏季 N、P 营养盐含量低于其他季节。浮游植物是水域中 DO 的供应者, 一般浮游植物大量繁殖时, 水中 DO 含量增高, 但同时 DO 与温度呈负相关, 水温升高使海洋动物生长繁殖加快, 消耗大量的 DO(刘长东等, 2016), 因此, 夏季虽有浮游植物补充 DO 含量, 但总体消耗量较大, 导致海水 DO 含量较低。

结合聚类分析可以看出, 环境因子的改变使浮游植物的群落结构受到扰动, 进而造成群落相似性的改变。硅藻等能适应较高 pH、COD 环境, 与 DO 表现出负相关(王华等, 2016), 如中肋骨条藻、卡氏角毛藻、薄壁几内亚藻等(朱旭宇等, 2017)。角毛藻、柔弱角毛藻、旋链角毛藻与 pH 和 DO 呈显著正相关, 与 COD 呈显著负相关(罗先香等, 2018), 由此可见, 环境因子与浮游植物群落结构关系密切, 在实际应用中可通过监控环境因子的变化预测浮游植物种群的分布情况, 为贝类资源增殖放流确定合理时间与地点。

3 结论

2016~2017 春、夏、秋 3 个季节共检出浮游植物 2 门 31 属 69 种, 硅藻门 25 属 60 种, 甲藻门 6 属 9 种。浮游植物优势种随季节变化明显, 春季的主要优势种为虹彩圆筛藻、棱角角藻、星脐圆筛藻等; 夏季

主要优势种有虹彩圆筛藻、劳氏角毛藻、柔弱伪菱形藻等; 秋季主要优势种有虹彩圆筛藻、卡氏角毛藻、星脐圆筛藻等, 3 个季节优势种交替明显。

浮游植物细胞丰度年内变化明显, 2016 年最高峰出现在秋季, 次高峰为夏季, 2017 年最高峰出现在夏季, 次高峰为秋季。在调查中, 崂山近岸海域的浮游植物多样性指数和丰富度指数均较好, 群落结构比较稳定。

浮游植物群落结构聚类分析结果显示, 相似度在 40% 水平聚类为 2 大类群, 其中, 相似度为 70% 水平的为 2016 年 5 月和 2017 年 5 月, 这可能与 2016 年 5 月和 2017 年 5 月的关键环境因子 COD 变化不大相关。

对环境因子和浮游植物丰度进行相关性分析, 结果显示, 浮游植物丰度最主要的环境影响因子为 COD, 相关系数为 0.536, 相关的双因子为 pH 与 COD 组、COD 与 DIN 组和 DO 与 COD 组。

参 考 文 献

- Chen BJ, Chen JF, Cui Y, *et al.* The ecological characteristics of phytoplankton in the Eastern marineculture area of Laizhou Bay. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(3): 64-70 [陈碧鹃, 陈聚法, 崔毅, 等. 莱州湾东部养殖区浮游植物的生态特征. *渔业科学进展*, 2001, 22(3): 64-70]
- China Gulf Records Compilation Committee. China gulf records-volume 4-southern Shandong Peninsula and gulf of Jiangsu Province. Beijing: Ocean Press, 1993 [中国海湾志编纂委员会. 中国海湾志-第四分册-山东半岛南部和江苏省海湾, 北京: 海洋出版社 1993]
- Guo F, Chen JF, Qu KM, *et al.* Analysis and evaluation on nutritional status and organic pollution condition in the southern offshore area of Huangdao District of Qingdao City. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 44-50 [过锋, 陈聚法, 张艳, 等. 黄岛区南部海域营养水平和有机污染状况分析与评价. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 44-50]
- Guo SJ, Li YQ, Zhang CX, *et al.* Phytoplankton community in the Bohai Sea and its relationship with environmental factors. *Marine Science Bulletin*, 2014, 33(1): 95-105 [郭术津, 李彦翘, 张翠霞, 等. 渤海浮游植物群落结构及与环境因子的相关性分析. *海洋通报*, 2014, 33(1): 95-105]
- Li GL, Chen BJ, Cui Y, *et al.* Ecological characteristics of phytoplankton in the Laizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 292-299 [李广楼, 陈碧鹃, 崔毅, 等. 莱州湾浮游植物的生态特征. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 292-299]
- Liu CD, Yi J, Guo XF, *et al.* Phytoplankton community structure in artificial reef are around Lidao, Rongcheng, and its relationship with environmental factors. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2016, 46(3): 50-59

- [刘长东, 易坚, 郭晓峰, 等. 荣成俚岛人工鱼礁区浮游植物群落结构及其与环境因子的关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(3): 50–59]
- Luo XX, Shan Y, Yang JQ. Distribution of phytoplankton community and its relationship with water environment in the Yellow River Estuary. *Periodical of Ocean University of China(Natural Science)*, 2018, 48(4): 16–23 [罗先香, 单宇, 杨建强. 黄河口及邻近海域浮游植物群落分布特征及与水环境的关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(4): 16–23]
- Margalef DR. *Perspectives in ecological theory*. Chicago: University of Chicago Press, 1968, 1–111
- Ning XX, Ji L, Wang G, *et al.* Phytoplankton community in the nearshore waters of Laizhou Bay in 2009. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2011(3): 97–104 [宁璇璇, 纪灵, 王刚, 等. 2009 年莱州湾近岸海域浮游植物群落的结构特征. 海洋湖沼通报, 2011(3): 97–104]
- Pielou EC. *An introduction to mathematical ecology*. New York: Wiley-Inter-Science, 1969
- Qiao R, Luan QS, Wang J, *et al.* Distribution and controlling environmental factors of phytoplankton communities in the Laoshan Bay during spring in 2013. *Marine Sciences*, 2015, 39(7): 13–21 [乔芮, 栾青杉, 王俊, 等. 2013 年春季崂山湾浮游植物群落及其环境控制. 海洋科学, 2015, 39(7): 13–21]
- Shannon PT, Stroupe E, Tory EM. Batch and continuous thickening. *Basic theory. Solids flux for rigid spheres. Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 1963, 3(2): 203–211
- Sun W, Tang XC, Xu YD, *et al.* Characteristics of nutrient sand eutrophication assessment of the Laoshan Bay, Qingdao. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(6): 47–54 [孙伟, 汤宪春, 徐艳东, 等. 青岛崂山湾营养盐分布特征及富营养化评价. 海洋湖沼通报, 2016(6): 47–54]
- Song XK, Tang XC, Cheng L, *et al.* Spatio-temporal distribution of net-collected phytoplankton and its relationship with environmental factors in Laoshan Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(6): 1205–1213 [宋秀凯, 汤宪春, 程玲, 等. 崂山湾网采浮游植物时空分布特征及其与环境因子关系. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1205–1213]
- Sun XM, Xia B, Guo F, *et al.* Structure characteristics of phytoplankton community and the relationship with environmental factors in offshore area of Laoshan, Qingdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 46–53 [孙雪梅, 夏斌, 过锋, 等. 青岛崂山近岸海域浮游植物群落结构及其与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 46–53]
- Sun XX, Sun S, Wu YY, *et al.* Long-term changes of phytoplankton community structure in the Jiaozhou Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(5): 639–646 [孙晓霞, 孙松, 吴玉霖, 等. 胶州湾网采浮游植物群落结构的长期变化. 海洋与湖沼, 2011, 42(5): 639–646]
- Wang H, Yang SP, Fang CZ, *et al.* Canonical correspondence analysis of relationship between characteristics of phytoplankton community and environmental factors in Dianchi Lake. *China Environmental Science*, 2016, 36(2): 544–552 [王华, 杨树平, 房晟忠, 等. 滇池浮游植物群落特征及与环境因子的典范对应分析. 中国环境科学, 2016, 36(2): 544–552]
- Wang WH, Wu SY, Feng AP. Discussion on healthy bay and index for bay health. *Coastal Engineering*, 2011, 30(3): 90–97 [王文海, 吴桑云, 丰爱平. 试论健康海湾与海湾健康指标. 海岸工程, 2011, 30(3): 90–97]
- Wang X, Sheng HX, Tang YL, *et al.* Relationships between the structure of phytoplankton community and environmental factors in three artificial reef areas of Laoshan Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 7–12 [王欣, 盛化香, 唐衍力, 等. 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 7–12]
- Wang Y, Zhang Y, Wang YY, *et al.* Spatial and temporal characteristics of phytoplankton and its relation with the environmental factors in Jiaozhou Bay. *Journal of Safety and Environment*, 2013, 13(1): 163–170 [王妍, 张永, 王玉珏, 等. 胶州湾浮游植物的时空变化特征及其与环境因子的关系. 安全与环境学报, 2013, 13(1): 163–170]
- Xu H, Qin BQ, Zhu GW. Nutrient limitation of cyanobacterial growth in different regions of Lake Taihu in summer. *China Environmental Science*, 2012, 32(12): 2230–2236 [许海, 秦伯强, 朱广伟. 太湖不同湖区夏季蓝藻生长的营养盐限制研究. 中国环境科学, 2012, 32(12): 2230–2236]
- Yang XG, Xue Y, Zan XX, *et al.* Community structure of phytoplankton in Haizhou Bay and adjacent waters and its relationships with environmental factors. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(7): 2123–2131 [杨晓改, 薛莹, 咎肖肖, 等. 海州湾及其邻近海域浮游植物群落结构及其与环境因子的关系. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2123–2131]
- Yu X, Li XL, Yang JL, *et al.* Study on the community changes of phytoplankton in scallop culture area of Laizhou Bay. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(18): 65–70 [于潇, 李希磊, 杨俊丽, 等. 莱州湾扇贝养殖区浮游植物的群落变化研究. 安徽农业科学, 2018, 46(18): 65–70]
- Zhou H, Zhang ZN. Rationale of the multivariate statistical software PRIMER and its application in benthic community ecology. *Journal of Ocean University of Qingdao(Natural Science)*, 2003, 33(1): 58–64 [周红, 张志南. 大型多元统计软件 PRIMER 的方法原理及其在底栖群落生态学中的应用. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2003, 33(1): 58–64]
- Zhao QB, Sun J, Li D, *et al.* Seasonal changes of the phytoplankton along hypoxia area and adjacent waters in the East China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(7): 2366–2379 [赵其彪, 孙军, 李丹, 等. 东海低氧区及邻近水域浮游植物的季节变化. 生态学报, 2015, 35(7): 2366–2379]
- Zhou R, Peng ST, Qin XB, *et al.* Phytoplankton assemblages and their relation to environmental factors by multivariate

statistic analysis in Bohai Bay. *Environmental Science*, 2013, 13(1): 864–873 [周然, 彭士涛, 覃雪波, 等. 渤海湾浮游植物与环境因子关系的多元分析. *环境科学*, 2013, 13(1): 864–873]

Zhu XY, Xu HH, Xu X, *et al.* Community composition of net-

collected phytoplankton and its relation to environmental factors near Lianyungang sea area. *Journal of Applied Oceanography*, 2017, 36(3): 387–394 [朱旭宇, 许海华, 许娴, 等. 连云港邻近海域网采浮游植物分布特征及其影响因素. *应用海洋学学报*, 2017, 36(3): 387–394]

(编辑 陈 严)

Seasonal Variations in the Phytoplankton Community Structure and Their Environmental Impact Factors in the Offshore Area of Laoshan, Qingdao

CHAI Ran^{1,2}, FENG Juan¹, CHEN Bijuan^{2,3}, XIA Bin^{2,3}, SUN Xuemei^{2,3①},
WANG Xiaoxiao⁴, CHEN Jufa², CUI Zhengguo², QU Keming²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071; 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 266071; 3. Marine Ecology and Environmental Science Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Qingdao Laoshan Marine and Fisheries Bureau, Qingdao 266106)

Abstract To explore the seasonal variations in the phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in the offshore area of Laoshan, we designed 15 monitoring stations and made six investigative voyages in the spring, summer, and autumn during 2016–2017 while monitoring other environmental factors simultaneously. We detected 69 species belonging to 31 genera and two phyla of phytoplankton, most of which belong to temperate coastal species. Diatoma was the dominant phylum comprising 25 genera and 60 species, and dinoflagellates comprised 6 genera and 9 species. The seasonal variations in the dominant species were obvious. The most dominant species were *Coscinodiscus oculus-iridis*, *Coscinodiscus asteromphalus*, and *Ceratium fusus*. The total number of phytoplankton ranged from 732.10×10^4 to 1142.19×10^4 cell/m³, with an average of 937.15×10^4 cell/m³. The number of phytoplankton cells changed significantly during the year. The highest peak in 2016 appeared in autumn and the second highest peak in summer; the highest peak in 2017 appeared in summer and the second highest peak in autumn. The spatial distribution showed a decreasing trend from north to south, and the high-value areas appeared in Wanggezhuang Bay, Nanyao River, and Shilaoren Beach. The diversity and abundance of phytoplankton in the surveyed area are at a high level, and the phytoplankton community structure in this area is relatively stable, indicated by the analysis of the phytoplankton community structure index. The result of cluster analysis showed that the interannual variations in phytoplankton cell abundance are unobvious in spring, and the similarity is approximately 70% both in 2016 and 2017. However, the interannual variations in phytoplankton cell abundance are relatively obvious in summer and autumn, and the similarity is only approximately 40%, which is mainly related to environmental factors. The correlation analysis between phytoplankton community structure and environmental factors showed that the correlation coefficient between cell abundance average and COD is the highest (0.536) and the two factors that were most related to environmental factors were pH and COD, COD and DIN, and DO and COD. Therefore, the key limiting factors for phytoplankton cell abundance in the offshore area of Laoshan are COD, pH, DIN, and DO.

Key words Phytoplankton; Offshore area of Laoshan; Community structure; Environmental factors

① Corresponding author: SUN Xuemei, E-mail: sunxm@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181015004

http://www.yykxjz.cn/

李凤雪, 蒋增杰, 高亚平, 杜美荣, 王晓芹, 李文豪, 侯兴, 董世鹏, 王军威, 张义涛. 桑沟湾浮游植物粒径结构及其与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 31–40

Li FX, Jiang ZJ, Gao YP, Du MR, Wang XQ, Li WH, Hou X, Dong SP, Wang JW, Zhang YT. Distribution of size-fractionated phytoplankton and its relationship with environmental variables in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 31–40

桑沟湾浮游植物粒径结构及其 与环境因子的关系*



李凤雪^{1,2} 蒋增杰^{2,3①} 高亚平² 杜美荣² 王晓芹²
李文豪^{1,2} 侯兴^{1,2} 董世鹏^{1,2} 王军威⁴ 张义涛⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 荣成楮岛水产有限公司 荣成 264312)

摘要 于 2017 年 4、7、11 月和 2018 年 1 月 4 个航次调查了桑沟湾浮游植物粒径结构的时空分布, 并分析了粒径结构与主要环境因子的关系。结果显示, 桑沟湾海域表、底层 Chl-*a* 浓度的年变化范围分别为 0.74~3.27 和 0.81~3.66 $\mu\text{g/L}$, 平均值分别为(1.90±1.28)和(2.01±1.29) $\mu\text{g/L}$, 存在极显著的季节差异($P<0.01$)和空间分布的不均匀性。从粒径结构来看, 小型浮游植物是春季表、底层浮游植物的主要贡献者, 贡献率分别为 54.05%和 58.08%, 夏、秋和冬季均是微型浮游植物占优势地位。冬季和春季微微型浮游植物的贡献率较小, 但夏季和秋季的贡献率显著增多, 夏季表、底层贡献率分别达 24.46%和 20.70%; 秋季表、底层贡献率分别达 35.88%和 40.77%。冗余分析(Redundancy analysis, RDA)结果表明, 温度(T)是影响浮游植物粒径结构的主要环境因子。溶解氧(DO)对微微型浮游植物占总浮游植物的比例有显著影响; 微型浮游植物所占比例受亚硝酸盐(NO_2^-)、铵盐(NH_4^+)等影响显著; 小型浮游植物对总浮游植物的贡献主要受温度影响, 呈正相关。研究结果为深入认识桑沟湾养殖生态系统浮游植物的粒径结构、准确评估滤食性贝类的养殖容量提供了基础数据。

关键词 叶绿素 *a*; 粒径结构; 冗余分析; 桑沟湾

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0031-10

浮游植物作为海洋初级生产力的主要贡献者, 是海水养殖滤食性贝类的主要食物来源(吴文广等, 2016)。养殖容量评估是保障贝类养殖可持续发展的重要举措, 目前, 针对滤食性贝类养殖容量的评估多

数基于浮游植物的现存量(张继红, 2008; 陈辰, 2012; 陈伟洲等, 2012)。但是研究表明, 并非所有的浮游植物都可以被滤食性贝类摄食, 在自然海水中, 紫贻贝(*Mytilus edulis*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)及栉孔扇

* 国家自然科学基金面上项目(41676147)和国家贝类产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (General Program) (41676147), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 李凤雪, E-mail: 825590220@qq.com

① 通讯作者: 蒋增杰, 研究员, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-10-15, 收修改稿日期: 2018-11-09

贝(*Chlamys farreri*)对粒径 $2\ \mu\text{m}$ 的颗粒的截留效率仅为 19%、17%和 8%，对 $2\ \mu\text{m}$ 以下的颗粒物截留效率更低(张继红, 2008)。据报道, 在海洋中 50%以上的初级生产力来源于粒径小于 $3\ \mu\text{m}$ 的浮游植物(Glover *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1983; Platt *et al.*, 1983), 但这部分的浮游植物并不能被滤食性贝类有效利用, 所以, 仅仅基于浮游植物总量进行养殖容量评估易造成评估结果的过高估计。

桑沟湾位于山东半岛东端, 面积约 $133.3\ \text{km}^2$ 。北、西、南三面为陆地环抱, 东面与黄海相连, 湾口宽约 $11.5\ \text{km}$, 口门北到青鱼嘴($37^\circ08'49''\text{N}$, $122^\circ34'32''\text{E}$), 南至楮岛($37^\circ02'32''\text{N}$, $122^\circ34'14''\text{E}$)。潮汐类型为不规则半日潮, 湾内最大水深为 $15\ \text{m}$, 平均水深为 $7\sim 8\ \text{m}$, 入湾的河流主要有崖头河、沽河和桑沟河等(宋云利等, 1996)。独特的地理位置和水文条件极大地推动了桑沟湾海水贝藻类养殖业的发展, 长牡蛎、栉孔扇贝等滤食性贝类是该湾主要的贝类养殖品种。经过多年的扩大与发展形成了它特有的多元养殖模式: 由湾内向湾外依次为贝类养殖区、海带(*Laminaria japonica*)与牡蛎混养区和海带养殖区, 并且海带的养殖已经扩展到了湾口外的大片海域(方建光等, 1996b; 郝林华等, 2012)。近些年来, 多位学者对该湾的贝类养殖容量进行了评估(Ge *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 1997;

方建光等, 1996a), 但涉及饵料可获得性的关键参数均是基于总叶绿素 *a* 含量, 对不同粒径浮游植物组成研究的相对较少。浮游植物粒径与其能够被贝类滤食利用有直接关系, 细化研究浮游植物的粒径结构对于准确评估贝类养殖容量、保证贝类养殖业的健康可持续发展具有重要的理论价值和指导意义。本研究于 2017~2018 年对桑沟湾海域开展了 4 次大面调查, 获取了桑沟湾海域浮游植物生物量(Chl-*a*)的时空分布、粒级结构以及它们与环境因子间的相关关系, 旨在揭示该海域不同粒级浮游植物的时空分布规律及其环境调节机制, 从而为准确评估滤食性贝类的养殖容量提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 站位设置和样品采集

本次调查共布设了 21 个采样站位, 站位分布见图 1。分别于 2017 年 4、7、11 月和 2018 年 1 月连续 4 个航次采样。站位水深小于 $10\ \text{m}$ 仅取表层水, 超过 $10\ \text{m}$ 取表、底层水, 水样 4°C 保存、备用。表、底层水温(*T*)、pH、盐度(*S*)和溶解氧(DO)等水质参数利用便携式水质分析仪(YSI 公司, Professional Plus, 美国)现场测定。透明度的测定使用透明度盘。

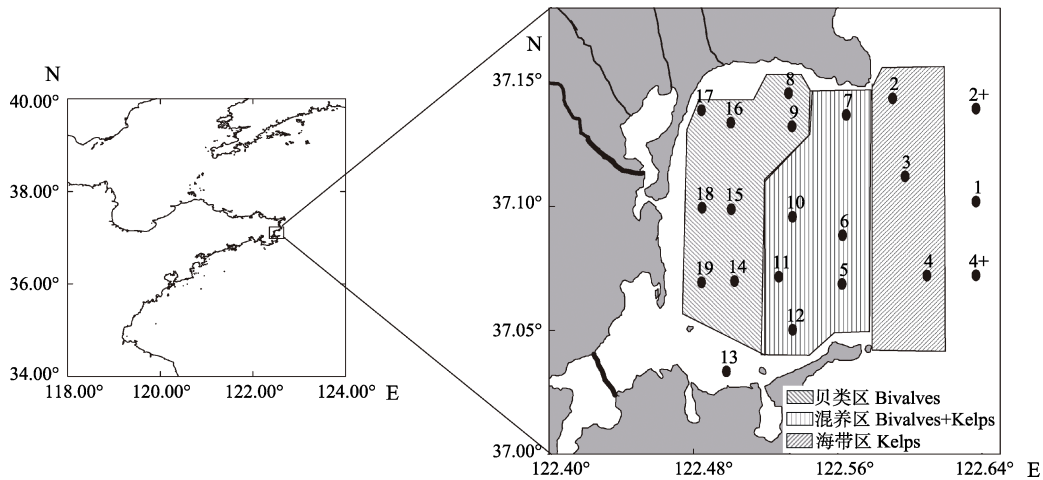


图 1 桑沟湾海域调查站位
Fig.1 Investigation stations in Sanggou Bay

1.2 样品分析方法

每个站位取 $2\ \text{L}$ 水样, 加入 $3\ \text{ml}$ 碳酸镁悬浊液, 然后, 准确量取水样 $800\ \text{ml}$ 过滤到 $0.45\ \mu\text{m}$ 的醋酸纤维素滤膜上, 用于测定各站位浮游植物 Chl-*a* 总浓度; 另取 $800\ \text{ml}$ 水样依次过滤到孔径为 $20\ \mu\text{m}$ 筛绢、 $2\ \mu\text{m}$ 及 $0.45\ \mu\text{m}$ 的醋酸纤维素膜上, 用于测定 3 个不同粒

级浮游植物的 Chl-*a* 浓度, 滤膜用锡纸包裹后冷冻保存。低温避光条件下, 用 90% 的丙酮萃取 $24\ \text{h}$, 用多波长分光光度计测定 Chl-*a* 浓度。其中, 大于 $20\ \mu\text{m}$ 为小型浮游植物, $2\sim 20\ \mu\text{m}$ 为微型浮游植物, $0.45\sim 2\ \mu\text{m}$ 为微微型浮游植物。营养盐的测定参照《海洋调查规范》(GB12763.4-2007)中的测定方法: 磷酸(PO_4^{3-})采用抗坏血酸还原磷钼蓝法、亚硝酸盐(NO_2^-)

采用重氮偶氮法、铵盐(NH₄⁺)采用次溴酸钠氧化法、硝酸盐(NO₃⁻)采用铈还原法。

1.3 数据处理与统计分析

浮游植物的平面分布图采用 Golden software Surfer 11 生成。不同季节浮游植物的差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 统计过程使用 SPSS 19.0 软件完成。粒径分级 Chl-*a* 含量与主要环境因子间的关系采用冗余分析(Redundancy analysis, RDA), 分析过程使用 Canoco for windows 4.5 按照国际通用标准完成。先对粒径结构数据进行去趋势对应

分析(Detrended correspondence analysis, DCA), 发现第一轴的大小<3, 所以, RDA 分析适合本研究。

2 结果与分析

2.1 桑沟湾养殖水域 Chl-*a* 的时空分布特征

桑沟湾海域表、底层 Chl-*a* 浓度的时空变化特征见图 2。从季节变化来看, 桑沟湾海域表、底层 Chl-*a* 浓度的年变化范围分别为 0.74~3.27 和 0.81~3.66 μg/L, 平均值分别为(1.90±1.28) μg/L 和(2.01±1.29) μg/L, 季节差异极显著($P<0.01$)。

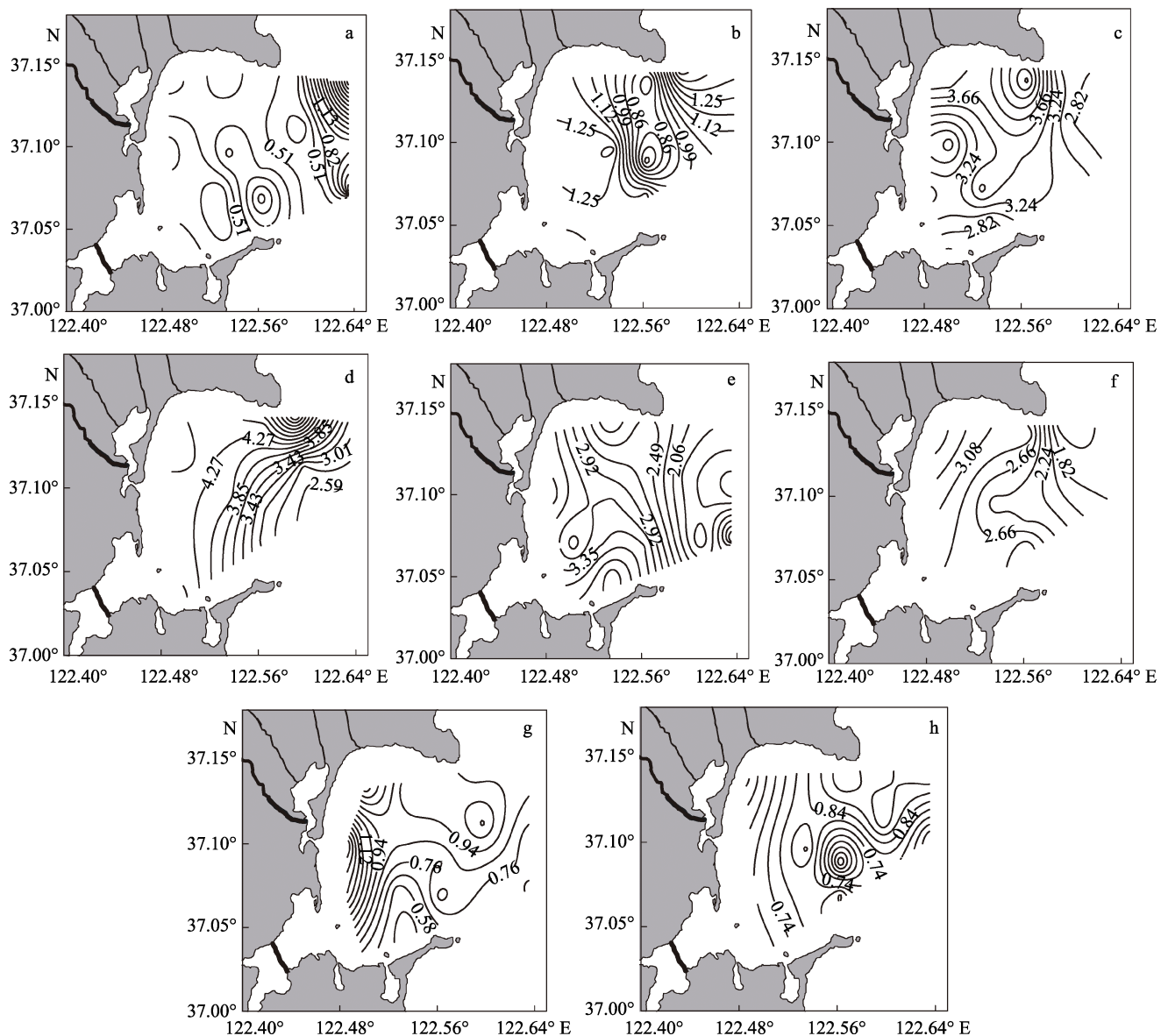


图 2 桑沟湾海域表、底层 Chl-*a* 浓度的平面分布特征

Fig.2 Spatial distribution of Chl-*a* concentration (μg/L) in the surface and bottom layers of Sanggou Bay

表层: a: 春季; c: 夏季; e: 秋季; g: 冬季; 底层: b: 春季; d: 夏季; f: 秋季; h: 冬季

Surface: a: Spring; c: Summer; e: Autumn; g: Winter; Bottom: b: Spring; d: Summer; f: Autumn; h: Winter

从平面分布来看,春季表层 Chl-*a* 浓度高值区出现在湾口的东北部和东部,形成一大一小 2 个高值区;夏季表层高值区出现在湾口北部靠近蔡家庄村附近;秋、冬季的高值区均出现在近岸海域。春季底层 Chl-*a* 主要分布于湾外北部海域;夏、秋季浮游植物主要分布于近岸海域,呈现从湾内向湾外递减的趋势;冬季底层 Chl-*a* 高值区出现在桑沟湾东部偏北海域。从垂直分布来看,春季表层 Chl-*a* 浓度低于底层,差异显著($P < 0.05$);夏季表层 Chl-*a* 浓度虽高于底层,但差异不显著($P > 0.05$);秋、冬季表、底层 Chl-*a* 浓度相近。

2.2 桑沟湾养殖水域浮游植物的粒径结构及时空变化特征

不同季节浮游植物的粒径结构分布见图 3。从不同季节浮游植物的粒径结构来看,春季,表层小型和微型浮游植物的贡献率相当,分别占 54.05%和 46.71%;底层分别为 58.08%和 41.50%;微微型浮游植物表、底层贡献率均极低,分别为 0.72%和 0.42%。夏季,表、底层均以微型浮游植物为主,贡献率分别为 50.04%和 54.69%;小型和微微型浮游植物的贡献率相当。秋季,表层主要以微型浮游植物为主,贡献率为 56.77%;微微型浮游植物次之,贡献率为 35.88%;小型浮游植物仅占 7.35%,底层浮游植物粒径结构组成与表层相似。冬季仍是微型浮游植物占优势地位,表、底层贡献率分别为 53.46%和 61.67%;小型浮游植物贡献率居于第二,表、底层分别为 37.83%和 36.47%;微微型浮游植物表、底层贡献率分别为 8.71%和 1.85%。

桑沟湾海域表层春、夏、秋、冬季不同粒径浮游

植物 Chl-*a* 的时空变化特征见图 4。从图 4 可以看出,春季,小型浮游植物 Chl-*a* 含量的变化范围为 0.02~2.43 $\mu\text{g/L}$,在湾口的东部偏北和正东部形成一大一小 2 个高值区;微型浮游植物 Chl-*a* 含量的变化范围为 0.16~0.62 $\mu\text{g/L}$,主要分布于湾西北、南部、东南和东部外海区域;微微型浮游植物 Chl-*a* 含量的变化范围是 0~0.06 $\mu\text{g/L}$,分布呈现四周高、中间低的趋势。夏季,小型浮游植物的变化范围为 0.41~1.99 $\mu\text{g/L}$,总体呈现从北向南依次递减的趋势;微型浮游植物 Chl-*a* 含量的变化范围为 1.17~2.04 $\mu\text{g/L}$,主要分布于湾中部偏南,其次是北部沿岸,湾正西部和湾口东部浓度较低,呈“漏斗状”分布;微微型浮游植物 Chl-*a* 含量的变化范围为 0.61~1.16 $\mu\text{g/L}$,高值区出现在湾中部偏南海域,浓度达到了 1.16 $\mu\text{g/L}$,以 11 站位为中心形成 1 个三角区域。秋季,小型浮游植物的变化范围为 0.10~0.46 $\mu\text{g/L}$,主要分布于西部沿岸海域;微浮游植物的变化范围为 0.66~2.94 $\mu\text{g/L}$,高值区出现在海湾南部近岸处,湾口处浓度较低;微微型浮游植物的变化范围为 0.19~2.18 $\mu\text{g/L}$,微微型浮游植物主要分布于桑沟湾东南部海域,以 5 号站位为中心呈“漩涡状”分布。冬季,小型浮游植物的变化范围为 0.10~0.78 $\mu\text{g/L}$,在湾西部偏南海域的 19 号站位和北部海域的 9 号站位形成 2 个高值区;微型浮游植物的变化范围为 0.22~1.19 $\mu\text{g/L}$,主要分布于西部近岸,其次是湾外,核心区域 Chl-*a* 含量较低,浓度仅为 0.23 $\mu\text{g/L}$;微微型浮游植物的变化范围为 0~0.22 $\mu\text{g/L}$,呈现四周高、中部低的趋势。

2.3 桑沟湾浮游植物的粒径结构与环境因子的关系

从表 1 可以看出,RDA 前 2 轴对物种-环境关系

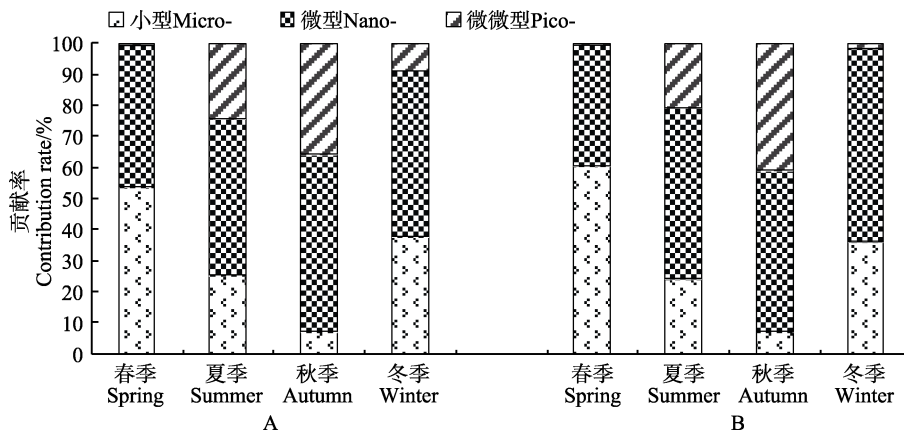


图 3 桑沟湾海域表、底层不同粒径浮游植物 Chl-*a* 占总 Chl-*a* 的比例

Fig.3 Size-fraction of phytoplankton in the surface and bottom layers of Sanggou Bay

A: 表层; B: 底层

A: Surface; B: Bottom

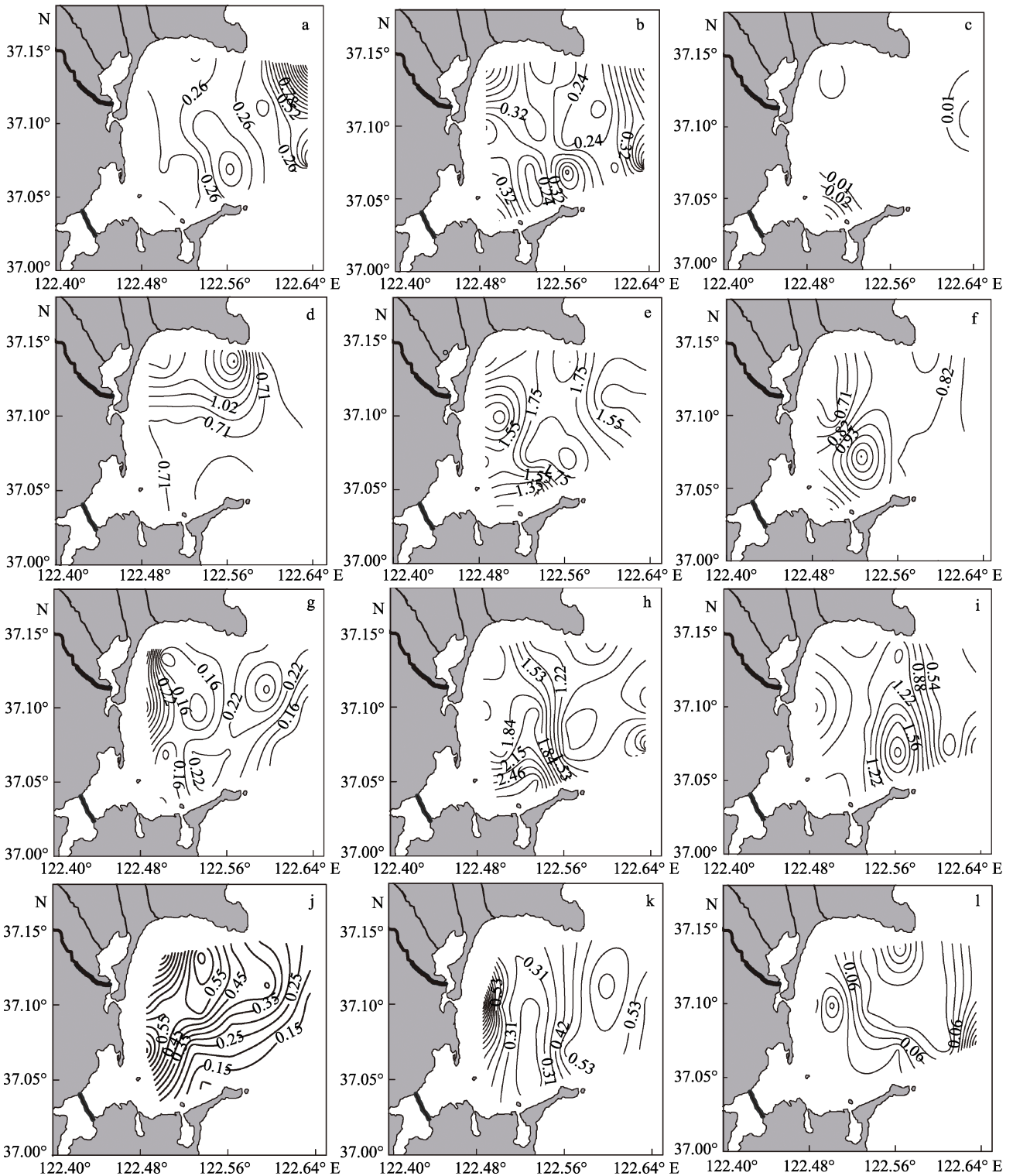


图 4 桑沟湾海域表层不同粒径的浮游植物 Chl-a 的时空变化特征

Fig.4 Seasonal and spatial variations of different size-fractionated phytoplankton in the surface layer of Sanggou Bay

春季: a: 小型; b: 微型; c: 微微型; 夏季: d: 小型; e: 微型; f: 微微型; 秋季: g: 小型; h: 微型; i: 微微型; 冬季: j: 小型; k: 微型; l: 微微型
Spring: a: Micro-; b: Nano-; c: Pico-; Summer: d: Micro-; e: Nano-; f: Pico-; Autumn: g: Micro-; h: Nano-; i: Pico-; Winter: j: Micro-; k: Nano-; l: Pico-

的解释比率达 100%,轴 1 的特征值大于轴 2 的特征值,但是物种与环境间关系累计百分比中轴 1 小于轴 2。另外,轴 1 中浮游植物与环境因子的相关性为 0.493,

轴 2 为 0.416。蒙特卡洛检验表明,所有典范轴均极显著($P<0.01$),说明 RDA 排序结果可信,可以较好地解释粒径结构与环境因子间的关系。从浮游植物的

粒径结构在双轴空间上的分布来看(图 5),第一轴主要反映了温度和溶解氧的变化,第二轴主要反映了盐度和 N、P 等营养盐的变化。小型浮游植物占总浮游植物的比例受温度和盐度影响显著,呈正相关,与 N、P 等营养盐呈负相关。微型浮游植物所占比例与温度和营养盐具有正相关关系,其中,亚硝酸盐(NO₂⁻)、铵盐(NH₄⁺)对其影响巨大。微微型浮游植物所占比例受溶解氧和温度的影响较大,与溶解氧呈正相关,温度呈负相关。从总体来看,温度是影响浮游植物粒径结构的主要环境因子。各个环境因子之间也存在相关性,温度与 N、P 等营养盐呈正相关,与溶解氧、盐度之间呈负相关。

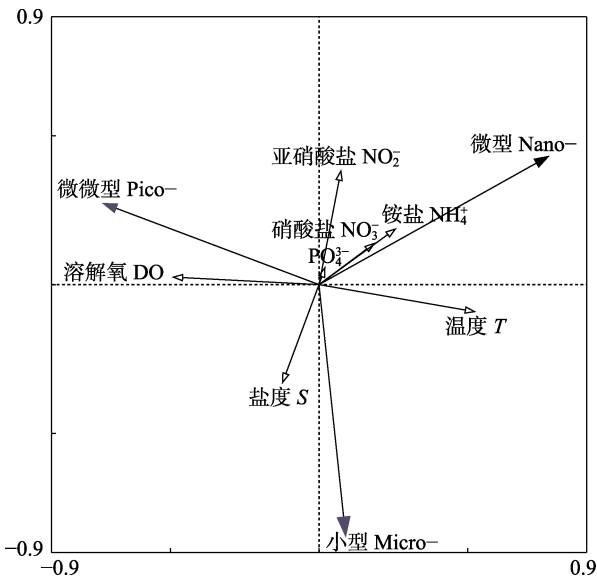


图 5 桑沟湾海域表层浮游植物粒径与主要环境因子的冗余分析(RDA)

Fig.5 RDA analysis of size-fractionated Chl-a and main environmental factors in the surface water of Sanggou Bay

实心箭头: 粒径结构; 空心箭头: 环境因子
Solid arrow: Size-fractionated phytoplankton;
Hollow arrow: Environmental variables

表 1 桑沟湾冗余分析(RDA)前两轴的统计特征

Tab.1 Statistical characteristics of the first two axes of the RDA analysis from Sanggou Bay

轴 Axes	轴 1	轴 2
特征值 Eigenvalues	0.154	0.063
种类与环境因子的相关性 Species-environment correlations	0.493	0.416
物种累计百分比 Cumulative percentage variance of species data	15.400	21.700
物种与环境间关系累计百分比 Cumulative percentage variance of species-environment relation	70.800	100.000
F		0.002

3 讨论

从季节变化来说,桑沟湾海域不同养殖区浮游植物呈现相似的变化规律(史洁等, 2010a)。高峰出现在夏季(2017年7月),这与郝林华等(2012)的研究结果相一致,低谷出现在春季(2017年4月)。春季,水温开始回升,光照增强,浮游植物进入快速生长期,但4月同样是海带的快速生长期,一方面,海带的快速生长消耗大量营养盐,与浮游植物形成营养盐竞争;另一方面,海带养殖影响海水的透光率,因此,春季浮游植物生长易受海带养殖影响(李超伦等, 2010),导致 Chl-a 的浓度偏低。夏季,温度升高,光照、营养盐充足,浮游植物迅速增殖;此外,夏季又是海带收获的季节,海带的大量减少使其对营养盐的竞争变小,从另一方面使浮游植物生物量显著增加;夏季降雨量大,地表径流带来大量营养盐,可直接刺激浮游植物生长繁殖,使种群数量增加。所以,一年之中 Chl-a 质量浓度的最高值出现在夏季。秋季,海带全部收获,湾内与外海水交换情况好转,使湾内的营养盐得到补充。但是,秋季水温开始降低,再加之10月是贝类的快速生长期,贝类摄食压力抑制了秋季浮游植物高峰的形成(方建光等, 1996a),所以,此季节虽然湾内的营养盐的水平不低于夏季,但浮游植物开始逐渐减少,导致 Chl-a 质量浓度比夏季的低。冬季,温度、光照都处于一年中的最低水平,营养盐的含量也较低,所以浮游植物的生长较为缓慢。相关分析表明,底层浮游植物 Chl-a 含量与表层没有显著性差异,季节变化也与表层相同,表现为夏季>秋季>冬季>春季。

桑沟湾独特的养殖模式对浮游植物的平面分布也产生了巨大的影响。春季, Chl-a 的高值区出现在湾口外的大片海域,营养盐的分布也出现此现象,这与吴文广等(2015)和郝林华等(2012)的研究结果相反。原因可能是湾内三面环陆海流较小,加之牡蛎和海带的养殖明显降低了海水的流速影响海水交换(Jackson *et al*, 1983; Boyd *et al*, 1998; 曾静, 2013),营养盐得不到补充,最终使得湾外浮游植物的浓度大于湾内。夏季, Chl-a 的高值区出现在海带和牡蛎混养区,尤其是湾东北部近岸浓度最高,造成此现象的原因主要是7月(采样时期)海带大量收获,光照、营养盐有所改善,叶绿素浓度也逐渐上升,并且混养区除了海水本身的营养盐外,牡蛎的代谢也会为其提供一部分营养盐(王俊等, 2001)。大量的研究表明,贝床沉积物释放氨、Si 及 P 等营养盐(Dame *et al*, 1989)。虽然,牡蛎会对浮游植物进行摄食,但7月不是牡蛎

的快速生长期,其对浮游植物的下行控制有限。Smaal 等(1986)和 Prins 等(1995)研究表明,滤食性贝类的滤食不仅给浮游植物造成摄食压力,也刺激了初级生产,加快浮游植物的生长速度。近岸海域,水深较浅,温度较高,营养盐充足时,温度越高浮游植物浓度越大(廖一波等, 2008),这也是近岸叶绿素浓度高的原因之一。秋季,浮游植物主要分布于湾内近岸海域,越靠近外海浓度越低,主要是秋季海带等藻类已全部收获,湾内水交换状况好转(史洁等, 2010b),且黄河沿岸流对湾内的影响开始加强(曾静, 2013),沿岸河流丰水期径流水携带大量的含 N 化合物进入湾内(郝林华等, 2012),使湾内营养盐得到大量补充,致使沿岸叶绿素浓度较高。冬季,从总体来看,湾西部近岸牡蛎养殖区浮游植物浓度较高,中部的混养区和湾口处的海带区浮游植物浓度较低,主要是因为此季节海带开始生长,海带对营养盐的竞争使湾中部的混养区和湾口处的海带区营养盐含量降低,致使 Chl-*a* 的质量浓度降低。滤食性贝类对食物具有选择性,贝类不能全部利用其滤食的食物,其中,大部分以粪和假粪的形式形成生物沉积(秦培兵等, 2001)。大量的沉积物构成了丰富的营养库,经矿化作用和重悬浮后又可重新进入水体营养盐循环(Peterson *et al*, 1999),这也是夏、秋、冬季贝类养殖区浮游植物浓度高于其他海区的重要原因。因此,桑沟湾海域浮游植物 Chl-*a* 的时空分布不仅受复杂多变的海洋环境如温度、光照和海流等因素影响,还与养殖环境状况有关。

除浮游植物的平面分布随着养殖活动呈现一定的规律外,其群落结构也受到一定的影响。有研究表明,浮游植物的群落结构受营养盐等因素的上行控制和滤食性贝类摄食的下行控制的影响(Prins *et al*, 1995; 董双林等, 1999; Souchu *et al*, 2001)。光照、营养盐等充足条件下,粒径较大的浮游植物在群落中具有竞争优势(Cermeño *et al*, 2005),光照、营养盐等匮乏条件下,粒径较小的浮游植物由于具有较大的比表面积,在寡营养海域表现出竞争优势(Chen, 2000; 黄邦钦等, 2006)。桑沟湾海域属于贫营养型(孙丕喜等, 2007; 徐东会等, 2017),从浮游植物的粒径结构特点来看,除春季小型和微型浮游植物的贡献相当外,夏、秋、冬季均是微型浮游植物为主要贡献者,这符合学者们普遍认为的浮游植物粒径结构特征。张继红(2008)研究表明,长牡蛎对于 2 μm 的颗粒物截留效率为 19%,在一定范围内,颗粒物越大,截留效率越高,而对于 2 μm 以下的颗粒物截留效率极低。由于牡蛎的摄食机制,长期养殖牡蛎的海域容易出现浮游

植物小型化的趋势,个体较大的优势种类逐渐被个体较小的种类代替(Frau *et al*, 2016; Nakamura *et al*, 2000)。张玲等(2015a、b)对大鹏澳牡蛎养殖区和郝彦菊等(2010)、丘耀文等(2005)对大亚湾海域的研究也验证了这点。在调查期间发现,桑沟湾牡蛎养殖区和混养区也出现了此现象。从同一季节不同养殖区域各粒径浮游植物的占比来看,春、秋和冬季微微型浮游植物占总浮游植物的比例,牡蛎区和贝藻混养区高于海带区,牡蛎养殖区和混养区出现了小型化的趋势。这与徐文琦等(2016)对桑沟湾的研究结果一致。夏季整个海区各粒径浮游植物的占比基本相同,这可能是因为夏季海带已全部收获,湾内水交换状况良好,良好的水交换使整个海湾温度、盐度和营养盐等基本一致,这些理化因子对浮游植物的上行控制大于牡蛎摄食对其的下行控制,从而导致夏季 3 个养殖区浮游植物的粒径结构一致。此研究仅从粒径结构方面分析了滤食性贝类(牡蛎)对浮游植物的影响,具体对浮游植物种群结构的影响有待进一步研究。

滤食性贝类通常被认为是植食性的,硅藻(Diatom)是其主要的食物来源(陆家昌, 2017)。但在桑沟湾这样一个贫营养型的海区,浮游植物的丰度和产量经常不足以满足贝类的能量需求,并且滤食性贝类对食物颗粒的大小具有选择性,大部分贝类需要借助鳃丝表面的前纤毛、前侧纤毛和侧纤毛来完成摄食(鄢灵兰, 2009)。诸多的研究表明,滤食性贝类不能有效截留微微型浮游生物(Kreeger *et al*, 1996; Riisgård *et al*, 1988; Yukihira *et al*, 1999),但是,较之小型和微型浮游植物、微微型浮游植物有着更高的生产力(Glover *et al*, 1986; Li *et al*, 1983; Platt *et al*, 1983)。从粒径结构来看,纤毛虫(Ciliate)可以被牡蛎截留,并且在牡蛎的假粪中没有发现纤毛虫的壳,这说明纤毛虫的壳和柔软部分都能被贝类利用(陆家昌, 2017)。N¹⁵ 标记的结果也表明,牡蛎不仅可以截留,还可以消化、吸收和利用纤毛虫(Gall *et al*, 1997)。这就说明滤食性贝类的食物来源不仅是浮游植物,其还能利用鞭毛虫(Flagellate)、纤毛虫等原生动物来补充当地浮游植物的不足。桑沟湾夏、秋 2 季微微型浮游植物的含量很多,秋季对总浮游植物的贡献率达到了 35.88%。这部分的浮游植物虽然不能被滤食性贝类直接摄食,但可以通过鞭毛虫、纤毛虫等原生动物实现对其的间接利用,微微型浮游植物通过这种“打包”作用进入经典食物链(黄邦钦等, 2003),在这个过程中,鞭毛虫或者纤毛虫起到一个重要的营养连接的作用(Gall *et al*, 1997)。以微微型浮游植物为起点的微型生物食物网在浅海贝类养殖生态系统中占有十分重要的地位。

参 考 文 献

- Boyd AJ, Heasman KG. Shellfish mariculture in the Benguela system: Water flow patterns within a mussel farm in Saldanha Bay, South Africa. *Journal of Shellfish Research*, 1998, 17(1): 25–32
- Peterson BJ, Heck KL. The potential for suspension feeding bivalves to increase seagrass productivity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 240(1): 37–52
- Cermeño P, Marañón E, Rodríguez J, *et al.* Large-sized phytoplankton sustain higher carbon-specific photosynthesis than smaller cells in a coastal eutrophic ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 297(297): 51
- Chen C. Studies on environmental conditions and carrying capacity of Pacific oyster farming sites in Rushan. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [陈辰. 乳山海域长牡蛎养殖环境与养殖容量研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Chen WZ, Cao HB, Du H, *et al.* Research on carrying capacity of *Crassostrea gigas* in the Shen'ao Bay. *Ecological Science*, 2012, 31(5): 558–562 [陈伟洲, 曹会彬, 杜虹, 等. 深澳湾太平洋牡蛎养殖容量研究. 生态科学, 2012, 31(5): 558–562]
- Chen YLL. Comparisons of primary productivity and phytoplankton size structure in the marginal regions of southern East China Sea. *Continental Shelf Research*, 2000, 20(4): 437–458
- Dame RF, Spurrier JD, Wolaver TG. Carbon, nitrogen and phosphorus processing by an oyster reef. *Marine Ecology Progress Series*, 1989, 54(3): 249–256
- Dong SL, Wang F, Wang J, *et al.* Effects of bay scallop on plankton and water quality of mariculture pond. *Acta Oceanologica Sinica*, 1999, 21(6): 138–144 [董双林, 王芳, 王俊, 等. 海湾扇贝对海水池塘浮游生物和水质的影响. 海洋学报, 1999, 21(6): 138–144]
- Fang JG, Kuang SH, Sun HL, *et al.* Study on the carrying capacity of Sanggou Bay for the culture of scallop *Chlamy farreri*. *Marine Fisheries Research*, 1996a, 17(2): 18–31 [方建光, 匡世焕, 孙慧玲, 等. 桑沟湾栉孔扇贝养殖容量的研究. 海洋水产研究, 1996a, 17(2): 18–31]
- Fang JG, Sun HL, Kuang SH, *et al.* Assessing the carrying capacity of Sanggou Bay for culture of kelp *Laminaria japonica*. *Marine Fisheries Research*, 1996b, 17(2): 7–17 [方建光, 孙慧玲, 匡世焕, 等. 桑沟湾海带养殖容量的研究. 海洋水产研究, 1996b, 17(2): 18–31]
- Ferreira JG, Duarte P, Ball B. Trophic capacity of Carlingford Lough for oyster culture – Analysis by ecological modelling. *Aquatic Ecology*, 1997, 31(4): 361–378
- Frau D, Molina FR, Mayora G. Feeding selectivity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on a natural phytoplankton assemblage: What really matters? *Limnology*, 2016, 17(1): 47–57
- Gall SL, Hassen MB, Gall PL. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: Protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 152(1–3): 301–306
- Ge CZ, Fang JG, Song XF, *et al.* Response of phytoplankton to multispecies mariculture: A case study on the carrying capacity of shellfish in the Sanggou Bay in China. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 27(1): 102–112
- Glover HE, Campbell L, Prézélin BB. Contribution of *Synechococcus* spp. to size-fractionated primary productivity in three water masses in the northwest Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 1986, 91(2): 193–203
- Hao LH, Sun PX, Hao JM, *et al.* The spatial and temporal distribution of chlorophyll-*a* and its influencing factors in Sanggou Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(2): 338–345 [郝林华, 孙丕喜, 郝建民, 等. 桑沟湾海域叶绿素 *a* 的时空分布特征及其影响因素研究. 生态环境学报, 2012, 21(2): 338–345]
- Hao YJ, Tang DL. Changes in phytoplankton community structure in response to water temperature increases in Daya Bay, China. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(8): 1794–1800 [郝彦菊, 唐丹玲. 大亚湾浮游植物群落结构变化及其对水温上升的响应. 生态环境学报, 2010, 19(8): 1794–1800]
- Huang BQ, Hong HS, Lin XJ, *et al.* Ecological study on picophytoplankton in the Taiwan Strait—I. Spatial and temporal distribution and its controlling mechanism. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(4): 72–82 [黄邦钦, 洪华生, 林学举, 等. 台湾海峡微小型浮游植物的生态研究—I. 时空分布及其调控机制. 海洋学报, 2003, 25(4): 72–82]
- Huang BQ, Liu Y, Chen JX, *et al.* Temporal and spatial distribution of size fractionized phytoplankton biomass in East China Sea and Huanghai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28(2): 156–164 [黄邦钦, 刘媛, 陈纪新, 等. 东海、黄海浮游植物生物量的粒级结构及时空分布. 海洋学报, 2006, 28(2): 156–164]
- Jackson GA, Winant CD. Effect of a kelp forest on coastal currents. *Continental Shelf Research*, 1983, 2(1): 75–80
- Kreeger DA, Rie N. Ingestion and assimilation of carbon from cellulolytic bacteria and heterotrophic flagellates by the mussels *Geukensia demissa* and *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *Aquatic Microbial Ecology*, 1996, 11(3): 205–214
- Liao YB, Chen QZ, Zeng JN, *et al.* Thermal effect on the marine phytoplankton in Xiangshan Bay, China. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 28(9): 4203–4212 [廖一波, 陈全震, 曾江宁, 等. 海洋浮游植物的热效应. 生态学报, 2008, 28(9): 4203–4212]
- Li CL, Zhang YS, Sun S, *et al.* Species composition, density and seasonal variation of phytoplankton in Sanggou Bay, China. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 1–8 [李超伦, 张永山, 孙松, 等. 桑沟湾浮游植物种类组成、数量分布

- 及其季节变化. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 1–8]
- Li KW, Rao DVS, Harrison WG, *et al.* Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science*, 1983, 219(4582): 292–295
- Lu JC. Ecological studies on the nanoflagellates in Sanggou Bay. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2017 [陆家昌. 桑沟湾微型鞭毛虫的生态学研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2017]
- Nakamura Y, Kerciku F. Effects of filter-feeding bivalves on the distribution of water quality and nutrient cycling in a eutrophic coastal lagoon. *Journal of Marine Systems*, 2000, 26(2): 209–221
- Platt T, Rao DVS, Irwin B. Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature*, 1983, 301(5902): 702–704
- Prins TC, Escaravage V, Smaal AC, *et al.* Nutrient cycling and phytoplankton dynamics in relation to mussel grazing in a mesocosm experiment. *Ophelia*, 1995, 41(1): 289–315
- Qin PB, Lu JW. Effect of filter-feeding bivalves on nutrient cycle of mariculture system: A view. *Marine Sciences*, 2001, 25(5): 27–29 [秦培兵, 卢继武. 滤食性贝类对浅海养殖系统中营养盐循环的影响. 海洋科学, 2001, 25(5): 27–29]
- Qiu YW, Wang ZD, Zhu LS. Variation trend of nutrient and chlorophyll contents and their effects on ecological environment in Daya Bay. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2005, 24(2): 131–139 [丘耀文, 王肇鼎, 朱良生. 大亚湾海域营养盐与叶绿素含量的变化趋势及其对生态环境的影响. 台湾海峡, 2005, 24(2): 131–139]
- Riisgård HU. Efficiency of particle retention and filtration-rate in 6 species of Northeast American bivalves. *Marine Ecology Progress*, 1988, 45(3): 217–223
- Shi J, Wei H, Zhao L, *et al.* Study on ecosystem model of multi-species culture in Sanggou Bay: II Simulation of ecosystem and the circulation of nutrients. *Progress in Fishery Sciences*, 2010a, 31(4): 36–42 [史洁, 魏皓, 赵亮, 等. 桑沟湾多元养殖生态模型研究: II 生态环境模拟与生源要素循环. 渔业科学进展, 2010a, 31(4): 36–42]
- Shi J, Wei H, Zhao L, *et al.* Study on ecosystem model of multi-species culture in Sanggou Bay: III Numerical study on the kelp culture carrying capacity. *Progress in Fishery Sciences*, 2010b, 31(4): 43–52 [史洁, 魏皓, 赵亮, 等. 桑沟湾多元养殖生态模型研究: III 海带养殖容量的数值研究. 渔业科学进展, 2010b, 31(4): 43–52]
- Smaal AC, Verbagen JHG, Coosen J, *et al.* Interaction between seston quantity and quality and benthic suspension feeders in the Oosterschelde, the Netherlands. *Ophelia*, 1986, 26(1): 385–399
- Song YL, Cui Y, Sun Y, *et al.* Study on nutrient state and influencing factors in Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 41–51 [宋云利, 崔毅, 孙耀, 等. 桑沟湾养殖海域营养状况及其影响因素分析. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 41–51]
- Souchu P, Vaquer A, Collos Y, *et al.* Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 218(1): 141–152
- Sun PX, Zhang ZH, Hao LH, *et al.* Analysis of nutrient distributions and potential eutrophication in seawater of the Sanggou Bay. *Advances in Marine Science*, 2007, 25(4): 436–445 [孙丕喜, 张朝晖, 郝林华, 等. 桑沟湾海水中营养盐分布及潜在性富营养化分析. 海洋科学进展, 2007, 25(4): 436–445]
- Wang J, Jang ZH, Dong SL. Role of filter-feeding bivalves in proliferation of phytoplankton community. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(5): 765–768 [王俊, 姜祖辉, 董双林. 滤食性贝类对浮游植物群落增殖作用的研究. 应用生态学报, 2001, 12(5): 765–768]
- Wu WG, Zhang JH, Wang W, *et al.* Distribution of chlorophyll-*a* concentration and its control factors in spring in Sanggou Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(15): 4855–4863 [吴文广, 张继红, 王巍, 等. 桑沟湾春季叶绿素 *a* 浓度分布及其影响因素. 生态学报, 2016, 36(15): 4855–4863]
- Wu WG, Zhang JH, Wang W, *et al.* Variation of Chl-*a* concentration and its control factors pre-and-post-the-harvest of kelp in Sanggou Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(8): 1178–1186 [吴文广, 张继红, 王巍, 等. 桑沟湾水域叶绿素 *a* 在海带收获前后的变化及其影响因素. 水产学报, 2015, 39(8): 1178–1186]
- Xu DH, Chen BJ, Jiang T, *et al.* Temporal and spatial variation characteristics of water nutrients and eutrophication evaluation in aquaculture water areas of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 1–11 [徐东会, 陈碧鹃, 江涛, 等. 桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征及富营养化评价. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 1–11]
- Xu WQ, Liu SM. Phytoplankton responses to phosphorus in Sanggou Bay in spring and autumn. *Advances in Marine Sciences*, 2016(2): 26–37 [徐文琦, 刘素美. 春季和秋季桑沟湾浮游植物对磷的响应. 海洋科学前沿, 2016(2): 26–37]
- Yan LL. Ecological study on optimization of freshwater pearl mussel (*Hvriopsis cumingii*) culture. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2009 [鄢灵兰. 三角帆蚌优化养殖的生态学研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Yukihira H, Klumpp DW, Lucas JS. Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. *Marine Ecology Progress*, 1999, 182(3): 161–173
- Zeng J. The study on the hydrodynamic environment in Sanggou Bay—The method combining support vector machine with hydrodynamic model. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [曾静. 桑沟湾水动力环境变化研究—支持向量机与水动力模式相结合方法探讨. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Zhang JH. Effect of filter feeding shellfish mariculture on the

ecosystem and the evaluation of ecology carrying capacity. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008 [张继红. 滤食性贝类养殖活动对海域生态系统的影响及生态容量评估. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2008]

Zhang L, Li ZJ, Chen FY, *et al.* Impact of oyster aquaculture on phytoplankton population structure in Dapengao Cove. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015a, 46(3): 549–555

[张玲, 李政菊, 陈飞羽, 等. 大鹏澳牡蛎养殖对浮游植物种群结构的影响研究. *海洋与湖沼*, 2015a, 46(3): 549–555]

Zhang L. Study on the temporal and spatial dynamics of phytoplankton in oyster farm areas and adjacent waters of Dapengao Cove. Master's Thesis of Jinan University, 2015b [张玲. 大鹏澳牡蛎养殖区及邻近海域浮游植物时空动态研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2015b]

(编辑 陈辉)

Distribution of Size-Fractionated Phytoplankton and Its Relationship with Environmental Variables in Sanggou Bay

LI Fengxue^{1,2}, JIANG Zengjie^{2,3①}, GAO Yaping², DU Meirong², WANG Xiaoqin²,
LI Wenhao^{1,2}, HOU Xing^{1,2}, DONG Shipeng^{1,2}, WANG Junwei⁴, ZHANG Yitao⁴

(1. College of Fishers and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 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 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Rongcheng Chudao Aquaculture Corporation, Rongcheng 264312)

Abstract Surveys have been conducted to investigate the spatial and temporal distribution of size-fractionated phytoplankton and other environmental variables in Sanggou Bay in four seasons for the period covering April 2017 until January 2018. Results showed that chlorophyll *a* concentration in the surface and bottom layers ranged from 0.74 to 3.27 $\mu\text{g/L}$ and from 0.81 to 3.66 $\mu\text{g/L}$, respectively, with average values of (1.90 ± 1.28) and (2.01 ± 1.29) $\mu\text{g/L}$, respectively. There were significant differences in chlorophyll *a* concentration ($P < 0.01$) and spatial distribution between seasons. In spring, microphytoplankton was the most abundant, accounting for 54.05% and 58.08% of the total phytoplankton in the surface and bottom layers, respectively. In summer, picophytoplankton was the most abundant, accounting for 24.46% and 20.70% of total chlorophyll *a* in the surface and bottom layers, respectively. In autumn, picophytoplankton accounted for 35.88% and 40.77% of total chlorophyll *a* in the surface and bottom layers, respectively. The contribution of picophytoplankton was low in winter and spring but increased significantly in summer and autumn. Redundancy analysis (RDA) results show that temperature is the main environmental factor affecting the size structure of phytoplankton. Dissolved oxygen had a significant effect on the percentage of picophytoplankton to total phytoplankton. The percentage of nanophytoplankton correlated with NO_2^- and NH_4^+ . There was a significant positive correlation between temperature and the percentage of microphytoplankton. This study provides basic knowledge for understanding the size structure of phytoplankton and estimating the carrying capacity of filter-feeding shellfish in the aquaculture ecosystem in Sanggou Bay.

Key words Chlorophyll-*a*; Size fraction; Redundancy analysis; Sanggou Bay

① Corresponding author: JIANG Zengjie, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181024001

http://www.yykxjz.cn/

孙倩雯, 刘慧, 尚伟涛, 于良巨, 姜晓鹏, 蔡碧莹, 常丽荣, 肖露阳. 基于 GIS 的桑沟湾及周围海域海带养殖适宜性评价. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 41-50

Sun QW, Liu H, Shang WT, Yu LJ, Jiang XP, Cai BY, Chang LR, Xiao LY. GIS-Based assessment for culture suitability of kelp (*Saccharina japonica*) in Sanggou Bay and the surrounding waters. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 41-50

基于 GIS 的桑沟湾及周围海域 海带养殖适宜性评价*



孙倩雯^{1,2} 刘 慧^{2①} 尚伟涛^{3,4} 于良巨⁴
姜晓鹏^{3,4} 蔡碧莹^{1,2} 常丽荣⁵ 肖露阳⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室
中国科学院烟台海岸带研究所 烟台 264003; 5. 威海长青海洋科技股份有限公司 荣成 264316)

摘要 目前水产养殖面临用海冲突、单位面积和人均生产率偏低、养殖业的生态和经济成本较高等问题。为充分利用海区的自然生产力,提高养殖效率和效益,需要对海区进行适宜性评价,选择最适宜的水域进行养殖。以桑沟湾及周围海域主要的养殖品种海带(*Saccharina japonica*)作为评价对象,选取光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度作为适宜性评价指标,利用遥感技术确定海区养殖布局,通过野外调查和数据模拟获取养殖海区环境参数数据,根据动态能量学(Dynamic energy budget, DEB)模型——STELLA 模型敏感性分析结果,并结合层次分析法计算评价指标权重,海带生长相关环境因子的强制函数拟合得到单因子评分曲线进行评分。最后,采用线性加权叠加分析方法得到海带养殖适宜性评价结果。适宜性评价过程以地理信息系统(Geographical information systems, GIS)作为技术支持,利用 GIS 空间插值功能生成光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度专题图层,采用栅格计算功能对各专题图层进行叠加,得到综合多因素的海带养殖适宜性评分和适宜性等级。评价结果显示,在不考虑用海冲突的情况下,桑沟湾及周围海域海带养殖适宜性分数分布在 0~6.7 范围内,分值主要集中在 4~6 分,属于中等适宜,占研究区总面积的 67%,最适宜和不适宜分别占研究区总面积的 23%和 10%,无一般适宜区。评分较高的区域主要分布在北部爱莲湾和楮岛东部海域周围,适宜性评分较低的区域主要位于近岸水深较浅的海域。根据适宜性评价结果可进行水域空间规划和安排养殖生产计划,为管理部门开展养殖分区和海洋功能区划提供参考。

关键词 水产养殖; 适宜性评价; 养殖区选址; GIS

中图分类号 S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0041-10

养殖容量的基础是水域承载力的计算,传统的养殖容量评估一般是基于营养盐的供应或初级生产力

* 科技部国际合作专项“基于生态系统的水产养殖空间规划研究”(2016YFE0112600)和欧盟地平线 2020 项目(633476-H2020-SFS-2014-2015)共同资助[This work was supported by the Key Programme for International Cooperation on Scientific and Technological Innovation, Ministry of Science and Technology (2016YFE0112600), and Optimizing Space Available for European Aquaculture (AquaSpace) (633476-H2020-SFS-2014-2015)]. 孙倩雯, E-mail: gwen_sun@126.com

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

收稿日期: 2018-10-24, 收修改稿日期: 2018-11-15

水平,来估算水域可以养殖的藻类或者贝类的生物量(方建光等,1996)。但养殖容量并未考虑养殖生物的其他生理需求,例如光照、温度、盐度等,而这些条件对于养殖生物是否能够健康快速生长同样重要。养殖适宜性评价通过全面评估生物的环境适应性,来选择最适合养殖的水域,与养殖容量评估互为补充,可以更好地指导养殖规划。

未来水产养殖规划管理将基于生态学方法,平衡社会、经济、环境关系,尽可能缩小各因素间的不利影响(FAO,2017)。Gentry等(2017)利用生理、异速生长和生长理论的创新方法,对全球海水养殖潜力进行了量化评估,结果显示,中国的养殖产量超过预计潜力,反映出中国已开发大面积的海域发展水产养殖,存在超容量养殖。超高密度的水产养殖会带来不利的环境影响,造成海域使用冲突,并产生高昂的社会经济损失(Ottinger *et al.*,2016)。因此,为充分利用水域空间和自然生产力,增加养殖产量和生产效率,管理部门和养殖企业都需要对养殖区开展适宜性评价,从而了解水域适合养殖的品种和养殖规模,以便进行合理的空间规划与布局。

水产养殖品种的存活和生长在很大程度上依靠水域自然环境,水文、气候、水化学要素以及初级生产力等自然环境因子是影响养殖品种生长的主要因素。因此,水产养殖适宜性评价以国家政策法规、海洋功

能区划和水环境标准为依据,通过养殖生物的生理生态特性、生长所需的环境条件和养殖水域的环境要素进行分析比较,选择适合养殖生物生长的水域,为进行科学的养殖布局提供参考。由于养殖适宜性评价涉及的数据量大,故普遍采用地理信息系统(Geographical information systems,简称GIS)(Foresman,1998)的逻辑判断、评价分析和可视化展示功能,进行空间插值和专题图层叠加,对水产养殖区进行适宜性评价分析。在适宜性评价的基础上,通过进一步整合模型运算和环境参数,还可以对特定水域的水产养殖现状及发展前景做出科学合理的评价与预测(刘慧等,2018)。

1 研究方法

1.1 研究区和数据来源

1.1.1 研究区概况 桑沟湾是位于山东半岛东端的半封闭海湾(37°01'~37°09'N,122°24'~122°35'E),面积为133.3 km²,桑沟湾及周围爱莲湾和楮岛部分海域总面积约为448 km²(36°58'~37°12'N,122°23'E~122°42')(图1)。其地理环境优越,海底平坦,水质较好,湾内平均水深为7.5 m,有不规则半日潮(张朝晖等,2007)。年平均温度为13℃,2月水温最低,月平均温度为1.8℃;8月水温最高,月平均温度为24℃。环境调查发现,桑沟湾内全年海水盐度范围为29~32,

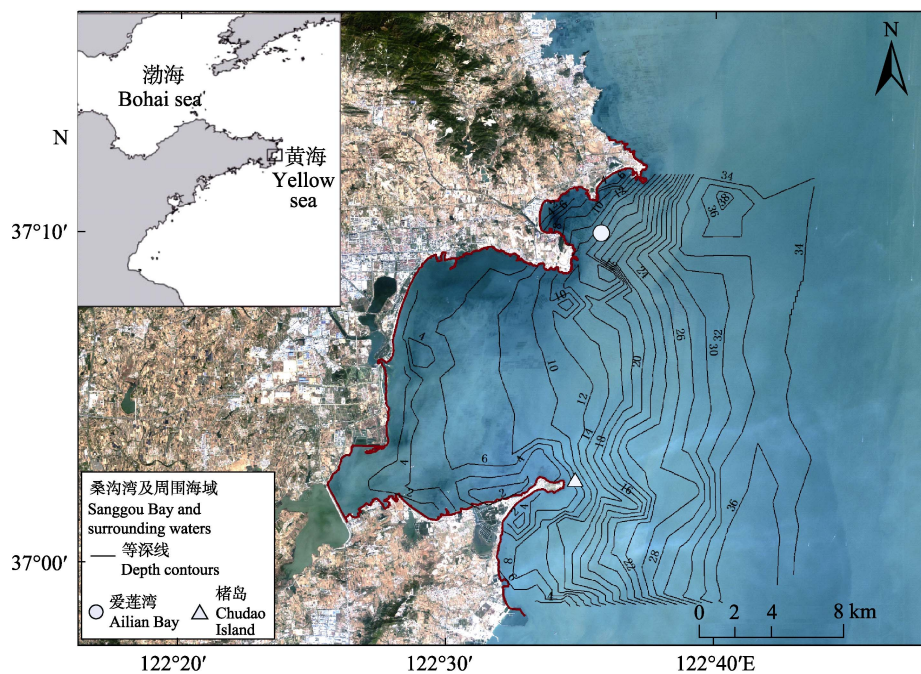


图1 海带养殖适宜性评价研究区地理位置及主要等深线

(数据来源: Copernicus Open Access Hub. <https://scihub.copernicus.eu/>)

Fig.1 The location and depth contours of the studied area for kelp aquaculture suitability assessment (Source: Copernicus Open Access Hub. <https://scihub.copernicus.eu/>)

太阳辐射强度为75~313 w/m², 平均日照时长为12 h (史洁, 2009), 适宜发展水产养殖。海带(*Saccharina japonica*)作为当地主要养殖品种, 年产量达10万t(干重)(蔡碧莹等, 2019), 且商品化程度高, 因此选取海带作为适宜性评价对象。

1.1.2 数据来源 根据海带生长发育的生理需求, 选取光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度 6 个环境参数用于养殖适宜性评价。其中, 桑沟湾及周围海域地理信息数据由遥感获取(Source: Copernicus Open Access Hub. <https://scihub.copernicus.eu/>); 流速和水温数据来源于 FVCOM 模型(Finite volume coastal ocean model)基于动力方程对桑沟湾模拟得到(Xuan *et al.*, 2016); 光照采用养殖海区平均海表光照强度, 通过晴雨天数以及每月日照时长计算获得, 数据来源于 2011 年中国气象局荣成市天气预报; 无机氮和盐度数据来源于对桑沟湾及周围海域 2011 年 4 个季度(4、8、10 月、2012 年 1 月)的大面调查。

1.2 评价指标的选择

适宜性评价指标根据海带生理生态学特点, 并结合桑沟湾养殖区地理和水环境特点进行筛选。影响海带生长的主要因素有光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度。光照对海带生长有重要的影响, 光照强弱影响海带光合作用, 且光能够刺激大型海藻对营养盐的吸收(Lobban *et al.*, 1994)。深度通过影响海带接受光照, 进而影响海带生长, 过浅的水深, 会限制海带长度的生长。海带生长受温度影响明显, 温度超过

17.5℃时, 海带叶片末梢枯烂率超过其生长率, 当温度降低时, 长海带(*Laminaria longicruris*)对 NO₃⁻的吸收速率降低(Suzuki *et al.*, 2008; Harlin, 1978); 水动力是大型藻类生产的一个关键因素, 在其他环境因素不受限时, 若大型藻类生长的主流速度持续低于饱和水平, 其生产率降低, 且较弱的水动力影响营养盐的补充(Leigh *et al.*, 1987; Wheeler, 1980)。无机氮是海带生长所需的主要营养盐, 藻类利用氮元素合成自身生长的蛋白质(Lobban *et al.*, 1996)。盐度变化影响海水藻类光合作用同化速率(王宪等, 1991)。这些环境因子的变化对海带生长产生重要的影响, 因此, 将其作为环境因素的评价指标, 并汇总各评价指标对于海带生长的参数范围(表 1)。

1.3 权重计算

不同的环境因子对海带生长的影响程度不同, 需要根据各评价指标的重要程度赋予相应的权重。深度作为限制因素, 不赋予权重; 光照、温度、流速、无机氮、盐度的重要性等级排序参考海带生长动态能量学(Dynamic energy budget, DEB)模型——STELLA 模型敏感性分析结果(表 2)(蔡碧莹等, 2019)。DEB 模型可描述海带生长与环境参数的关系, 模拟结果与实测值拟合度高, 可较好地反演海带真实的生长过程(蔡碧莹等, 2019)。通过敏感性分析得出各环境因素对海带生长的影响程度排序, 结合层次分析法(AHP)(Saaty, 1977)构造对比矩阵, 计算各环境因子的权重(表 4)。

表 1 海带适宜性评价指标

Tab.1 The criteria for assessment of culture suitability of kelp *S. japonica*

养殖品种 Species	评价指标 Criteria	阈值范围 Threshold	适宜范围 Suitable range	参考文献 Reference
海带 <i>S. japonica</i>	温度 Temperature (°C)	0.5~20	5~10	陈达义等(1964); 吴荣军等(2009)
	流速 Velocity (cm/s)	2~80	50	Wheeler(1980); 张定民等(1982)
	无机氮 DIN (mg/L)	0.01 下限	0.15~0.25	海藻栽培信息网
	盐度 Salinity	3~40	29~32	陈根禄等(1958)
	光照强度 Light intensity (μmol/m ² ·s)	/	350	Duarte 等(2003)

1.4 评分

1.4.1 单因子评分 影响海带生长的环境因子评分采用 8 分制, 1~8 分表示环境条件对海带养殖适宜程度由低到高。采用海带生长相关环境参数的强制函数来拟合评分曲线。强制函数表示不同环境因子对海带生长速率的影响, 每个环境参数的强制函数均来自下列经验公式:

温度评分曲线采用经验公式温度方程(EPA, 1985):

$$f(T) = \exp \left[-2.3 \left(\frac{T - T_{opt}}{T_x - T_{opt}} \right)^2 \right] \quad (1)$$

式中, T_x 为温度生态幅, T_{opt} 为最适宜温度, 当 $T < T_{opt}$ 时, $T_x = T_{min}$ (温度生态幅下限), 当 $T > T_{opt}$ 时,

$T_x=T_{max}$ (温度生态幅上限)。

盐度评分曲线采用盐度限制函数(Martins *et al*, 2002):

$$f(S) = \left(\frac{S - S_{opt}}{S_x - S_{opt}} \right)^m \quad (2)$$

式中, S_{opt} 为最适盐度, 当 $S < S_{opt}$ 时, $S_x = S_{min}$, $m=2.5$; 当 $S \geq S_{opt}$ 时, $S_x = S_{max}$, $m=2$ 。

流速评分方程采用藻类生长模型和水动力模型相耦合的流速曲线(Barr *et al*, 2008)

$$f(v) = 20.55 + 7.33 \ln v \quad (3)$$

式中, v 为流速。

海带对氮的吸收特征符合饱和吸收动力学, 因此, 无机氮方程采用模拟 Monod 或 Michaelis-Menten 动力学方程(Kitadai *et al*, 2003):

$$f(C_N) = \frac{C_N}{k_c + C_N} \quad (4)$$

式中, C_N 为总氮浓度, k_c 为 N 的半饱和同化系数。

光照评分采用光照限制函数(Steele, 1962):

$$f(I) = \frac{I}{I_{opt}} * e^{\left(1 - \frac{I}{I_{opt}}\right)} \quad (5)$$

式中, I 为海带表面光强, I_{opt} 为海带光合作用最适光强。

将表 1 中的参数值代入到对应的经验公式中得到单因子评分曲线(图 2), 根据曲线得到 1~8 分中每个分数段对应的参数范围, 以此作为海带养殖适宜性评分的依据。深度作为限制因素, 深度 < 5 m, 分值设置为 0; 深度 > 5 m, 分值设置为 1。

表 2 海带对各环境参数变化的敏感度(蔡碧莹等, 2019)

Tab.2 Sensitivity of kelp to the variation of environmental parameters (Cai *et al*, 2019)

参数 Symbol	定义 Description	参数变化率 Change of parameter value (%)	敏感度 Sensitivity
I_{opt}	光合作用最适光强	+20	1.33
		-20	2.51
S_{opt}	最适生长盐度	+20	0.51
		-20	1.96
T_{opt}	最适生长温度	+50	0.39
		-50	0.78
N_{imax}	维持最大生长率	+50	0.30
		-50	0.73

将桑沟湾及周围海域光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度的实测和模拟数据导入 ArcGIS, 采用空间插值方法生成各环境参数对应的专题图层。按照评分依据, 对各个环境参数的专题图层进行重分类处理, 每幅专题图层中, 按照评分标准赋予各参数范围对应的分值, 生成光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度 6 幅单因子评分图层。

1.4.2 多指标综合评分 水产养殖适宜性评价涉及到多种因素, 由于这些因素的重要程度不同, 因而不能将指标图层简单地叠加。采用线性加权叠加分析(Malczewski, 2000)计算综合适宜性评分, 计算公式如下:

$$A_i = \sum_j w_j x_{ij}$$

式中, A_i 为评价对象像元的适宜性分数, w_j 为指标的权重, x_{ij} 为像元指标 j 的分数。

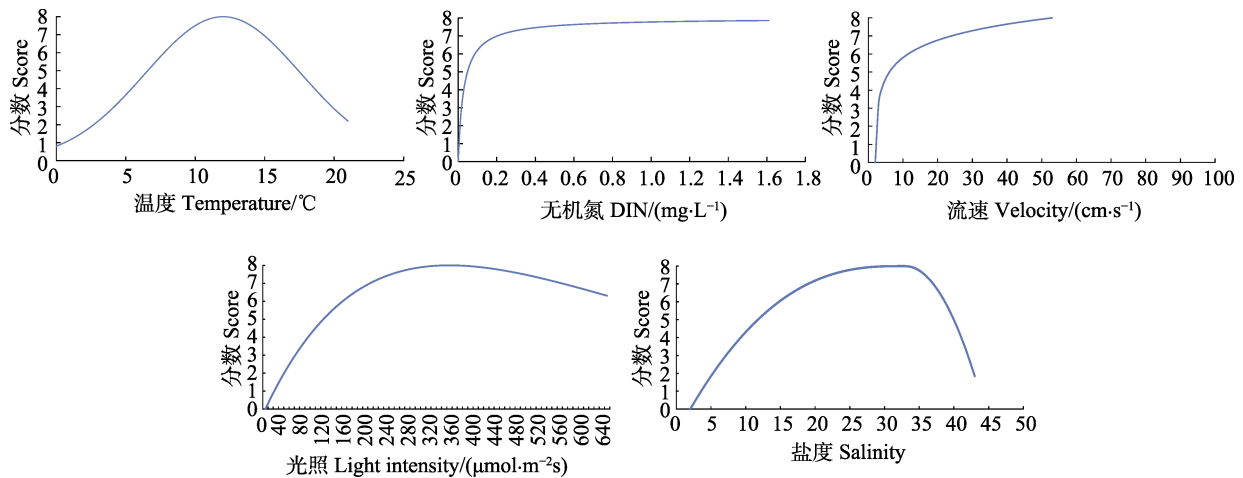


图 2 环境因素评分曲线(温度, 无机氮, 流速, 光照, 盐度)

Fig.2 The scoring curve of environmental variables (temperature, DIN, velocity, light intensity, and salinity)

将光照、温度、流速、无机氮、盐度、深度单因子评分图层进行重采样, 根据叠加分析, 利用 ArcGIS 栅格计算功能将各单因子评分图层进行叠加, 输出 4 个季度的适宜性评分图层, 图层显示, 综合各因素后每个季度的适宜性评分(1~8)。将每个季度的适宜性评分重新分类, 划分为最适宜、中等适宜、一般适宜和不适宜 4 个等级(表 3), 不同的适宜性等级表示海带养殖不同的适宜程度。最后, 综合 4 个季度的适宜性评分, 进行栅格图层叠加, 生成最终适宜性评分

图层和适宜性等级图层。

表 3 海带养殖适宜性等级划分
Tab.3 The classification for culture suitability level of the kelp

适宜性评分 Score	适宜性等级 Suitability level
0~2	不适宜 Unsuitable
2~4	一般适宜 Less suitable
4~6	中等适宜 Relatively suitable
6~8	最适宜 Optimal

表 4 海带养殖适宜性评价指标权重
Tab.4 The weighted indices of kelp culture suitability

指标 Indices	光照 Light intensity	温度 Temperature	流速 Velocity	无机氮 DIN	盐度 Salinity	权重 w_i
光照 Light intensity	1	2	3	4	5	0.4185
温度 Temperature	1/2	1	2	3	4	0.2625
流速 Velocity	1/3	1/2	1	2	3	0.1599
无机氮 DIN	1/4	1/3	1/2	1	2	0.0973
盐度 Salinity	1/5	1/4	1/3	1/2	1	0.0618

Consistency ratio (CR)=0.0152<0.1

2 结果

海带养殖适宜性评价结果显示, 桑沟湾及其周围海域适宜性分数分布在 0~6.7 范围内, 由桑沟湾近岸到离岸较远海域, 适宜性分值逐渐增大后减小, 评分较高的区域主要分布在北部爱莲湾和楮岛东部海域, 适宜性评分较低的区域主要位于近岸海域。适宜性分值主要集中在 4~6 分, 属于中等适宜(298.9 km²), 占研究区总面积的 67%, 最适宜(103.7 km²)和不适宜(45.4 km²)分别占研究区总面积的 23%和 10%, 没有分值分布在一般适宜(图 3 和图 5)。

2011 年 4 个季度适宜性评价结果显示, 春季适

宜性分值较高的区域呈块状分布, 夏季适宜性评分呈阶梯状, 评分分值由桑沟湾湾内向湾外方向递增, 且分值差距最大, 秋季适宜性高分区主要分布在爱莲湾和楮岛东部海域附近, 冬季较春、夏、秋季, 高分值区向桑沟湾湾内迁移(图 4a)。春、秋和冬季中等适宜海区面积占比最大, 分别占研究区总面积的 56%、86%和 78%, 夏季最适宜海区面积最大, 约占研究区总面积的 65%, 海带养殖期间, 4 个季节不适宜养殖区面积均为 45.4 km², 占研究区总面积的 10% (图 4b 和图 5)。

适宜性评价结果与现有养殖布局对比显示, 养殖区分布密集, 养殖筏架主要分布在中等适宜区域, 约

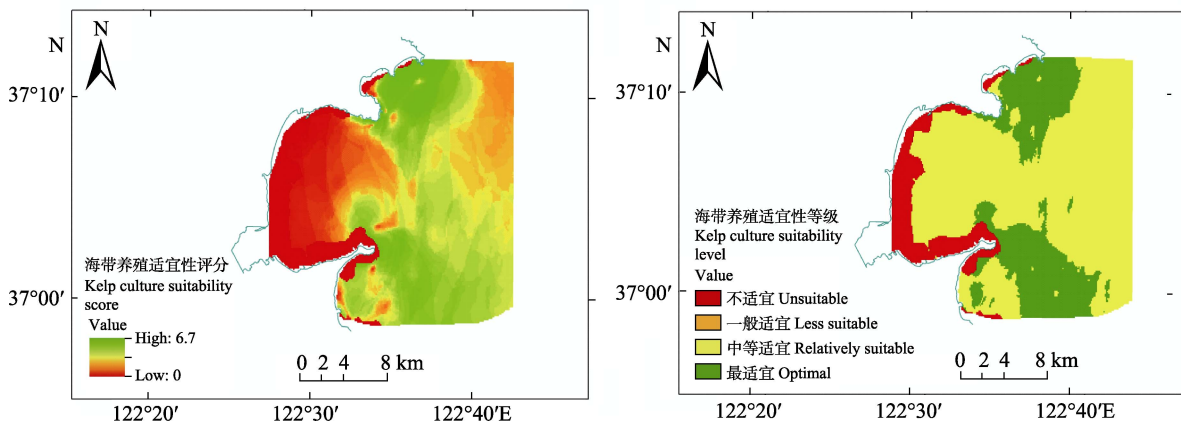


图 3 2011 年桑沟湾及周围海域海带养殖适宜性评分和适宜性等级

Fig.3 The score and level of kelp culture suitability in Sanggou Bay and the surrounding waters in 2011

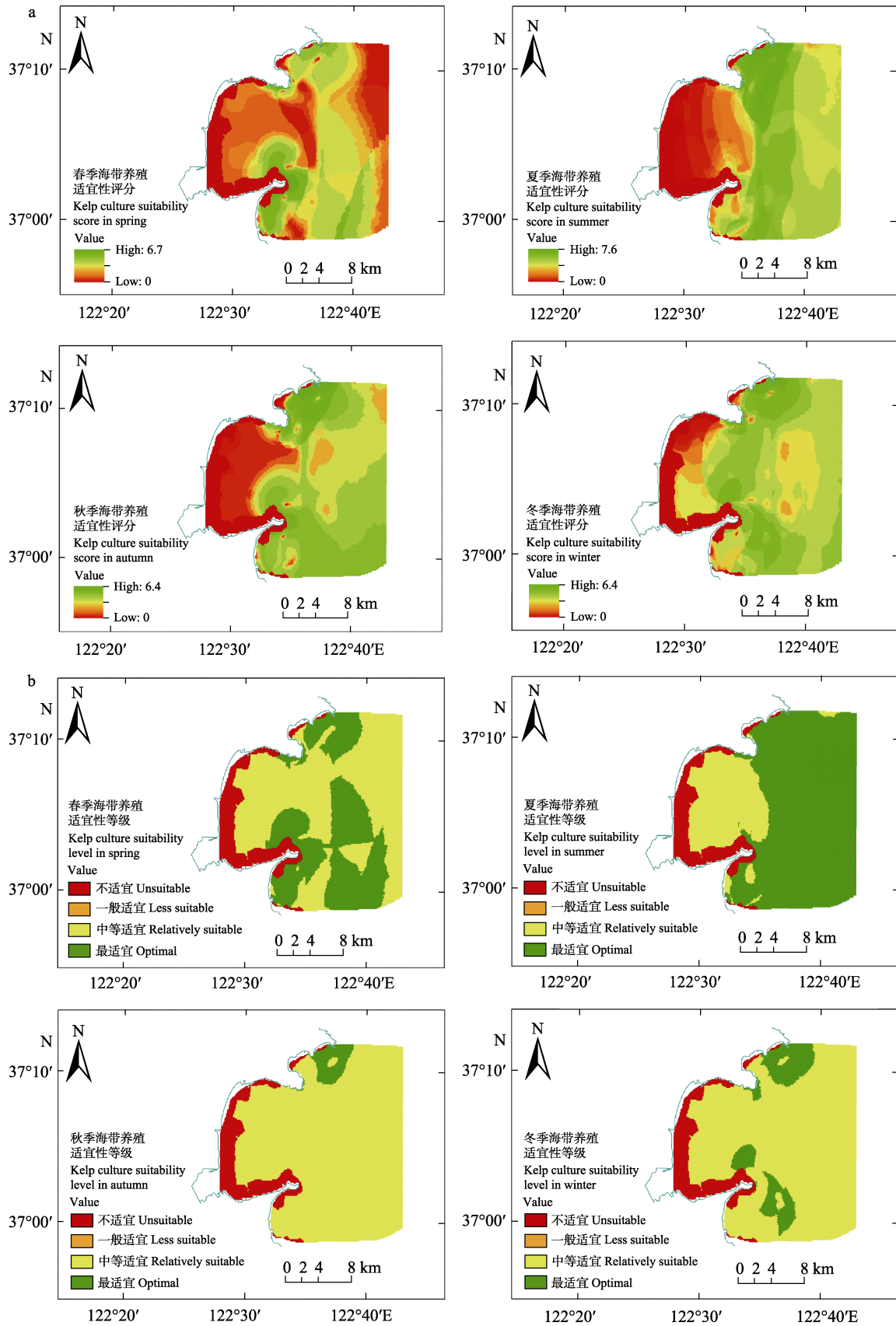


图4 2011年4个季度桑沟湾及周围海带养殖适宜性评分(a)和适宜性等级(b)

Fig.4 The suitability score (a) and the suitability level (b) of kelp culture for 4 quarters of 2011 in Sanggou Bay and the surrounding waters

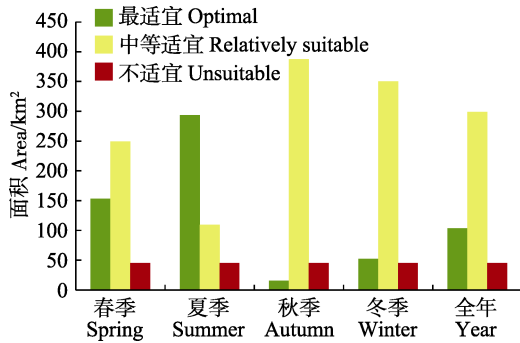


图 5 海带养殖各适宜性等级所占面积

Fig.5 Proportion of suitable areas for kelp culture

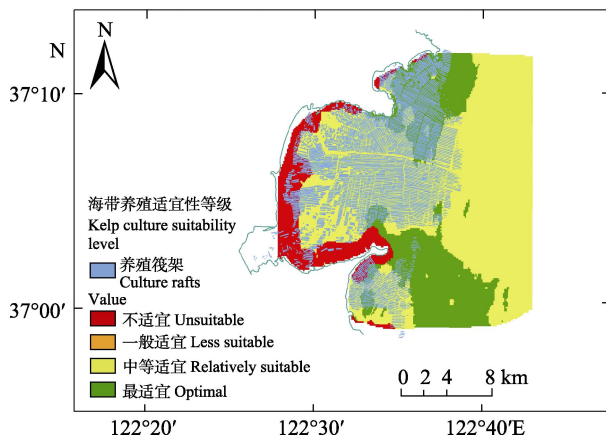


图 6 桑沟湾及周围海域现有养殖状况与适宜性等级

Fig.6 The status quo and suitability level in Sanggou Bay and surrounding waters

6 km²的筏架处于不适宜区, 19.8 km²的筏架处于最适宜区。从遥感影像显示, 约 62.7 km²的最适宜区域并未安置养殖筏架(图 6)。实际养殖中, 楮岛东部海域最适宜区域海带长度约为 4 m, 而楮岛近岸不适宜养殖区的海带长度最多长到 3 m。

3 讨论

现有养殖布局(图 6)显示, 桑沟湾及其周围海域的养殖已经达到一定的规模, 生产面临挑战。通过对海带适宜性评价, 确定海带最适宜的养殖区域, 以期获得最佳的养殖结果, 同时, 可缓解现有的养殖压力。适宜性评价关键在于环境因素评分的设定, 已有的评分方法多采用经验打分和等间距打分(Radiarta *et al.*, 2008), 使得评分结果主观性较大。Gentry 等(2017)利用生理、异速生长和生长理论的方法, 以多物种 GPI 值(Growth performance index)作为一个养殖生长适宜性的评价标准, GPI 值由 von Bertalanffy 生长方程(Froehlich *et al.*, 2016)和具体养殖品种参数求得, 高的 GPI 值视为有更好的生长条件, 对水产养殖潜力进

行了宏观评估。本研究针对桑沟湾及周围海域具体的养殖品种进行适宜性评价, 采用影响海带生长的经验公式作为评分曲线, 能较好地反映出海带生长对各环境因素的需求范围, 且通过评分曲线, 各环境因素实测值都有与之对应的评分, 评分结果较为科学。

海带养殖对季节依赖性较强, 4 个季节适宜性有较大的差异。春季高分区呈块状分布可能由于春季海带生长较快, 海区无机氮浓度处于一年当中最低值, 因此, 高分值区分散在无机氮较为充足的区域。夏季最适宜面积大于春季、秋季和冬季, 可能由于夏季降水多, 陆源输送使得海区无机氮得到补充, 且此时部分海带已收割, 海带自身的阻流作用减弱, 水交换较好, 处于比较适宜的环境状态。秋季适宜性评分较高的区域主要分布在桑沟湾湾外、爱莲湾和楮岛东部海域附近, 此时, 海表面光强比较平均, 相对于湾内, 湾外水交换较快, 无机氮可得到及时补充, 且水温比较适宜, 所以更适宜海带生长。冬季适宜性评分较高的区域逐渐向近岸处迁移, 数据模拟显示(Xuan *et al.*, 2016), 由于冬季水温较低, 靠近湾内水温相对较高, 适宜海带生长, 且冬季湾外风浪大, 风浪搅动水底泥沙, 实测数据显示, 冬季水体透明度降低, 影响海带受光, 不适宜海带生长(平仲良, 1993)。

适宜性评价中, 采用海带生长 DEB 模型——STELLA 模型进行敏感性分析, 结果显示, 盐度的敏感度大于温度和无机氮(蔡碧莹等, 2019)。虽然, 在养殖环境中, 水体盐度发生改变会对海带生长产生较大的影响, 但桑沟湾没有大型河流汇入, 多年平均降雨量处于中等水平, 盐度的年变化较小, 基本处于适宜海带生长的盐度范围, 且桑沟湾及周围海域盐度强制函数 $f(S)=0.91\sim 0.96$ (蔡碧莹等, 2019), 相较温度和无机氮, 盐度对海带生长限制较小。敏感性分析虽未涉及流速参数, 但由于水动力影响湾内外水交换和无机氮的输送, 水交换带动营养盐补充(史洁等, 2010), 所以, 流速较无机氮对海带生长影响更大, 此外, 温度影响海水流动(冯士筌等, 1999), 因而影响海带生长的环境因子重要性依次为光照>温度>流速>无机氮>盐度。

根据实际生产结果, 海带养殖适宜性评价结果得到了验证, 证明该评价结果较为科学。在北部爱莲湾海域, 浅水区水温较高, 水温升高导致海带腐烂, 海带长度最多长到 3 m; 位于最适宜海区海带长度可达 4 m 左右。楮岛近岸海域周围(水深<5 m 的红色区域), 由于受到水深限制, 海带长度<3m, 达不到一般正常尺寸(4 m), 不适宜安排海带养殖。对于湾外水深超过 30 m 的区域, 虽然, 从适宜性评价结果上属于最

适宜或中等适宜,但实际海带养殖方面,由于风浪较大,养殖设施损失较大,从经济利益角度考虑并不适宜安排海带养殖。楮岛东部海域附近有大面积的海域属于最适宜养殖,但该区域养殖筏架主要集中在近岸,离岸较近海域养殖易受沿岸人类活动影响,因此,可适当将海带养殖筏架后移。

4 结 论

本研究通过适宜性评价对桑沟湾及周围海域海带养殖的适宜性进行了评分,划分出不同的适宜性等级。结果表明,适宜性评分较高的区域位于爱莲湾及楮岛东部海域周围,评分较低的区域分布在近岸水深较浅的区域(水深<5 m)。评价结果显示了桑沟湾及周围海域海带养殖区适宜性分布,可根据适宜性评价结果调整现有的养殖布局,将海带养殖区优先安排在海带生长最适宜区或适宜性评分较高的海区。

GIS 作为有效的适宜性评价工具,可将海域时间和空间上非连续的环境参数,可视化的反映其空间分布特征,并简化数据计算和多图层叠加过程,增加了评价结果的精确性和科学性。对于一片养殖水域进行适宜性评价,需要综合考虑养殖过程涉及到的各个方面,例如养殖品种的生长状况、养殖活动对生态环境的影响、养殖产量及利润的评估,养殖风险的预测分析等。这些模型的结合使水产养殖适宜性综合评价更为全面,所呈现出的评价结果更科学合理,可对养殖场选址提出建议,为决策者和利益相关者提供参考,有助于我国开展基于生态系统的水产养殖空间规划以及可持续的水产养殖管理工作。

参 考 文 献

- Barr NG, Kloeppel A, Rees TAV, *et al.* Wave surge increases rates of growth and nutrient uptake in the green seaweed *Ulva pertusa* maintained at low bulk flow velocities. *Aquatic Biology*, 2008, 3(2): 179–186
- Cai BY, Zhu CB, Liu H, *et al.* Model simulated growth of kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 31–41 [蔡碧莹, 朱长波, 刘慧, 等. 桑沟湾海带生长的模型预测. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 31–41]
- Chen GL, Wang DS. Experience in pilot production management of kelp farming. *China Fisheries*, 1958(4): 10 [陈根禄, 王东室. 海带养殖试点生产管理中的几点体会. *中国水产*, 1958(4): 10]
- Chen DY, Wang JX. Observation of the relationship between the growth and water temperature of kelp in southern Zhejiang. *Zhejiang Agricultural Science*, 1964(2): 89–93 [陈达义, 汪进兴. 海带在浙南沿海生长发育与水温关系的观察. *浙江农业科学*, 1964(2): 89–93]
- Duarte P, Meneses R, Hawkins AJS, *et al.* Mathematical modelling to assess the carrying capacity for multi-species culture within coastal waters. *Ecological Modelling*, 2003, 168(1–2): 109–143
- EPA (Environmental Protection Agency, USA). Rates, constants, and kinetics. Formulations in surface water quality modeling: 2nd Edition, 1985, 455
- Fang JG, Sun HL, Kuang SH, *et al.* Assessing the carrying capacity of Sanggou Bay for culture of kelp *Laminaria japonica*. *Marine Fisheries Research*, 1996(2): 7–17 [方建光, 孙慧玲, 匡世焕, 等. 桑沟湾海带养殖容量的研究. *海洋水产研究*, 1996(2): 7–17]
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Ninth session FAO COFI sub-committee on aquaculture, Rome, 2017, <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/en>
- Feng SZ, Li FQ, Li SJ. Introduction to ocean science. Beijing: High Education Press, 1999 [冯士筌, 李凤歧, 李少菁. 海洋科学导论. 北京: 高等教育出版社, 1999]
- Foresman TW. The history of geographic information system perspectives from the pioneers. Englewood: Prentice Hall PTR, 1998
- Froehlich HE, Gentry RR, Halpern BS. Synthesis and comparative analysis of physiological tolerance and life-history growth traits in marine aquaculture species. *Aquaculture*, 2016, 460: 75–82
- Gentry RR, Halley EF, Grimm D, *et al.* Mapping the global potential for marine aquaculture. *Nature Ecology and Evolution*, 2017, 1(9): 1317–1324
- Harlin MM. Nitrate uptake by *Enteromorpha* spp. (Chlorophyceae): Application to aquaculture systems. *Aquaculture*, 1978, 15(4): 373–376
- Kitadai Y, Kadowaki S. The growth process and N, P uptake rates of *Laminaria japonica* cultured in coastal fish farms. *Aquaculture Science*, 2003, 51(1): 15–23
- Leigh EG, Paine RT, Quinn JF, *et al.* Wave energy and intertidal productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(5): 1314–1318
- Liu H, Cai BY. Advance in research and application on aquaculture carrying capacity. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 158–166 [刘慧, 蔡碧莹. 水产养殖容量研究进展及应用. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 158–166]
- Lobban CS, Harrison PJ. Seaweed ecology and physiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1996
- Lobban CS, Harrison PJ. Seaweed ecology and physiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 123–162
- Malczewski J. On the use of weighted linear combination method in GIS: Common and best practice approach. *Transaction in GIS*, 2000, 4(1): 5–22
- Martins I, Marques JC. A model for the growth of opportunistic

- macroalgae (*Enteromorpha* sp.) in tidal estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2002, 55(2): 247–257
- Ottinger M, Clauss K, Kuenzer C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review. *Ocean and Coastal Management*, 2016, 119: 244–266
- Ping ZL. Calculating the suspended matter content in the Yellow Sea with the seawater transparency data and NOAA satellite data. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1993, 24(1): 24–30, 118 [平仲良. 用实测海水透明度数据和 NOAA 卫星数据计算黄海悬浮体含量. *海洋与湖沼*, 1993, 24(1): 24–30, 118]
- Radiarta IN, Saitoh SI, Miyazono A. GIS-based multi-criteria evaluation models for identifying suitable sites for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) aquaculture in Funka Bay, southwestern Hokkaido, Japan. *Aquaculture*, 2008, 284(1–4): 127–135
- Saaty TL. A scaling method for priorities in hierarchical structures. *Journal of Mathematical Psychology*, 1977, 15(3): 234–281
- Shi J, Wei H, Zhao L, *et al.* Study on ecosystem model of multi-species culture in Sanggou Bay: II Simulation of ecosystem and the circulation of nutrients. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 36–42 [史洁, 魏皓, 赵亮, 等. 桑沟湾多元养殖生态模型研究: II 生态环境模拟与生源要素循环. *渔业科学进展*, 2010, 31(4): 36–42]
- Shi J. Numerical study on the influences of physical processes on the aquaculture carrying capacity in a semi-enclosed bay. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 [史洁. 物理过程对半封闭海湾养殖容量影响的数值研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009]
- Steele JH. Environmental control of photosynthesis in the sea. *Limnology and Oceanography*, 1962, 7(2): 137–150
- Suzuki S, Furuya K, Kawai T, *et al.* Effect of seawater temperature on the productivity of *Laminaria japonica* in the Uwa Sea, southern Japan. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 833–844
- Wang X, Li WQ. Effects of salinity and pH on photosynthesis rate of marine algae. *Marine Environmental Science*, 1991, 10(1): 37–40 [王宪, 李文权. 盐度、pH 对海洋藻类光合作用速率的影响. *海洋环境科学*, 1991, 10(1): 37–40]
- Wheeler WN. Effect of boundary layer transport on the fixation of carbon by the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology*, 1980, 56(2): 103–110
- Wu RJ, Zhang XL, Zhu MY, *et al.* A model for the growth of Haidai (*Laminaria japonica*) in aquaculture. *Marine Science Bulletin*, 2009, 28(2): 34–40 [吴荣军, 张学雷, 朱明远, 等. 养殖海带的生长模型研究. *海洋通报*, 2009, 28(2): 34–40]
- Xuan JL, Yang ZQ, Huang DJ, *et al.* Tidal residual current and its role in the mean flow on the Changjiang bank. *Journal of Marine Systems* 2016, 154: 66–81
- Zhang DM, Liao GR, Yang QM. Research on the relationship between the coastal current and *Laminaria japonica* raising II. An experiment of comparison between the current speed and *Laminaria japonica* growth. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1982, 12(3): 73–79 [张定民, 缪国荣, 杨清明. 沿岸流与海带养殖关系的研究 II. 流速对海带生长的影响. *山东海洋学院学报*, 1982, 12(3): 73–79]
- Zhang ZH, Lv JB, Ye SF, *et al.* Values of marine ecosystem services in Sanggou Bay. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(11): 2540–2547 [张朝晖, 吕吉斌, 叶属峰, 等. 桑沟湾海洋生态系统的服务价值. *应用生态学报*, 2007, 18(11): 2540–2547]

(编辑 马瑾艳)

GIS-Based Assessment for Culture Suitability of Kelp (*Saccharina japonica*) in Sanggou Bay and the Surrounding Waters

SUN Qianwen^{1,2}, LIU Hui^{2①}, SHANG Weitao^{3,4}, YU Liangju⁴,
JIANG Xiaopeng^{3,4}, CAI Biying^{1,2}, CHANG Lirong⁵, XIAO Luyang⁵

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

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

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 4. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003;

5. Weihai Changqing Ocean Science & Technology Co., Ltd, Rongcheng 264316)

Abstract With the expansion of aquaculture, there is an increasing concern regarding issues such as conflicts with multi-sea use, low productivity, and higher economic costs. The selection of suitable sites for aquaculture is essential for utilization of sea space and improvement of the efficiency and profits of aquaculture industry. Kelp (*Saccharina japonica*) is the main culture species in Sanggou Bay and the surrounding waters. The assessment of suitability for kelp culture has been conducted with factors, including light intensity, water temperature, velocity, dissolved inorganic nitrogen, salinity, and depth. The remote sensing is employed to obtain the information of the existing culture areas. The environment variables were collected from field surveys along with model simulations. The Dynamic Energy Budget (DEB) model–STELLA model coupled with analytic hierarchy process was applied to calculate weighted-sums of scores for suitability evaluation. The result showed that the suitability scores were 0~6.7 with the main distribution range of 4~6. 23% of area was estimated to be the most suitable for kelp culture, whereas 10% of total study area was not suitable. The high score areas are mainly located in Ailian Bay and Chudao eastern surrounding waters, whereas the low score areas are mainly located in the shallow waters near the shore. The results have provided a guideline to help in site selection and in the management of kelp culture.

Key words Aquaculture; Suitability assessment; Site selection; GIS

① Corresponding author: LIU Hui, E-mail: liuhui@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180906005

http://www.yykxjz.cn/

李苗, 单秀娟, 王伟继, 丁小松, 戴芳群, 吕丁, 吴欢欢. 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 51–57

Li M, Shan XJ, Wang WJ, Ding XS, Dai FG, Lü D, Wu HH. Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 51–57

环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例*



李 苗^{1,3} 单秀娟^{1,2①} 王伟继^{1,2} 丁小松^{1,3}
戴芳群^{1,2} 吕 丁¹ 吴欢欢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 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 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. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 精确地掌握物种的分布与种群动态是保护生物学的基础。然而,对于某些具有特殊生活史的物种以及群体数量非常少的种群而言,物种分布检测极其困难。DNA 条形码技术与环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)的结合使以上困难得以解决。鉴于 eDNA 易降解、在环境中含量低的特性,探究其在环境中的持续存留时间对于后续准确进行定性与定量分析至关重要。本研究以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象,结合实时荧光定量 PCR 定量分析了水环境中 eDNA 随时间的降解情况,基于赤池信息准则(Akaike Information Criterion, AIC),选择了最适于 eDNA 随时间降解的统计模型。结果显示,当 eDNA 的释放源头被去除后, eDNA 在水体中的含量与时间呈负相关关系,其在环境中的存留时间为 30 d 左右。本研究旨在为合理规划物种的定性检测与定量评估提供理论依据,以期将人为因素造成的实验误差降到最低。

关键词 环境 DNA; 存留时间; 中国对虾

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0051-07

全球渔业衰退是 21 世纪面临的重大挑战之一 (Dudgeon, 2010; 金显仕等, 2015; Evans *et al*, 2018)。然而,对研究人员与政策制定者而言,收集水生生物种群分布与种群动态变化的精确数据是其面临的巨大挑战(Thomsen *et al*, 2015),特别是对于某些密度极小与具有特殊生活史的种群,检测其时空分布与调查

其种群动态变化将变得更加困难(Mackenzie *et al*, 2005; Dejean *et al*, 2011)。为了克服以上困难, DNA 条形码技术被成功地应用到水生生态系统中,检测来自生物体细胞外的 DNA(即 eDNA)(Bohmann *et al*, 2014; 单秀娟等, 2018),进而通过 eDNA 去掌握物种的分布与种群动态变化。该方法不需要采集生物样

* 国家重点研发计划(2017YFE0104400)、国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、山东省泰山学者专项基金项目 and 青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山人才培养计划项目(2017ASTCP-ES07)共同资助 [This work was supported by the National Key R&D Program of China (2017YFE0104400), the National Basic Research Program of China (2015CB453303), Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province, and Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao) (2017ASTCP-ES07)]. 李 苗, E-mail: limiao0417@126.com

① 通讯作者: 单秀娟, 研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-09-06, 收修改稿日期: 2018-12-05

本,对生态系统无伤害且经济高效。目前,该方法已成功应用到生物检测(Goldberg *et al*, 2015; Davison *et al*, 2017)、生物多样性评价(Drummond *et al*, 2015; Majaneva *et al*, 2018)、生物量评估(Pillioddavid *et al*, 2013; Tillotson *et al*, 2018)、鱼类洄游(Yamanaka *et al*, 2016)以及其他方面(Sigsgaard *et al*, 2016、2017)的研究中。

由于 eDNA 极易降解,且在环境中含量极低,因而,其在环境中的存留时间将会直接影响后期的定性分析与定量分析。为了能够将 eDNA 技术准确地应用到水生生态系统的研究领域中,探究 eDNA 在水体中的存留时间显得尤为重要。eDNA 在环境中的存留时间是指切断 eDNA 的来源之后,eDNA 在环境中的持续存在时间(Dejean *et al*, 2011)。虽然,已有相关研究表明,eDNA 在水体中呈指数式降解(Dejean *et al*, 2011; Strickler *et al*, 2015),但不同的物种具有不同的生活史,其释放 eDNA 的速率各不相同(Minamoto *et al*, 2017),从而导致不同物种释放的 eDNA 在水体中的存留时间不同。本研究以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象,结合实时荧光定量 PCR,检测 eDNA 在水体中的存留时间,同时,探究 eDNA 降解速率与时间之间的关系。本研究旨在为水生生态系统 eDNA 的取样、操作流程优化、整体实验方案设计及应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 特异性引物设计

针对中国对虾的线粒体细胞色素酶氧化亚基 I (CO I)基因设计特异性引物。在 GenBank 数据库中检索中国对虾线粒体 DNA (mtDNA) CO I 基因序列(GenBank 登录号: gbHQ700930.1),利用 BioEdit 和 MEGA7 软件进行序列比对,使用 Primer Premier 6 与 Beacon Designer 8 软件设计引物与探针,并在 NCBI 网站上进行引物特异性测试。

筛选确定 1 对特异性扩增中国对虾 CO I 基因的目的片段为 597 bp 的普通 PCR 引物(CO I PF: TTGT AGTTACAGCCCACGCT, CO I PR: AAATTATCCCGAAGGCGGGT)与 1 对目的片段为 106 bp 的荧光定量 PCR 引物(CO I DF: AGGGGTAGGAACAGGATGAAC, CO I DR: GACACCAGCTAGATGCAGCG, Probe: 5'FAM-TCAGCTAGAATTGCTCATGCCGGA-GCTTCAGT-3'BHQ1),其中,普通 PCR 引物用来制备质粒标准品 DNA,定量 PCR 引物所扩增的目的片段为普通 PCR 引物所扩增目的片段的一部分。引物

由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 中国对虾肌肉组织 DNA 提取及 PCR 扩增

实验所用中国对虾肌肉组织取自 2016 年渤海渔业资源调查捕获的中国对虾,−20℃保存。

中国对虾肌肉组织 DNA 的提取采取传统的酚-氯仿-异戊醇方法,提取完成后,使用紫外分光光度计检测 DNA 浓度并稀释到 50 ng/μl,用 1.5 ml 无菌离心管分装,−20℃保存。25 μl PCR 反应体系:10×Taq Buffer 2.5 μl, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.5 μl, 正反向引物(CO I PF/CO I PR)(10 mmol/L)各 0.5 μl, Taq DNA Polymerase(5 U/μl) 0.5 μl, 模板 DNA (50 ng/μl) 1 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, ddH₂O 18 μl。PCR 扩增反应条件:94℃预变性 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 扩增 35 个循环; 72℃复延伸 10 min。PCR 产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3 中国对虾 mtDNA CO I 基因克隆及质粒标准品制备

将 1.2 中 PCR 产物用 Gel Extraction Kit (OMEGA)试剂盒进行纯化。将纯化的 PCR 产物连接到 pMD-18-T 质粒载体(TaKaRa)上,转化入 DH5α 感受态细胞(TaKaRa)中,最后在含 Amp、X-gal 及 IPTG 的 LB 固体平板培养基上过夜培养,经过蓝白斑筛选后,挑取 8 个白色单菌落,分别置于 1.5 ml 离心管中培养 8 h,将菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据测序结果,选取连接转化成功的菌液扩大培养。培养 24 h 后,使用 Plasmid Mini Kit I (OMEGA)进行质粒标准品 DNA 提取。DNA 提取完成后,使用紫外分光光度计检测并计算其拷贝数,最后将其稀释到 10⁸ copies/μl, −80℃保存备用。

以上所有实验步骤均按照说明书进行操作。

1.4 样品采集

为了检测 eDNA 在水体中的存留时间,必须保证水体中有一定量的 eDNA,且在开始检测时切断其 eDNA 的释放源头,以免生物体不断地向水体中释放 DNA 而影响实验结果。因此,通常是在固定的水体中饲养研究对象一段时间,待水体中 eDNA 有一定量的积累后将生物体从水体中移除。

本实验所用水样取自中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心中国对虾养殖池(养殖池内只有中国对虾这单一物种,且养殖池内有足够量的 eDNA),养殖池长 5.5 m、宽 3.6 m、高 1.2 m,池内水体体积为 14 m³,池内有中国对虾 180 只,虾体平均体重为 27 g。从池内取 25 L 水样用提前消毒的

无菌白色塑料桶带回实验室, 室温保存, 桶内用充气泵保持充气直至取样完毕(有关养殖池信息及中国对虾体长、体重数据均由遗传育种中心工作人员测量)。

取样工作参照 Dejean 等(2008)的方法并加以改进, 每隔 24 h 从水桶内取 15 ml 水样, 装进 50 ml 无菌离心管内, 同时, 在离心管内加 3 mol/L 的醋酸钠溶液 1.5 ml 与无水乙醇 33 ml, 每次取 3 个平行样本, -20°C 保存直至进行 eDNA 提取。水样采集时间为 2018 年 1 月 12 日~2 月 7 日, 取样时间为每天 08:00。

1.5 eDNA 提取

选用 DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, 德国)试剂盒进行 eDNA 的提取, 提取方法参照 Ficetola 等(2008)、Dejean 等(2008)与 Renshaw 等(2015), 并进行相应改进, 其具体提取步骤为:

将水样从冰箱拿出, 4°C 9000 g 离心 1 h。将上一步离心管底部的沉淀物全部刮出, 放入 2 ml 的无菌离心管中, 加入 570 μl 的 Buffer ATL 与 60 μl 的蛋白酶 K, 涡旋震荡混匀, 恒温水浴 3 h 直至沉淀物完全裂解, 水浴期间, 每隔 15 min 轻轻颠倒混匀离心管以加速裂解, 裂解完成后涡旋震荡 15 s。其余步骤按照试剂盒说明书进行, 其中, 最后一步中 DNA 的洗脱用 60 μl Buffer TE, 而非试剂盒中 Buffer AE。

eDNA 提取完成后, 立即使用紫外分光光度计检测其浓度, 若 eDNA 样品浓度高于 250 ng/ μl , 则将其进行稀释。每个 eDNA 样品吸取 10 μl 用作琼脂糖凝胶电泳检测及 PCR 定量分析, 其余 50 μl eDNA 溶液于 -80°C 保存。

1.6 eDNA 的定量分析

所有提取的 eDNA 样品采用 BBI 生命科学有限公司 2 \times TaqMan Fast qPCR Master Mix(Low Rox)实时荧光定量 PCR 试剂盒进行定量分析。PCR 采用 20 μl 体系: 10 μl 2 \times TaqMan Fast qPCR Master Mix, 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μl , 0.4 μl 探针(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μl 模板 DNA, 6.8 μl PCR 级水。扩增反应程序采用两步法: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 5 s, 60°C 退火延伸 34 s, 40 个循环。

PCR 扩增使用 ABI 7500 型定量 PCR 仪和 96 孔板(Thermo Fisher), 标准品 DNA 与未知浓度 eDNA 样品均进行 3 个重复, 每个 96 孔板进行 3 个阴性对照(无模板)与 3 个阳性对照(中国对虾基因组 DNA), 标准品以 10 倍浓度梯度从 10^7 copies/ μl 稀释至 10^1 copies/ μl 。实验数据采用绝对定量法分析, eDNA 拷贝数取阳性扩增样品的平均值, 应用系统软件 SDS1.4.0.25 自动

计算 Ct 值及生成标准曲线与扩增曲线。

1.7 数据分析

基于 AIC 选择了最适于 eDNA 随时间降解的模型(Burnham, 2002; Wickham, 2009), 所有数据使用 R3.5.0 进行处理, 误差控制在 95%的置信区间以内。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 引物对 CO I PF/PR 与 CO I DF/DR 成功扩增出 597 bp 与 106 bp 的目的片段, 与预期结果完全一致, 电泳条带单一且明亮, 无杂带(图 1), 证明所设计的引物特异性很好。

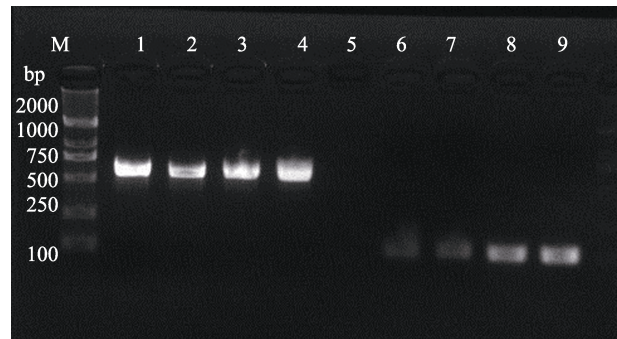


图 1 引物 CO I PF/PR 与 CO I DF/DR 的扩增结果

Fig.1 Amplification of primer CO I PF/PR and CO I DF/DR

M: DNA Marker DL 2000; 泳道 1~4 为引物 CO I PF/PR 的 PCR 产物; 泳道 6~9 为引物 CO I DF/DR 的 PCR 产物
M: DNA Marker DL 2000; Lane 1~4: PCR products of CO I PF/PR; Lane 6~9: PCR products of CO I DF/DR

2.2 标准曲线建立及回归方程设定

通过实时荧光定量 PCR 扩增, PCR 检测系统根据荧光值的变化规律, 自动生成中国对虾 CO I 基因的标准曲线(图 2)。曲线的斜率为 $K=-3.15$, 相关系数 $R^2=0.994$, 回归方程为 $y=-3.24x+37.47$, 说明在稀释的质粒标准品 DNA 浓度范围内具有良好的线性关系, 表明本研究建立的标准曲线能够准确地反映中国对虾 CO I 基因的扩增。

2.3 eDNA 检测

使用紫外分光光度计检测未知浓度 eDNA 样品发现, 大部分样品的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值均低于 1.8, 只有极少数样品的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间, 且 eDNA 样品浓度普遍较低, 说明水体中 eDNA 含量较少且水体中杂质较多, 因而导致提取的 DNA 纯度较低。

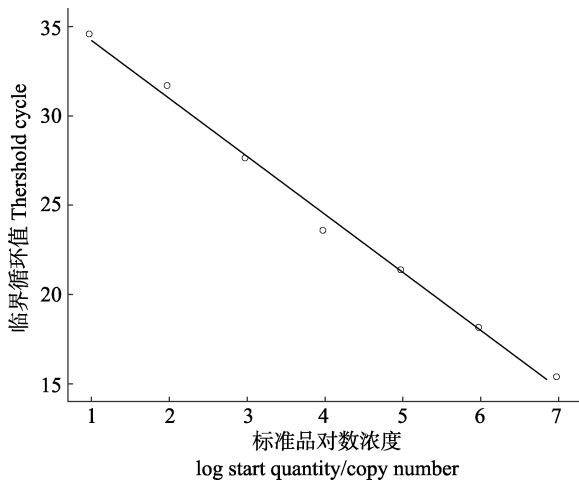


图2 中国对虾 CO I 基因 AQ-PCR 标准曲线
Fig.2 Standard curve of AQ-PCR of *Fenneropenaeus chinensis* CO I gene

2.4 eDNA 降解结果

检测结果显示,在 eDNA 的释放源头去除后,随着时间的推移,水体中 eDNA 的拷贝数与时间呈负相关关系。第 1 天(2018 年 1 月 12 日)检测时每 15 ml 水样中含有的 DNA 拷贝数为 3.76×10^4 ,而在第 27 天(2018 年 2 月 7 日)检测时,每 15 ml 水体中的 eDNA 拷贝数则降解为 711。此外,基于 AIC 比较了 GAM (Gaussian)、GAM(Inverse.Gaussian)、GLM、一元一次回归及一元二次回归 5 种模型对 eDNA 降解与时间之间的关系关系的适用性,发现用 GAM(Gaussian)模型拟合 eDNA 降解与时间之间的关系曲线 AIC 值最小(AIC=472.0694)(表 1),同时,其相关系数 R^2 也最高($R^2=0.984$)(图 3),说明 GAM(Gaussian)模型能更好反映 eDNA 的降解与时间之间的关系。

表 1 基于 AIC 值对模型的选择
Tab.1 The choice of model based on AIC value

项目 Items	GAM (gaussian)	GAM (inverse.gaussian)	GLM	一元一次 Linear	一元二次 Quadratic
AIC	472.0694	497.6066	518.5996	518.5996	491.4329
R^2	0.984	0.977	0.8969	0.8969	0.9635
Deviance explained	98.9%	96.6%	—	—	—

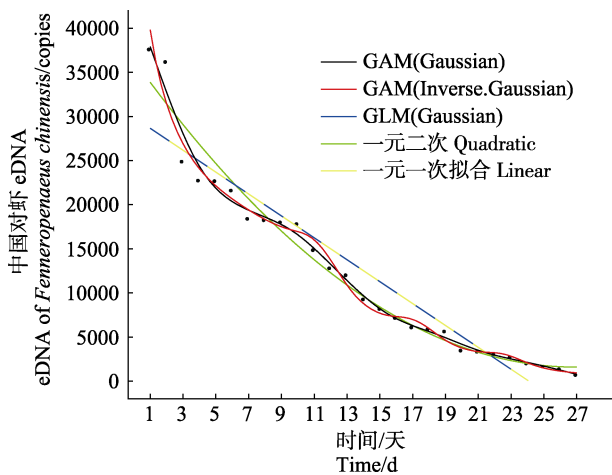


图3 中国对虾 eDNA 降解与时间之间的关系拟合
Fig.3 Relationship fitting between degradation of eDNA and time in *Fenneropenaeus chinensis*

3 讨论

eDNA 的检出率主要取决于释放速率与降解速率,同时,目标种群数量的大小对 eDNA 的检出率也有一定的影响。此外,除了不可控的自然因素外,一些人为因素也对 eDNA 检出率的高低有不可忽视的影响。eDNA 从生物体释放进入水环境后,可能会持续存在,吸附在有机或者无机颗粒上成为沉积物,

或者在水环境中逐渐被降解(Levy-Booth *et al*, 2007),影响其降解的因素主要有核酸酶、温度、pH、紫外光照、水化学及微生物的活动等一系列生物与非生物因素(Barnes *et al*, 2014; Strickler *et al*, 2015; Tsuji *et al*, 2016)。

3.1 长片段 eDNA 与短片段 eDNA 在研究中的区别

eDNA 由释放源进入水环境后,随着时间的变化,一般经过由大片段逐渐分解为小片段直至降解的过程,在这个过程中,根据其环境条件的不同,eDNA 在不同环境因子的影响下被加速降解。片段大小为 300~400 bp 的 eDNA 在人为实验控制的条件下能够在水体中持续存在 7 d (Zhu, 2006; Dejean *et al*, 2011),7 d 后仍能检测到的 eDNA 则为 ≤ 100 bp 左右的短片段 DNA。本研究采用实时荧光定量 PCR (TaqMan 法)扩增了一段目的片段大小为 106 bp 的短片段 eDNA,检测了短片段 eDNA 在水体中滞留时间的长短,结果发现,较长片段 eDNA 而言,短片段 eDNA 在水体存留的时间要长很多,其完全降解至少需要 30 d,但是,长片段 eDNA 能够更加准确地反映最新的生物信息(Hänfling *et al*, 2016; Bista *et al*, 2017)。同时,这也反映出研究者应该针对自己的最终目的设计实验,扩增符合需求的 eDNA 片段,以达到最佳的研究效果。Jo 等(2017)设计了 1 对能够扩增

719 bp 的长片段 eDNA 的引物与 1 对能够扩增 127 bp 的短片段 eDNA 的引物, 分别应用实时荧光定量 PCR 对竹筴鱼(*Trachurus japonicus*)进行了生物量估测及分布监测, 表明扩增长片段的 eDNA 能够更加精确地评估生物量以及对物种分布做出准确判断。根据长短片段 eDNA 在水体中滞留时间的不同, 建议在利用 eDNA 技术进行生物量评估与物种时空动态分布监测时, 设计能够扩增长片段 eDNA 的引物以扩增来自于生物体最新释放进入水体的 DNA, 而不是长期滞留于水体中的 DNA, 以避免 2 个资源调查周期之间短片段 eDNA 的累积效果所导致的实验误差。

3.2 不同物种释放的 eDNA 在水体中存留时间的区别

一般而言, 水生动物释放的 eDNA 在水体的存留时间为 7~30 d, 但不同的生物种类的生活史特征不同, 释放 eDNA 的速率不同(Minamoto *et al.*, 2017), 释放 eDNA 量的多少与 eDNA 片段的大小也各不相同(Geerts *et al.*, 2018)。因此, 对不同的物种而言, 其释放的 DNA 在环境中的存留时间也不同。Thomsen 等(2012)研究发现, 在饲养锄足蟾(*Pelobates fuscus*)和冠北螈(*Triturus cristatus*)时, 养殖水体中 eDNA 的量随时间不断增加, 但将其移除后, 水体中 eDNA 的量快速下降, 7~14 d 后, eDNA 完全降解; 而 Goldberg 等(2013)以淡水螺(*Potamopyrgus antipodarum*)为研究对象, 在 15℃ 恒温条件下饲养淡水螺一段时间后将将其移除, 发现其释放到水体中的 DNA 能够在环境中存留 14~42 d。本研究与前人的研究相比, 中国对虾所释放的 eDNA 在水体中的存留时间较长, 主要是因为甲壳类的整个生活史过程中存在蜕皮现象, 因而其释放到水中的 eDNA 的量较大。此外, 本研究所取水样的养殖池中的中国对虾密度较大, 是 eDNA 在水体中存留时间较长的原因之一。

3.3 环境因子对 eDNA 存留时间的影响

除了物种本身生活史差异性造成的存留时间不同外, 环境因子的变动也会导致 eDNA 在水体中存留时间的差异。已有研究表明, 温度与 eDNA 的降解速率呈正相关关系(Strickler *et al.*, 2015; Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016)。Strickler 等(2015)研究了美国牛蛙(*Lithobates catesbeianus*)释放到水体中的 eDNA 分别在 5℃、25℃ 和 30℃ 的条件下的降解情况, 发现当环境中 eDNA 的量相同时, 5℃ 时 eDNA 的降解最缓慢, 主要因为低温条件下微生物的生长过程较为缓慢, 降低了有关生命活动导致的 eDNA 的降解。本研究所用水体是在冬天室温(15℃)的情况下保存的, 与

夏季相比, eDNA 的降解速率较为缓慢。因此, 对于自然水体而言, 随着季节的交替变化, 水温发生变化, 其水环境中的 eDNA 的降解速率也发生变化。此外, 研究表明, pH、紫外辐射以及水化学对 eDNA 的降解也存在一定的影响(Pilliod *et al.*, 2013; Barnes *et al.*, 2014; Eichmiller *et al.*, 2014、2016a、b)。但是, 以上环境因子共同作用时如何影响 eDNA 的降解尚不清楚。未来在应用 eDNA 技术准确评估目标种生物量之前, 解决上述环境因子对 eDNA 降解的影响机制至关重要。

4 小结

通过检测 eDNA 在水体中的存留时间发现, 短片段 eDNA 在水环境中能够存留长达 30 d 左右, 可以据此来合理设计实验方案、确定合适的采样周期以及寻求妥善的 eDNA 存储方法, 从而为 eDNA 技术更有力地应用到水生生态系统的研究领域奠定基础。

致谢: 衷心感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所水产动物遗传育种中心陈宝龙老师与课题组项目聘用人员王惠宾在取样方面给予的建议与帮助!

参 考 文 献

- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(3): 1819
- Bista I, Carvalho GR, Walsh K, *et al.* Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications*, 2017, 8: 14087
- Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 2014, 29(6): 358–367
- Burnham KP. Information and likelihood theory: A basis for model selection and inference//Model selection and multimodel inference. Springer New York, 2002, 49–97
- Davison PI, Copp GH, Créach V, *et al.* Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *Science of Nature*, 2017, 104(3-4): 35
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398
- Drummond AJ, Newcomb RD, Buckley TR, *et al.* Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment. *GigaScience*, 2015, 4(1): 46
- Dudgeon D. Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: Linking ecosystem structure and function. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2010, 2(5-6): 422–430
- Eichmiller JJ, Bajer PG, Sorensen PW. The relationship between

- the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112611
- Eichmiller JJ, Best SE, Sorensen PW. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental Science and Technology*, 2016a, 50(4): 1859–1867
- Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 2016b, 16(1): 56–68
- Evans NT, Lamberti GA. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 2018, 197: 60–66
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Geerts AN, Boets P, Heede SVD, *et al.* A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 2018, 84: 564–572
- Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, *et al.* Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 2013, 32(3): 9
- Goldberg CS, Strickler KM, Pilliod DS. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 2015, 183: 1–3
- Hänfling B, Lawson HL, Read DS, *et al.* Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101–3119
- Jin XS, Dou SZ, Shan XJ, *et al.* Hot spots of frontiers in the research of sustainable yield of Chinese inshore fishery. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 124–131 [金显仕, 窦硕增, 单秀娟, 等. 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的重点问题. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 124–131]
- Jo T, Murakami H, Masuda R, *et al.* Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(6): 1–9
- Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401–1414
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, *et al.* Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(12): 2977–2991
- Mackenzie DI, Nichols JD, Sutton N, *et al.* Improving inferences in population studies of rare species that are detected imperfectly. *Ecology*, 2005, 86(5): 1101–1113
- Majaneva M, Diserud OH, Eagle SHC, *et al.* Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4682
- Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara KR, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173073
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arklorbert S, *et al.* Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8): 1123–1130
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 14(1): 109–116
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168–176
- Shan XJ, Li M, Wang WJ. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23–29 [单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境 DNA (eDNA) 技术在水生生态系统中的应用研究进展. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23–29]
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Bach SS, *et al.* Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology and Evolution*, 2016, 1(1): 4
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, *et al.* Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128
- Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85–92
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565–2573
- Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4–18
- Tillotson MD, Kelly RP, Duda JJ, *et al.* Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 2018, 220: 1–11
- Tsuji S, Yamanaka H, Minamoto T. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, 2016, 18(1): 1–7
- Wickham H. *ggplot2*. Springer New York, 2009
- Yamanaka H, Minamoto T. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 2016, 62(1): 147–153
- Zhu B. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Research*, 2006, 40(17): 3231–3238

Studying the Retention Time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in Water

LI Miao^{1,3}, SHAN Xiujuan^{1,2}①, WANG Weiji^{1,2}, DING Xiaosong^{1,3},
DAI Fangqun^{1,2}, LÜ Ding¹, WU Huanhuan¹

(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; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;
3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Accurate knowledge of species distribution and population dynamics is the basis of conservation biology. However, for certain species that have a special life history and very few populations, species distribution detection becomes extremely difficult. The combination of DNA barcode technology and environmental DNA (eDNA) has solved these difficulties. Currently, this method has been applied successfully to biological testing, biodiversity assessment, biomass assessment, fish migration, and other research. Given the ease of degradation of eDNA and its low level in the environment, exploring its persistence in the environment is critical for accurate qualitative and quantitative analysis. In this study, *Fenneropenaeus chinensis* was used as the research subject. The degradation of eDNA in a water environment was quantitatively analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The relationship between eDNA degradation rate and time was explored. The most suitable eDNA was selected based on Akaike Information Criterion (AIC). A statistical model of degradation of eDNA over time was used. The experimental results showed that the level of eDNA in water is negatively correlated with time. After the source of eDNA was removed, its residence time in the environment was about one month. The aim of this research was to provide a theoretical basis for the qualitative detection and quantitative assessment of rationally planned species, with a view to minimizing experimental error caused by human factors.

Key words Environmental DNA; Retention time; *Fenneropenaeus chinensis*

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181011001

http://www.yykxjz.cn/

唐隆晨, 钟晨辉, 林琪, 陆振, 黄瑞芳, 宦忠艳. 海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 58–65

Tang LC, Zhong CH, Lin Q, Lu Z, Huang RF, Huan ZY. Comparative study on the community structure of epiphytic bacteria in sporophyte and gametophyte stages of kelp *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 58–65

海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较*

唐隆晨 钟晨辉 林琪^① 陆振 黄瑞芳 宦忠艳

(福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 厦门 361000)



摘要 为探究海带(*Saccharina japonica*)生活史孢子体、配子体不同阶段的附生菌群落结构的差异, 采用 Illumina 测序技术, 分析了种海带(S1)、配子体(S2)、幼孢子体(S3)和大孢子体(S4)这 4 个不同阶段的藻体上附生菌 16S rRNA 序列, 研究其附生菌群落结构。结果显示, 4 个阶段共识别出 23 门 156 属共 244 个操作分类单元(OTU)。从门分类上来说, 变形菌门(Proteobacteria)在海带各阶段中均表现出较高的丰度, 在 S1、S2、S3 和 S4 藻体样本中相对丰度分别达 53.0%、94.3%、77.2% 和 36.7%, 蓝细菌门(Cyanobacteria)只在 S4 藻体样本中表现出较高的丰度, 为 43.8%; 从属分类上来说, 假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)在各样本间差异较大, S2、S3 和 S4 样本中相对丰度分别为 65.00%、44.88% 和 25.57%, 但在 S1 样本中仅为 0.18%。各样品间附生菌群落结构差异较大, S1 与 S4 样本相邻聚为一支, S2 与 S3 样本为另一支。S2 样本的菌群种类单一且分布不均匀, S1、S3 与 S4 样本细菌种类丰富, 但 S4 样本中菌群间的丰度差异较大。海带的苗种繁育阶段(S2 和 S3)存在褐藻酸降解菌丰度增加的趋势, 孢子体阶段(S4)则具有高丰度的共生型蓝细菌。

关键词 海带; 附生菌; 16S rRNA; 褐藻酸降解菌; 蓝细菌门

中图分类号 S946.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0058-08

海藻与细菌间关系复杂, 既相互利用(Berg *et al.*, 2002; Hodson *et al.*, 2007; Amin *et al.*, 2015), 又相互制约(Manage *et al.*, 2001; 林伟等, 2000)。有相当一部分的海洋藻类在合成生长所必需的维生素 B₁₂ 时, 需要通过细菌提供一种辅酶(Croft *et al.*, 2005), 但在海洋环境中某些营养物质缺乏时, 细菌又会成为藻类的营养竞争者, 进而抑制藻类生长(Rier *et al.*, 2002)。大型海藻与附生菌之间的关系平衡对于大型海藻的健康生长至关重要, 平衡一旦被打破, 会影响到海藻的正常生长发育, 有时也会产生病害(沈梅丽等, 2013)。

人工养殖的海带表面附生的褐藻酸降解菌, 在水温升高或海带养殖密度过高时大量繁殖, 造成海带发生腐烂(陈騫等, 1979、1981、1984)。因此, 分析海带附生菌的群落结构, 对防止海带病害的发生, 确保产量具有重要的意义。

海带主要用于食品、保健品、工业原料及生物饵料等(张杰, 2016), 其生活史由大型叶状孢子体(2*n*)和微型丝状配子体(*n*)组成(李静, 2015)。弧菌属(*Vibrio*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等被发现

* 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-50)、福建省种业创新与产业化工程项目(2017FJSCZY01)和厦门南方海洋研究中心项目(15GZY021NF04)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50), Seed Industry Innovation and Industrialization Project of Fujian Province (2017FJSCZY01), and Southern Oceanographic Center Project of Xiamen (15GZY021NF04)]. 唐隆晨, E-mail: 350060372@qq.com

① 通讯作者: 林琪, E-mail: xmqlin@sina.com

收稿日期: 2018-10-11, 收修改稿日期: 2018-10-26

存在于海带表面, 部分种类与海带病烂有关, 不同海域的海带附生菌群结构存在差异(Duan *et al*, 1995; Wang *et al*, 2008; Sun *et al*, 2017; Wang *et al*, 2017)。近年来, 随着二代测序技术应用于海洋微生物群落分析, 可有效、快捷地进行其分型和丰度分析(孙超等, 2014; 李俊峰, 2015; 刘文亮等, 2017)。本研究基于第二代测序技术, 研究海带孢子体、配子体附生菌的群落结构, 旨在为海带苗种繁育与养殖提供监测数据, 也为海带病害的预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验样本采集和前处理

海带样本为福建传统养殖品系, 2016 年 4 月采自福建霞浦县下浒镇池澳村的海带养殖筏架, 并于室内留种室培养至孢子囊成熟(图 1a)。雌、雄配子体由种海带放散游孢子后获得, 分离并保存于实验室内(图 1b)。海带幼孢子体由雌配子体卵细胞与雄配子体放散的精子经过受精作用产生(图 1c)。养殖区海带大孢子体是由幼孢子体下海养殖至次年 4 月的厚成期健康叶状体(图 1d)。各生活史阶段的样本及处理方法

如表 1 所示, 除配子体用无菌海水保存外, 其余样本处理前均经灭菌海水清洗数遍去除表面杂质。

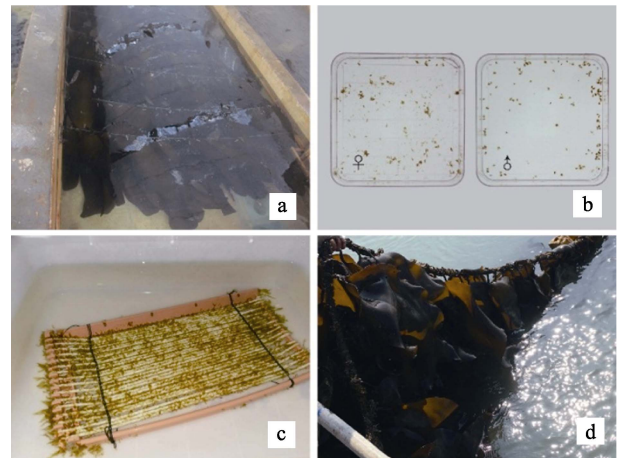


图 1 不同生活史阶段的藻体样本
Fig.1 Samples collected in deferent growth environment

A、B、C 和 D 分别为种海带(S1)、配子体(S2)、幼孢子体(S3)和大孢子体(S4)
A, B, C, and D showing the samples of mature sporophytes (S1), gametophytes (S2), sporelings (S3) and big sporophytes (S4), respectively

表 1 样本类型、来源、环境温度及前处理方法

Tab.1 The types, source, environmental temperature and pre-processing methods of samples

编号 Sample ID	样本类型 Type	来源 Source	环境温度 Environmental temperature (°C)	前处理方法 Pre-processing methods
S1	种海带 Mature leafy sporophytes	海带留种室 Conservation room for mature sporophytes	10	切取中带部边长 3 cm 正方形小块, 液氮速冻后于-80°C 保存备用
S2	配子体 Filamentous gametophytes	配子体保种室 Conservation room for gametophyte germplasm	10	用无菌滤布收集藻体样本, 液氮速冻后于-80°C 保存备用
S3	幼孢子体 Sporelings	海带育苗室 Hatchery room for young sporophytes	10	待海带育苗片上的幼孢子体长至 2~3 cm 时, 刮取并用无菌滤布收集, 液氮速冻后于-80°C 保存备用
S4	大孢子体 Big leafy sporophytes	养殖海区 Aquaculture area for big sporophytes	19	切取中带部边长 3 cm 正方形小块, 液氮速冻后于-80°C 保存备用

1.2 DNA 提取、序列扩增和测序

按照基因组 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)说明书要求, 提取保存的海带基因组 DNA, 以制备基因组 DNA 为模板, 使用 16S rRNA 通用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增目标 DNA 片段(Xu *et al*, 2016)。使用低循环数扩增, 并保证每

个样本扩增的循环数一致。20 μl PCR 扩增体系的反应条件: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 27 个循环; 72°C 后延伸 10 min。每个样本设 3 个生物学重复, 将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测

后,收集、纯化,在上海美吉生物医药科技有限公司进行测序分析。

1.3 数据分析

用 Mothur 软件和 Excel 软件进行数据统计与分析。以 97%相似性为标准划分操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,统计各样本的群落组成,并基于 OTU 结果计算样品的 Alpha 多样性,包括香农指数 (Shannon index)、辛普森指数 (Simpson index)、物种丰富度指数 (Abundance based coverage, ACE) 等 (许燕等, 2018)。

2 结果

2.1 PCR 产物质量检测

用海带制备基因组 DNA,以 16S rRNA 通用引物扩增后,PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示,条带清晰明亮,可用于后续的测序分析。

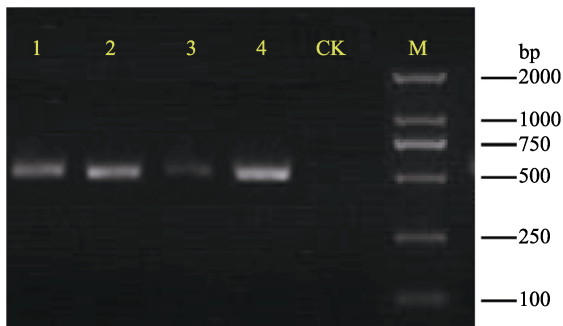


图 2 PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.2 The results of PCR products examined by 2% agarose electrophoresis

1、2、3 和 4: S1、S2、S3 和 S4 样本;

CK: 空白对照组; M: Marker 2000

1, 2, 3, and 4: S1, S2, S3, and S4 samples, respectively;

CK: Control check; M: 2000 DL Marker

2.2 测序深度和测序覆盖度

海带 4 个样本经高通量测序及序列优化后,共获得 156950 条有效序列,平均长度为 442 bp,绝大部分的有效序列长度为 421~460 bp,占 99.96%。各样本合计识别出 244 种 OTU,对测序覆盖度进行统计,结果显示,各样本 OTU 观察数已达到饱和 (Good's coverage > 0.999),该测序深度能够较全面地反映海带

在不同生活史阶段附生菌的生物群落结构 (表 2)。

表 2 各样本测序结果统计

Tab.2 Statistics of the sequencing results of samples

样品代码 Sample ID	顺序 Sequence	平均长度 Average length	操作分类单元 OTU	覆盖 Coverage
S1	33038	441.95	131	0.999410
S2	37513	444.50	61	0.999850
S3	43532	443.00	178	0.999516
S4	42867	438.97	161	0.999484

2.3 附生菌群落结构组成及相对丰度

将海带 4 种孢子体、配子体样本的 16S rRNA 测序结果,与 Silva 数据库上的参考序列比对注释,统计不同 OTU 所对应的门、属及其相对丰度,共识别出 23 门 156 属。其中,变形菌门 (Proteobacteria) 在各生活史阶段的群落中均占据优势,在 S1、S2、S3 和 S4 样本中分别占 53%、94.3%、77.2% 和 36.7% (表 3),而拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 及疣微菌门 (Verrucomicrobia) 在整个群落结构中的比例,在海带孢子体、配子体中有较大差异。S1 样本中拟杆菌门占 40.0%,S4 样本中则只有 1.9%;蓝细菌门和疣微菌门在 S4 样本中分别占 43.8% 和 16.5%,但在 S2 样本中并没有识别出来。除了这 4 个相对丰度较高的细菌门类以外,酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 等多种门类的细菌也被识别到,但相对丰度极低。

表 3 海带不同生活史阶段附生菌中优势细菌门类及相对丰度

Tab.3 Dominant bacterial phyla and the relative abundance of bacterial communities at different stages of life cycle in *Saccharina japonica*

门类	Phyla	S1	S2	S3	S4
变形菌门	Proteobacteria	53.0	94.3	77.2	36.7
拟杆菌门	Bacteroidetes	40.0	5.3	15.7	1.9
蓝细菌门	Cyanobacteria	3.4	0.0	0.7	43.8
疣微菌门	Verrucomicrobia	2.5	0.0	6.2	16.5
其他	Others	1.2	0.4	0.3	1.0

在属水平上对各样本附生菌群落结构及相对丰度进行统计分析 (图 3),结果显示,4 个样本间的附生菌群落结构及相对丰度存在较大差异。在 S1 样本中,细菌属类丰富,并未存在绝对优势的细菌属,丰度最高的为科尔韦尔氏菌属 (*Colwellia*),占 21.28%,其次是黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 中的未鉴定属,为

19.37%, 而有 16 个属的细菌丰度在 1%~10%之间, 假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的相对丰度为 0.18%; S2 样本附生菌种类相对单一, 假交替单胞菌属以 65.00%的相对丰度占据了绝对优势, 其次为 *Roseovarius* 属, 占 10.32%, 剩下各属中只有 6 个的相对丰度>1%; 在 S3 样本中, 假交替单胞菌属依然为优势群体, 占 44.88%, 其次为多毛杆菌属(*Polaribacter*), 为 8.71%, 其余各属中有 12 个类群相对丰度在 1%~10%之间。S4 样本, 蓝细菌中的未分类属为优势类群, 占 43.80%, 其次为假交替单胞菌属, 为 25.57%, 之后为 *Persicirhabdus* 属, 占 16.49%, 其余各属中只有 3 个属的相对丰度超过 1%。

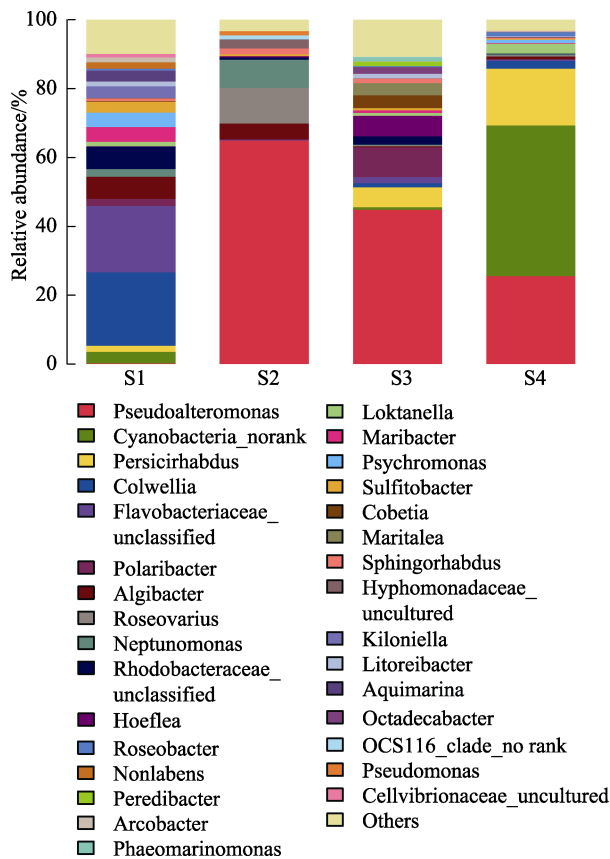


图 3 海带不同生活史阶段附生菌中属水平种群结构及相对丰度

Fig.3 Bacterial communities and relative abundance of bacterial communities at the genus level during the different stages of life cycle in *Saccharina japonica*

2.4 海带孢子体、配子体阶段附生菌群落的多样性、相关性及其主成分分析

为探究海带不同生活史阶段附生菌群落结构丰富度和多样性的差异, 基于测序数据, 统计了 ACE、Chao、Shannon 和 Simpson 指数(表 4)。结果显示,

在 S1 与 S3 样本中, 无论是物种丰富度还是物种多样性, 均呈现出较高的水平, S1 样本代表物种丰富度的 ACE 和 Chao 指数分别为 164 和 145, 代表物种多样性的 Shannon 和 Simpson 指数分别为 3.35 和 0.058; S3 样本中这 4 个指数分别为 190、189、2.81 和 0.194。S2 样本物种丰富度和多样性则相对较低, 其 ACE、Chao、Shannon 和 Simpson 指数分别为 64、63、1.65 和 0.378; 在 S4 样本中, 代表物种丰富度的 ACE 和 Chao 指数均较大, 分别为 172 与 172, 然而, 代表物种多样性的 Shannon 和 Simpson 指数则表现为 Shannon 指数较小(1.9)、Simpson 指数较大(0.271), 呈现出菌群种类丰富但菌种间分布上的不均匀性。

表 4 海带不同生活史阶段附生菌群落的 Alpha 多样性
Tab.4 Alpha diversity of bacterial communities during different life stages in *Saccharina japonica*

Sample ID	Ace	Chao	Shannon	Simpson
S1	164	145	3.35	0.058
S2	64	63	1.65	0.378
S3	190	189	2.81	0.194
S4	172	172	1.9	0.271

进一步筛选各样品中相对丰度大于 1%的 31 个属所包含的 62 个 OTU, 构建了包含样本聚类关系树的热图。如图 4 所示, 不同的颜色代表不同的相对丰度, 顶端为样本聚类关系树。S1 与 S4 样本聚为一类, S2 和 S3 样本聚为一类。同时, 根据 OTU 组成, 对各样本间附生菌群落差异和距离进行主成分分析, 结果如图 5 所示。PC1 轴对样本的贡献率为 54.32%, PC2 轴对样本的贡献率为 26.36%, 4 个样本分别落在图中 4 个不同的象限上, 各样品间表现出较大的差异性。

选取各样本 OTU 的并集, 根据样本间附生菌群落结构多样性的相互关系, 绘制 Venn 图(图 6)。结果显示, 在这 4 个样品中, 分别有 131、61、178 和 161 个 OTU 被识别出来, 配子体阶段样本要少于孢子体阶段样本。其中, 有 22 个 OTU 在 4 个样品中均存在, 并分别占各样品 OTU 总数的 16.8%、36.1%、12.4% 和 13.7%。在孢子体阶段(S1、S3 和 S4), 有 52 个 OTU 普遍存在, 分别占到 S1、S3 和 S4 样本中 OTU 总数的 39.7%、29.2%和 32.3%, 且在配子体(S2)样本中未被检测到; 5 个 OTU 为配子体阶段特有, 占 S2 样本中 OTU 总数的 8.2%。

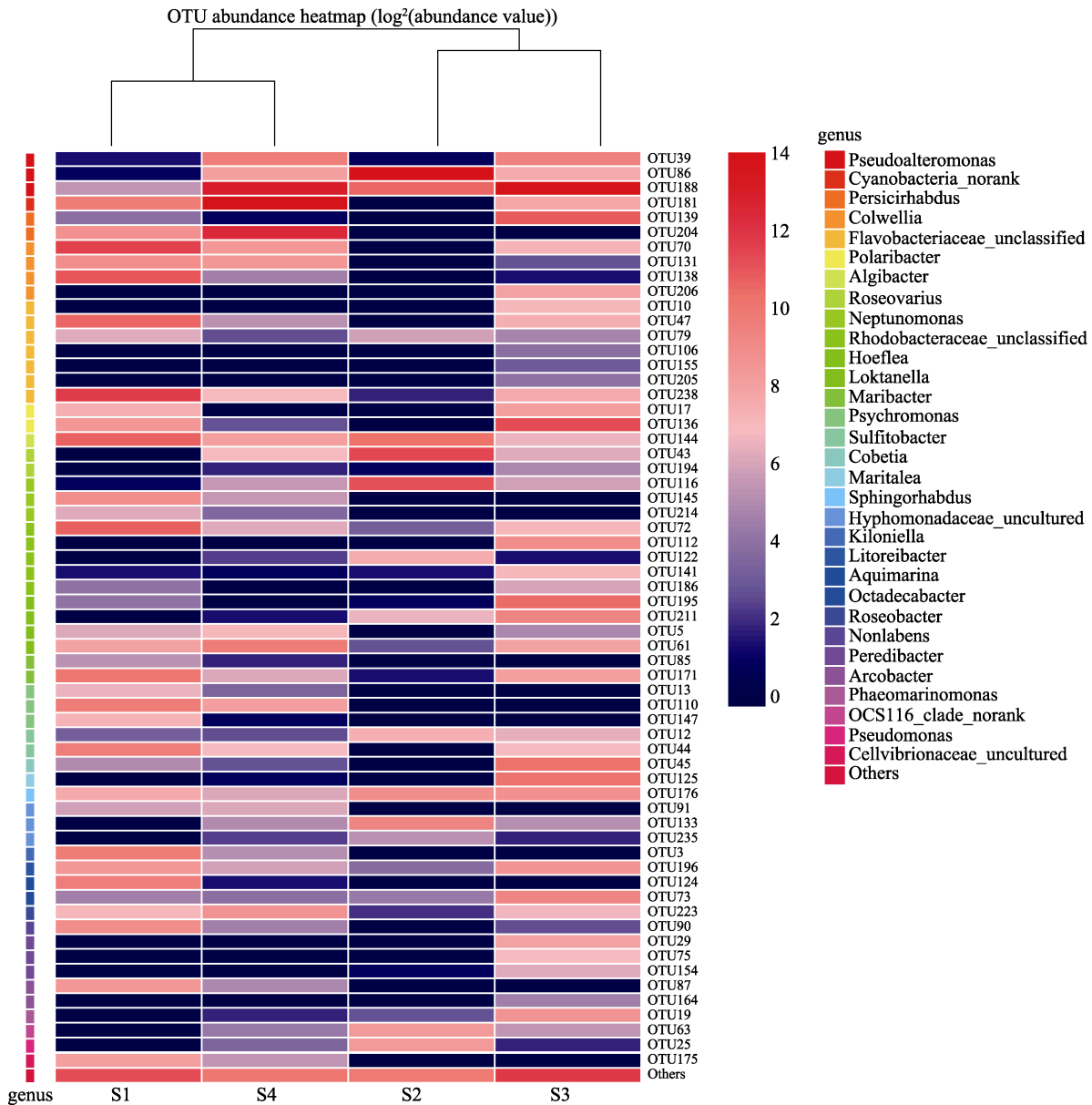


图 4 各样品中相对丰度高于 1% 的属的 OTU 分布热图

Fig.4 Heatmap analysis of the OTUs that belong to the genus with relative abundance over 1% in samples

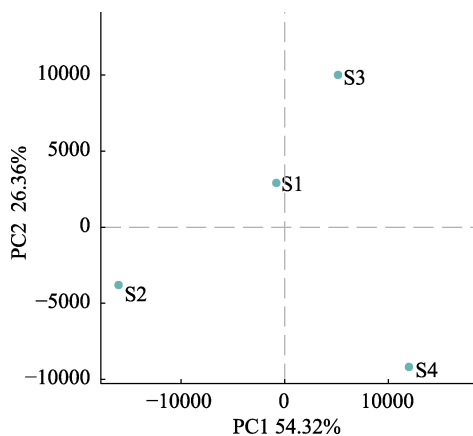


图 5 不同样本的主成分分析

Fig.5 Sorting analysis of different samples

3 讨论

本研究针对海带、配子体、幼孢子体及大孢子体 4 个不同阶段样本，进行附生菌群落结构分析，证实海带生活史的不同阶段，附生菌群落结构有一定差异。变形菌门在种海带、配子体、幼孢子体的时候均占主导地位，表现出超过 50% 的丰度，但在大孢子体中，丰度最高的则是蓝细菌门。在配子体中，细菌种类少且属间分布不均匀，这可能与海带配子体在低温、低光强及封闭培养条件下有关，种海带、幼孢子体和大孢子体则处于开放的海水环境，表现出丰富的细菌种类。但养殖条件下的大孢子体的附生菌群多样性水平较低。

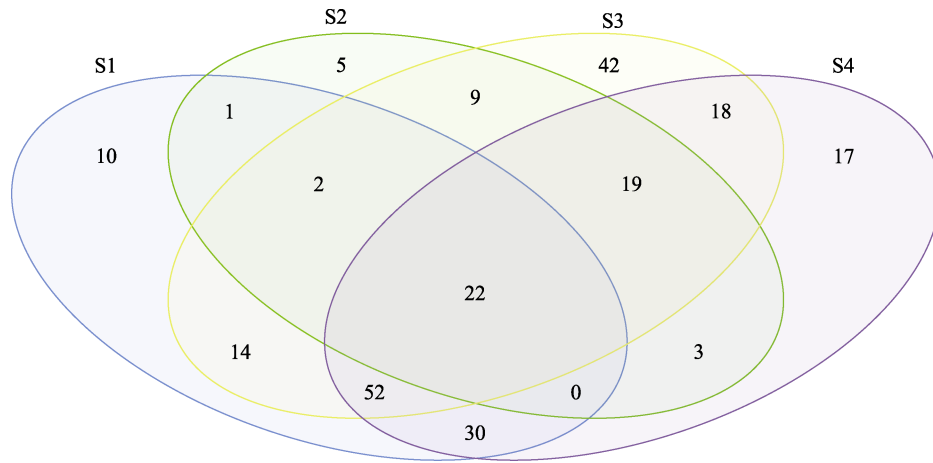


图 6 各样品中附生菌多样性的相关性分析

Fig.6 The similarity analysis of bacteria diversity among different samples

褐藻酸降解菌是一类在海带养殖过程中广泛分布于养殖水体及藻体表面的具有降解褐藻酸能力的细菌, 主要有假交替单胞菌属、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、糖噬胞菌 (*Saccharophagus*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 中的许多种类 (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008; 侯士昌等, 2014; 傅晓妍等, 2007)。这些褐藻酸降解菌是条件致病菌, 通常情况下并不引起病害, 但若养殖环境恶化, 细菌侵入并大量繁殖, 则可致病 (陈騫等, 1981)。本研究中, 假交替单胞菌属相对丰度高, 且在不同生活史阶段差异极大。配子体阶段与幼孢子体阶段其相对丰度分别为 65.00% 和 44.88%, 海区养殖的大孢子体中, 其相对丰度为 25.57%, 而在种海带阶段, 则只有 0.18%, 这可能与种海带入库前经清洗并切除常发病害的梢部和边缘部而只保留中带部有关。幼孢子体阶段是海带夏苗培育的关键期, 苗过密、高温等均能引发假交替单胞菌属的大量繁殖, 从而导致烂苗、掉苗等 (陈騫等, 1984)。因此, 严格挑选、处理种海带, 处理育苗冷水, 控制育苗密度, 及时清理脱落幼孢子体, 对减少育苗中有害细菌的大量增殖具有重要意义。

本研究中, 蓝细菌门仅检测到一个未知种类的 OTU 信息。这个 OTU 在配子体阶段未被检测到, 幼孢子体时期开始出现一定的丰度, 海区养殖大孢子体的相对丰度很高, 并成为优势菌群, 而进入成熟期形成种海带后, 丰度又逐渐降低。推测该 OTU 的相对丰度在各生活史阶段可能与海带的生物量积累速度有关联。在种海带与大孢子体中, 该 OTU 相对丰度差异很大, 且在配子体阶段并未检测到丰度, 该 OTU 信息很有可能来自于某种未知的共生型蓝细菌, 且在较低的温度条件下, 其生长会受到抑制 (Gerard *et al.*,

1990)。这里所检测出的蓝细菌门种类在与海带的共生关系中究竟起着怎样的作用, 有待深入研究。

参 考 文 献

- Amin SA, Hmelo LR, Vantol HM, *et al.* Interaction and signaling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*, 2015, 522(7554): 98–101
- Berg GM, Repeta DJ, Laroche J. Dissolved organic nitrogen hydrolysis rates in axenic cultures of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae) comparison with heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 401–404
- Chen D, Lin GH, Shen SZ. Studies on alginic acid decomposing bacteria I. Action of alginic acid decomposing bacteria and alginase on *Laminaria japonica*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1979, 10(4): 329–333, 402 [陈騫, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用. *海洋与湖沼*, 1979, 10(4): 329–333, 402]
- Chen D, Lin GH, Shen SZ. Studies on alginic acid decomposing bacteria II. Rot disease of *Laminaria* summer sporelings caused by alginic acid decomposing bacteria. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1981, 12(2): 133–137 [陈騫, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 II. 海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系. *海洋与湖沼*, 1981, 12(2): 133–137]
- Chen D, Liu XY, Liu XZ, *et al.* Studies on alginic acid decomposing bacteria III. The cause of the rot disease and detaching of *Laminaria* sporophytes in sporeling culture stations and their preventive measures. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1984, 15(6): 581–589 [陈騫, 刘秀云, 刘秀珍, 等. 褐藻酸降解菌的研究 III 海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施. *海洋与湖沼*, 1984, 15(6): 581–589]
- Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, *et al.* Algae acquire

- vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 2005, 438(7064): 90–93
- Duan D, Xu L, Fei X, *et al.* Marine organisms attached to seaweed surfaces in Jiaozhou Bay, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, 11(3): 351–352
- Fu XY, Li JB, Han F, *et al.* Studies on *Vibrio* sp. QY102 fermentation processes for alginate lyase production. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2007, 37(3): 432–436 [傅晓妍, 李京宝, 韩峰, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌 *Vibrio* sp. QY102 的发酵条件优化. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(3): 432–436]
- Gerard VA, Dunham SE, Rosenberg G. Nitrogen-fixation by cyanobacteria associated with *Codium fragile* (Chlorophyta): Environmental effects and transfer of fixed nitrogen. *Marine Biology*, 1990, 105(1): 1–8
- Hodson M, Crofte E, Deery A, *et al.* Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 146(4): 215–223
- Hou SC, Wen SH, Tang ZH, *et al.* The screening, identification of alginate degrading bacteria and optimization of fermentation conditions. *Marine Sciences*, 2014, 38(7): 20–26 [侯士昌, 温少红, 唐志红, 等. 一株高效褐藻胶降解菌的筛选、鉴定及其发酵条件的优化. 海洋科学, 2014, 38(7): 20–26]
- Li J. Basic and applied study on reproduction biology of the economic seaweeds *Saccharina japonica*, *Undaria pinnatifida* and *Sargassum horneri*. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2015 [李静. 海带、裙带菜和铜藻的基础繁育生物学研究及产业化应用. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2015]
- Li JF. Microbial diversity research based on high-throughput sequencing data of 16S rRNA and metagenome. Master's Thesis of Tsinghua University, 2015 [李俊锋. 基于 16S rRNA 和宏基因组高通量测序的微生物多样性研究. 清华大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Li JW, Dong S, Song J, *et al.* Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Marine Drugs*, 2011, 9(1): 109–123
- Lin W, Chen Y, Liu XY. Marine microalgal axenation and comparison of growth characteristics between natural and axenic marine microalgae. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(6): 647–652 [林伟, 陈馥, 刘秀云. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点的比较. 海洋与湖沼, 2000, 31(6): 647–652]
- Liu WL, Xu H, Tang Y, *et al.* The effect of diet with *Bacillus cereus* biofilm on the growth rate, disease resistance and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 87–95 [刘文亮, 许华, 唐杨, 等. 饲料中补充蜡芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 87–95]
- Manage PM, Kawabata Z, Nakano S. Dynamics of cyanophage-like particles and algicidal bacteria causing *Microcystis aeruginosa* mortality. *Limnology*, 2001, 2(2): 73–78
- Rier ST, Stevenson RJ. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients [2pt] on the relationship between algae and heterotrophic bacteria instream periphyton. *Hydrobiologia*, 2002, 489(1): 179–184
- Shen ML, Yang R, Luo QJ, *et al.* Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087–1102 [沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性. 微生物学报, 2013, 53(10): 1087–1102]
- Sun C, Zhu L, Mao YZ, *et al.* The structures of sediment microbial communities in different mariculture models at Xiangshan Bay of China. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 13–21 [孙超, 朱玲, 毛玉泽, 等. 象山港南沙岛不同养殖模式沉积物微生物群落结构分析. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 13–21]
- Sun PH, Qian K, Li XL, *et al.* Characterization of bacterial community structure on surface of kelp *Saccharina japonica* by high-throughput sequencing. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(1): 7–12 [孙丕海, 钱坤, 李晓丽, 等. 基于高通量测序分析海带表面细菌群落结构. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 7–12]
- Wang GG, Shuai L, Li Y, *et al.* Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(4): 403–409
- Wang WW, Wang N, Zhang ZZ, *et al.* Quantity and composition of alginic acid decomposing bacterial community in summer seedling system of kelp *Saccharina japonica*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(1): 26–32 [王伟伟, 王娜, 张壮志, 等. 海带夏季育苗系统褐藻酸降解菌数量组成分析. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 26–32]
- Xu N, Tan GC, Wang HY, *et al.* Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbialbiomass and bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 1–8
- Xu Y, Wang YG, Zhang Z, *et al.* Variance analysis of bacterial community in the intestine of cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 388–398 [许燕, 王印庚, 张正, 等. 不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群的结构差异. 水产学报, 2018, 42(3): 388–398]
- Zhang J. Population genetics and phylogeography of *Saccharina japonica* in Northwestern Pacific Ocean. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2016 [张杰. 西北太平洋地区海带种群遗传及分子系统地理学研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2016]

Comparative Study on the Community Structure of Epiphytic Bacteria in Sporophyte and Gametophyte Stages of Kelp *Saccharina japonica*

TANG Longchen, ZHONG Chenhui, LIN Qi^①, LU Zhen, HUANG Ruifang, HUAN Zhongyan

(Fisheries Research Institute of Fujian, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361000)

Abstract To explore the community structure of epiphytic bacteria on the sporophytes and gametophytes of kelp *Saccharina japonica*, sequences of 16S rRNA of epiphytic bacteria found on the mature leafy sporophytes (S1), filamentous gametophytes (S2), sporelings (S3), and big leafy sporophytes (S4) were analyzed using Illumina sequencing technology. The results showed that 23 phyla, 156 genera, and 244 kinds of OTUs (Operational Taxonomic Units) were identified in these samples. At the phylum level, Proteobacteria showed higher abundance, with relative abundances of 53.0%, 94.3%, 77.2%, and 36.7% in S1, S2, S3, and S4 samples, respectively. Cyanobacteria showed higher abundance of 43.8% in S4 samples only. At the genus level, the relative abundances of *Pseudoalteromonas* in S2, S3, and S4 were 65.00%, 44.88%, and 25.57%, respectively, but only 0.18% in S1. The community structure of epiphytic bacteria varied greatly among samples. S1 and S4 samples were clustered together, but S2 and S3 samples were clustered in another branch. The species of the bacteria in S2 samples were single and unevenly distributed. S1, S3, and S4 samples were rich in bacteria, while the relative abundance between different bacteria in S4 samples varied greatly compared to that in other samples. This study revealed that there was an increasing trend in the abundance of alginic acid-degrading bacteria during the breeding stage of *S. japonica* (S2, and S3), and there was a high abundance of symbiotic Cyanobacteria in the big leafy sporophyte stage (S4).

Key words *Saccharina japonica*; Epiphytic bacteria; 16S rRNA; Alginic acid degrading bacteria; Cyanobacteria

① Corresponding author: LIN Qi, E-mail: xmqlin@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181112001

http://www.yykxjz.cn/

张鹏, 张龙, 陈世波, 朱建新. 养殖水电化学同步脱氮响应面优化与验证. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 66-74

Zhang P, Zhang L, Chen SB, Zhu JX. Optimization and validation of electrochemical technology for simultaneous nitrogen removal in aquaculture by using response surface methodology. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 66-74

养殖水电化学同步脱氮响应面优化与验证*



张鹏^{1,2} 张龙^{1,2} 陈世波³ 朱建新^{2①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 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 266071; 3. 青岛卓越海洋集团有限公司 青岛 266400)

摘要 本研究先通过单因子实验分析了电流密度、极板面积比、极板间距和初始 pH 对总氨氮(TAN)和硝态氮(NO₃-N)去除率的影响。采用 Design-Expert 软件中 Box-Behnken 的中心组合原则设计四因素三水平响应面实验, 考察不同影响因子对脱氮效率的影响, 并建立响应面模型优化反应条件, 最后对优化的反应条件进行验证。结果显示, 电流密度、极板面积比、极板间距和初始 pH 的变化对 TAN 去除影响不大, 在所选反应条件下, TAN 去除率均高于 80%, 但反应条件的改变显著影响硝酸盐(NO₃)的去除, NO₃去除率在 29.8%~80.9%范围内变化。响应面模型的回归系数 R² 为 0.9340, 校正系数 R² 为 0.8681, 说明该模型具有较好的准确性。NO₃去除最优反应条件: 电流密度为 25.6 mA/cm², 阴阳极板面积比为 1.6 : 1, 极板间距为 2.5 cm, 初始 pH 为 6.6, 对该反应条件下的脱氮效果展开实验验证发现, TAN 去除率为 87.3%, NO₃去除率为 81.5%。研究表明, 电化学处理可实现对 TAN 和 NO₃-N 的同步去除, 同时, 响应面模型的运用有助于优化电化学法在养殖水处理中的脱氮效率。

关键词 水产养殖; 电化学技术; 同步脱氮; 响应面分析

中图分类号 X703.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0066-09

水产养殖过程中大量投喂高蛋白饲料是保障养殖对象快速生长的关键, 而投饵产生的残饵、粪便以及生物代谢产物使水体中总氨氮(TAN)、亚硝酸盐(NO₂)等指标的快速升高(胡海燕等, 2004; 傅雪军, 2010)。传统养殖模式采用大换水的方式来降低养殖池中N污染物浓度, 而循环水养殖主要通过亚硝化菌和硝化菌将水中 TAN 和 NO₂ 转化为相对无毒的硝酸盐(NO₃) (Zhang *et al*, 2011; 朱建新等, 2014), 但水中 NO₃可逐渐积累到 ≥ 500 mg/L。在循环水养殖系统中, 高浓度的NO₃导致养殖对象生长发育迟缓、代谢紊乱、肝脾受损、死亡率增加, 同时, 含 NO₃污水的外排也对周围环境造成不良影响(Hondov *et al*,

1993; Chrisgj *et al*, 2012)。NO₃污染逐渐引起人们的关注, 欧盟已将 NO₃作为 N 污染源并限制其排放(Torno *et al*, 2018; European Council Directive, 1998)。目前, 我国海水养殖尾水一类排放标准规定的无机氮(DIN)排放指标为浓度低于 0.5 mg/L, 养殖水中 DIN 的主要成分为 TAN、NO₂ 和 NO₃, 过去只重视对 TAN 和 NO₂ 的去除, 但对循环水养殖而言, 水体中 NO₃含量远远高于 TAN 和 NO₂ 的含量, 因此, 同步脱除养殖水中的 DIN 是现阶段需要解决的问题。

目前, 常用的脱氮技术主要有物理法(吹脱、气提法)、化学法(折点氯化、离子交换法)及生物脱氮法(膜生物反应器、生物滤池、人工湿地等) (Mook *et al*,

* 科技部重点专项(2017YFD0701700)和山东省蓝色产业领军人才团队支撑计划共同资助 [This work was supported by the Important Special Program of the Ministry of Science and Technology, China (2017YFD0701700), and Blue Industry Leading Talent Team Support Program of Shandong Province]. 张鹏, E-mail: zp921345@163.com

① 通讯作者: 朱建新, 研究员, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-11-12, 收修改稿日期: 2018-12-03

2012)。物化法通常需要添加其他化学试剂,易打乱水中离子平衡并产生二次污染;而生物脱氮对水力停留时间及操作环境(如温度、盐度、溶解氧、pH、净化空间等)要求严格;采用生物脱氮法占地面积大、反应速率慢、运营及维护成本高(Ruan *et al*, 2016; 程海华, 2016)。

近年来,电化学技术主要通过电解的方式来处理污水,其基本原理是污染物在电极表面发生直接或间接电化学反应而得到转化,从而实现污染物的去除,具有简单可控、反应条件温和、工艺灵活等优势(Zhao *et al*, 2018),可以有效去除水体中的有机物、TAN、 PO_4^{2-} 、 NO_3^- 等污染物,因而在诸多领域中有广泛的应用(Xing *et al*, 2011; Ye *et al*, 2017)。同步去除 TAN 和 NO_3^- 是充分利用电解过程阴、阳极发生的氧化还原反应,阴极的 NO_3^- 得到电子被还原,随后还原产物(主要是 TAN)在阳极失去电子被氧化成氮气,从而将 TAN 氧化与 NO_3^- 还原进行耦合,实现 N 污染物的同步去除而不引入新的污染物(Ding *et al*, 2015)。虽然,电化学水处理技术对 TAN 和 NO_3^- 均有一定的去除效果,但在实际应用过程中,要想实现同步去除则需要对反应条件进行优化。本文通过单因素实验,研究电化学水处理过程中反应条件对 N 污染物去除效果的影响,再通过 Box-Behnken 实验建立响应面模型对电化学水处理同步脱氮的反应条件进行优化,并对优化后的反应条件进行实验验证,将为水产养殖脱氮技术的发

展提供新的思路和方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

实验装置见图 1。实验系统由直流稳压电源(30 V, 5 A)、阴阳极板(100 mm×30 mm×5 mm)、磁力搅拌器、沸石、2000 ml 烧杯等组成。

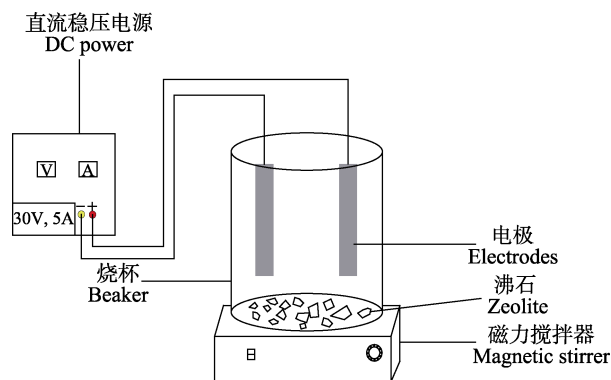


图 1 实验装置

Fig.1 Schematic diagram of experimental device

1.2 实验用水

实验用水取自青岛卓越海洋集团循环水养殖车间,主要水质指标见表 1。

表 1 实验用水水质指标

Tab.1 Water quality indexes of experimental water

总氨氮 TAN (mg/L)	亚硝酸盐 NO_2^- (mg/L)	硝酸盐 NO_3^- (mg/L)	总氮 TN (mg/L)	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	pH
2.32~2.54	0.02~0.05	13.1~15.7	21.8~26.5	25.9~26.4	6~8

1.3 实验方法

实验通过控制电流密度、极板间距、阴阳极板面积比、初始 pH 的大小来研究反应条件变化对 TAN、 NO_3^- 去除的影响。采用磁力搅拌器加速水体搅拌混合效果,利用沸石进一步吸附 TAN,提高反应体系的净化效率。实验过程中,调节电源大小将电流密度设为 3 个不同梯度, $J_1=10 \text{ mA/cm}^2$ 、 $J_2=20 \text{ mA/cm}^2$ 、 $J_3=30 \text{ mA/cm}^2$,调整极板位置控制极板间距 $D_1=1.0 \text{ cm}$ 、 $D_2=2.5 \text{ cm}$ 、 $D_3=4.0 \text{ cm}$,实验中,阳极板大小不变,采用同种材质不同规格的阴极极板,调节阴阳极板面积比为 $A_1=1:1$ 、 $A_2=1.5:1$ 、 $A_3=2:1$,研究极板面积比变化对 TAN、 NO_3^- 去除的影响,运用 NaOH 及 HCl 调节实验用水初始 pH 分别为 $P_1=6$ 、 $P_2=7$ 、 $P_3=8$ 。

在研究电流密度对 TAN、 NO_3^- 去除的影响时,将其他 3 个因子分别控制 D_2 、 P_2 、 A_2 的水平。在研究极板间距对 TAN、 NO_3^- 去除的影响时,将其他 3 个因子分别控制 J_2 、 P_2 、 A_2 的水平。在研究极板面积比对 TAN、 NO_3^- 去除的影响时,将其他 3 个因子分别控制 D_2 、 J_2 、 P_2 的水平。在研究初始 pH 对 TAN、 NO_3^- 去除的影响时,将其他 3 个因子分别控制 D_2 、 J_2 、 A_2 的水平,单独研究某一条件变化对去除效果的影响。单因素实验结束后,将 TAN、 NO_3^- 去除率作为建立响应面模型的基准,进一步分析及优化反应条件对 N 污染物处理效果的影响,并开展实验来验证响应面模型分析的结果。实验过程中,每 10 min 测定 1 次水中 TAN、 NO_3^- 浓度,每组实验重复 3 次。

1.4 水质分析方法

各项水质指标的测定均参照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)中的方法。其中, TAN 的检测采用靛酚蓝分光光度法; NO_2^- 采用萘乙二胺分光光度法; NO_3^- 采用锌镉还原法; pH、温度等参数采用 YSI 多功能水质测定仪(美国)测定。

1.5 参数计算

电流密度 J (mA/cm^2): $J=I/S$

式中, I 为实验电流大小(A), S 为极板面积(cm^2)。

去除率 $R=(C_0-C_t)/C_0 \times 100\%$

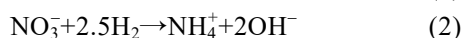
式中, C_0 为初始物质浓度(mg/L), C_t 为电解 t 分钟时溶液中的剩余浓度(mg/L)。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 电流密度对总氨氮、硝酸盐去除效率的影响

电流密度实验显示, TAN、 NO_3^- 浓度均随电流密度的上升和电解时间的延长而逐渐下降, 电解 40 min 后, $J_1 \sim J_3$ 组 TAN 浓度由初始的 2.4 mg/L 分别降低到 0.34、0.22、0.20 mg/L , 其中, J_2 、 J_3 组去除效果显著好于 J_1 组 ($P < 0.05$) (图 2)。由于电流密度的升高能加速电子迁移转化的速率, 使间接氧化反应产生的 HClO 浓度不断增加, 同时, 电极周围产生的气泡(N_2) 起到一定的混合作用, 加速了 TAN 的去除(舒欣等, 2012; Cao *et al.*, 2016)。在实验中发现, J_2 、 J_3 的电流密度下 TAN 的去除效果基本相同, 这可能是当 J 达到一定程度后, 后续反应中电流密度不再是限制污染物去除的主要因素, 继续增加电流密度只会加快副反应的速率, 导致电流效率的下降(叶舒帆等, 2011)。电解 40 min 后, $J_1 \sim J_3$ 组 NO_3^- 浓度由初始值 13.1 mg/L 分别降为 9.2、3.4、2.5 mg/L , 去除率分别达到 29.8%、74.0%、80.9%, 各组间差异显著 ($P < 0.05$) (图 3)。李智等(2009)研究认为, NO_3^- 的还原需要 H_2 参与(反应 1、2), 10 mA/cm^2 时反应速率较慢, 体系中没有足量的 H_2 供 NO_3^- 还原, 这可能是 J_1 组去除率偏低的主要原因。电子迁移速度随着 J 的增加而加快, 实验产生的 H_2 为 NO_3^- 还原提供了大量的电子供体, 有助于 NO_3^- 去除率的提高(李智等, 2009)。



2.1.2 极板面积比对总氨氮, 硝酸盐去除效率的影响

极板面积比实验显示, 随着极板面积比的增加, TAN 的去除速率逐渐下降, 且整个反应过程中, TAN

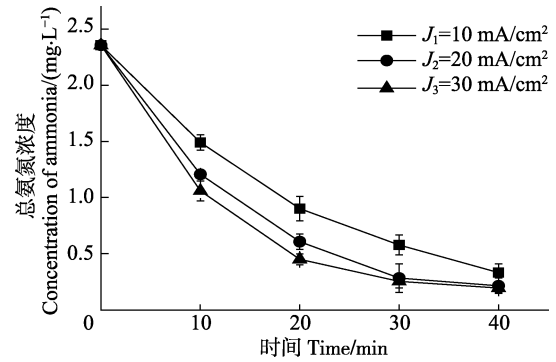


图 2 电流密度对总氨氮去除的影响

Fig.2 Effects of different current density on ammonia removal

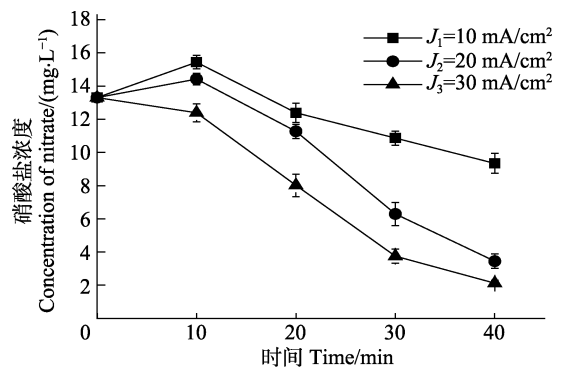


图 3 电流密度对硝酸盐去除的影响

Fig.3 Effects of different current density on nitrate removal

浓度均存在明显差异 ($P < 0.05$)。电解 40 min 后, $A_1 \sim A_3$ 组 TAN 浓度分别降为 0.21、0.31、0.38 mg/L (图 4)。由于去除 TAN 的反应受到 NO_3^- 还原的影响, 极板面积比增加时, 阴极面积增大, NO_3^- 还原速率加快, 反而增加了水中 TAN 的浓度, 不利于 TAN 去除效率的提高(朱艳, 2013)。极板面积大小影响污染物的去除是因为电极反应主要发生在极板表面, 极板面积变大时, 为 TAN、 NO_3^- 提供更多吸附位点(郑华均, 2018), 反应过程中, NO_3^- 浓度均呈先下降后上升的趋势, 极板面积比的增大有助于 NO_3^- 的去除, 实验中 $A_1 \sim A_3$ 组 NO_3^- 浓度由 14.6 mg/L 分别降低到 7.9、3.2、4.4 mg/L 。 A_2 组条件下, NO_3^- 去除效果显著高于其他各组 ($P < 0.05$) (图 5)。Reyter 等(2010)研究发现, 当阴、阳极板面积比发生改变时, NO_3^- 还原效率和产物也随之变化, 当阴、阳极板面积比为 2.25 时, NO_3^- 先还原产生 TAN, 随后 TAN 氧化生成 N_2 , 最终 NO_3^- 去除效果明显提升。本研究中, 阴、阳极板面积比为 1.5 : 1 时, NO_3^- 去除效果明显更好, 且未观察到明显的 TAN 升高, 这可能与实验中采用的电极材质以及阴极电位等因素有关。本研究中, NO_3^- 浓度较高, 为实现同步脱氮效果, 适当增加阴极板面积更有利于 NO_3^- 的还原。

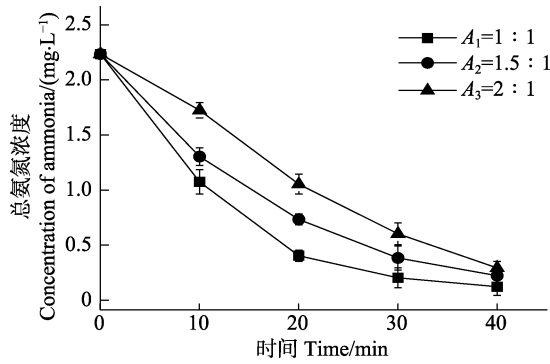


图 4 极板面积比对总氨氮去除的影响

Fig.4 Effects of different plate area ratio on ammonia removal

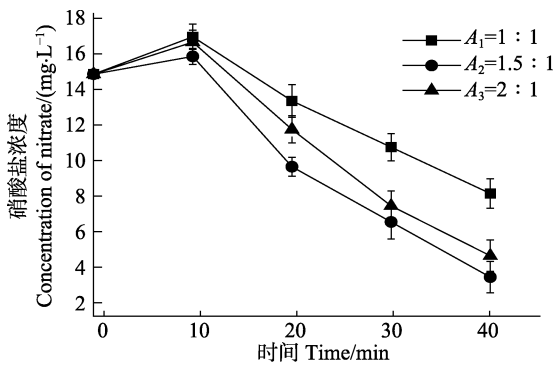


图 5 极板面积比对硝酸盐去除的影响

Fig.5 Effects of different plate area ratio on nitrate removal

2.1.3 极板间距对总氨氮、硝酸盐去除效率的影响

极板间距实验结果显示, 电解 40 min 后, $D_1 \sim D_3$ 组 TAN 由 2.54 mg/L 分别降低到 0.23、0.23、0.24 mg/L, 各组间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 6)。宋协法等(2016)在利用钉铈电极处理含 N 养殖废水时发现, 在一定范围内, 极板间距的改变不影响 TAN 的去除, 与本研究结果基本一致。朱艳(2013)研究表明, 极板间距不是影响 TAN 去除的主因, 极板距离的远近主要决定电子迁移速率, 进而影响 TAN 的去除效果。极板间距较小时反应速率快, 产生的 HClO 多, 而随电解时间的延长, 反应体系中 HClO 充足, 极板间距不再是影响 TAN 去除的主要因素, 因此, 各组去除率基本相同(陈金鑫, 2008)。随着电解时间的延长, 不同间距的 NO_3^- 去除效果存在显著差异, $D_1 \sim D_3$ 组 NO_3^- 浓度分别降低到 8.3、4.3、6.8 mg/L ($P < 0.05$) (图 7)。姚利军(2015)研究发现, 极板间距增加, NO_3^- 去除率由 32% 提高到 77.2%, 去除率不断增加。而本研究中, 极板间距为 2.5 cm 时, NO_3^- 去除效果最为理想, 增大或减小极板间距均不利于污染物的去除, 这主要因为当极板两侧在电压不变条件下, 极板距离的增加会增大电极间电阻, 使电子转移速率降低, 进而影响去除效果; 当极板间距过小时, 由于液体粘滞作用导致 NO_3^- 转移过程受阻,

同时, 板间电压导致极板表面发生钝化, 因此, 增大或减小极板间距都会影响 NO_3^- 还原的效率(Brylev *et al.*, 2007; 叶舒帆等, 2011)。

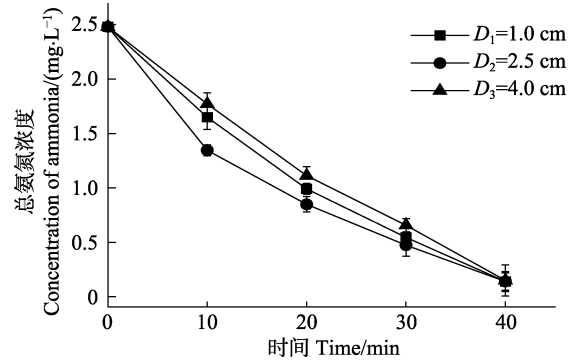


图 6 极板间距对总氨氮去除的影响

Fig.6 Effects of different plate distance on ammonia removal

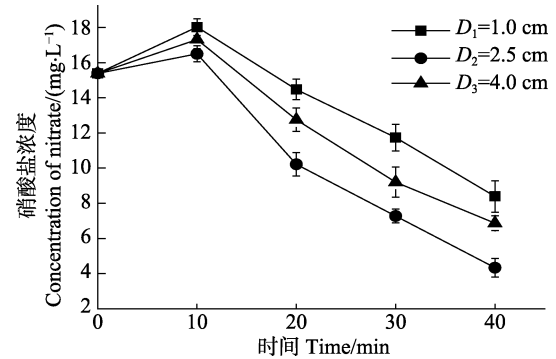


图 7 极板间距对硝酸盐去除的影响

Fig.7 Effects of different plate distance on nitrate removal

2.1.4 初始 pH 对总氨氮、硝酸盐去除效率的影响

初始 pH 实验显示, 初始 pH 的升高不利于 TAN 和 NO_3^- 的去除, 电解 40 min 后, $P_1 \sim P_3$ 组 TAN 浓度分别降为 0.18、0.25、0.36 mg/L (图 8), $P_1 \sim P_3$ 组 NO_3^- 浓度由 14.6 mg/L 分别降低到 3.2、4.7、5.5 mg/L (图 9), 各组间差异显著 ($P < 0.05$)。Gendel 等(2012)研究表明, pH 通过影响水中游离氯的存在形式进而影响 TAN 的去除(反应式 3), 当 $\text{pH} < 7$ 时, 水中游离氯主要以 HClO 形式存在, $\text{pH} > 7$ 时, 水中游离氯主要以 OCl^- 存在, HClO 的氧化性要明显好于 OCl^- , 因此, 酸性环境有助于加速 TAN 的去除, pH 较低时有助于 NO_3^- 的去除, 这主要是因为酸性条件下水中 H^+ 浓度高, 产生的 H_2 可作为电子供体直接参与到 NO_3^- 还原中, 因此, 有助于提高 NO_3^- 的还原效率(李智等, 2009)。

从单因素实验结果看, 电化学水处理对 TAN 的去除率在实验条件下都能达到 80% 以上, 但不同反应条件下, NO_3^- 的去除效果差别很大, NO_3^- 去除率不高, 限制了 TAN、 NO_3^- 的同步去除, 为实现养殖水同步脱氮的效果, 采用响应面分析模型对 NO_3^- 去除的条件进行优化。

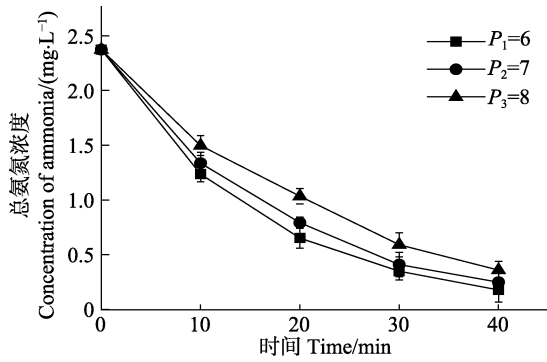


图8 初始 pH 对总氮氮去除的影响

Fig.8 Effects of different initial pH on ammonia removal

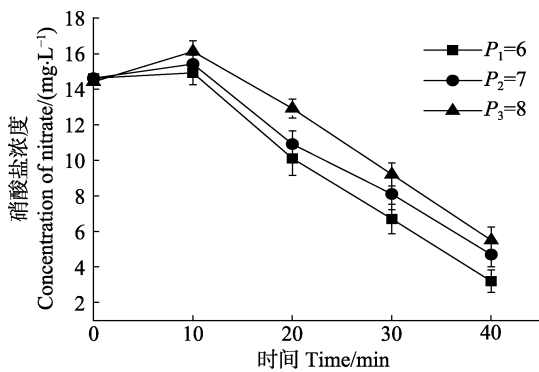


图9 初始 pH 对硝酸盐去除的影响

Fig.9 Effects of different initial pH on nitrate removal

2.2 响应面分析硝酸盐的去除率

2.2.1 模型建立及显著性分析 本研究在单因素实验结果基础上, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件内 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以电流密度、极板间距、极板面积比, 初始 pH 共 4 个影响因子为响应变量, 以 NO₃ 去除效率为响应面, 进行四因素三水平的响应面实验设计, 实验因素水平及编码见表 2(邵玉楠等, 2018)。

表 2 Box-Behnken 试验设计因子及水平
Tab.2 Factors and levels for Box-Behnken design

变量 Variable	代码 Code	编码水平 Coding level		
		-1	0	1
电流密度 Current density	A	10	20	30
极板间距 Plate distance	B	1.0	2.5	4.0
极板面积比 Plate ratio	C	1 : 1	1.5 : 1	2 : 1
初始 pH Initial pH	D	6	7	8

通过 Design-Expert 软件进行多元二次回归获得的拟合方程: $R_1=0.81+0.073 \times A+0.011 \times B+0.033 \times C-0.009 \times D-0.025 \times A \times B+0.003 \times 10^{-3} \times A \times C-0.024 \times A \times D+0.0046 \times B \times C-0.006 \times B \times D-0.003 \times C \times D-0.076 \times A^2-0.100 \times B^2-0.075 \times C^2-0.038 \times D^2$ 。对模型进行方差分析, 所得结果见表 3。从表 3 可以看出, 模型 $P < 0.0001$, 说明所得回归

表 3 回归方程方差分析

Tab.3 Analysis of variance for regression equation

项目 Items	平方和 Sum of square	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F-value	显著性 Significance
模型	0.19	14	0.013	14.16	<0.0001*
A~J	0.064	1	0.064	68.02	<0.0001*
B~D	1.34×10^{-3}	1	1.34×10^{-3}	1.43	0.2522
C~A	0.013	1	0.013	13.8	0.0023*
D~P	9.90×10^{-4}	1	9.90×10^{-4}	1.05	0.3227
AB	2.50×10^{-3}	1	2.50×10^{-3}	2.65	0.1256
AC	4.23×10^{-5}	1	4.23×10^{-5}	0.045	0.8353
AD	2.40×10^{-3}	1	2.40×10^{-3}	2.55	0.0327*
BC	8.10×10^{-5}	1	8.10×10^{-5}	0.086	0.7737
BD	1.56×10^{-4}	1	1.56×10^{-4}	0.17	0.69
CD	2.50×10^{-5}	1	2.50×10^{-5}	0.027	0.8729
A ²	0.038	1	0.038	40.02	<0.0001*
B ²	0.065	1	0.065	68.49	<0.0001*
C ²	0.037	1	0.037	38.97	<0.0001*
D ²	9.49×10^{-3}	1	9.49×10^{-3}	10.07	0.0068*
残差 Residual	0.013	14	9.42×10^{-4}		
失拟项 Lack of fit	0.012	10	1.19×10^{-3}	3.53	0.1179
纯误差 Pure error	1.34×10^{-3}	4	3.36×10^{-4}		
总和 Total	0.20	28			

注: P 为回归方程与实际值的拟合程度; F 值为该因素的影响显著性程度, *为影响显著

Note: P is the fitting degree between the regression equation and the actual value; F is the significance degree of the influence of this factor, * is the significance degree of the influence

方程差异极显著, 失拟项 $P=0.1179$, $P>0.05$ 说明失拟不显著, 实验构建的回归方程效果理想, 故可用此模型对不同参数条件下的 NO_3^- 去除效果进行分析和预测。模型的回归系数 $R^2=0.9340$, 校正系数 $R^2=0.8681$, 说明模型预测结果与真实值吻合度较高(林建原等, 2013), 从表 3 可以看出, 电流密度及极板面积比对 NO_3^- 去除的影响极显著($P<0.0001$); 电流密度和初

始 pH 的交互作用也显著影响 NO_3^- 的去除($P<0.05$); 此外, 模型中二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对 NO_3^- 处理效率影响也达到极显著水平。

2.2.2 两因子间交互作用分析 为进一步考察各因子的交互效应对 NO_3^- 去除率影响, 同时, 获得最佳反应条件, 固定其中 2 个条件不变, 获得任意 2 个因素交互作用对 NO_3^- 去除影响的响应面 3D 效果图(图 10)。

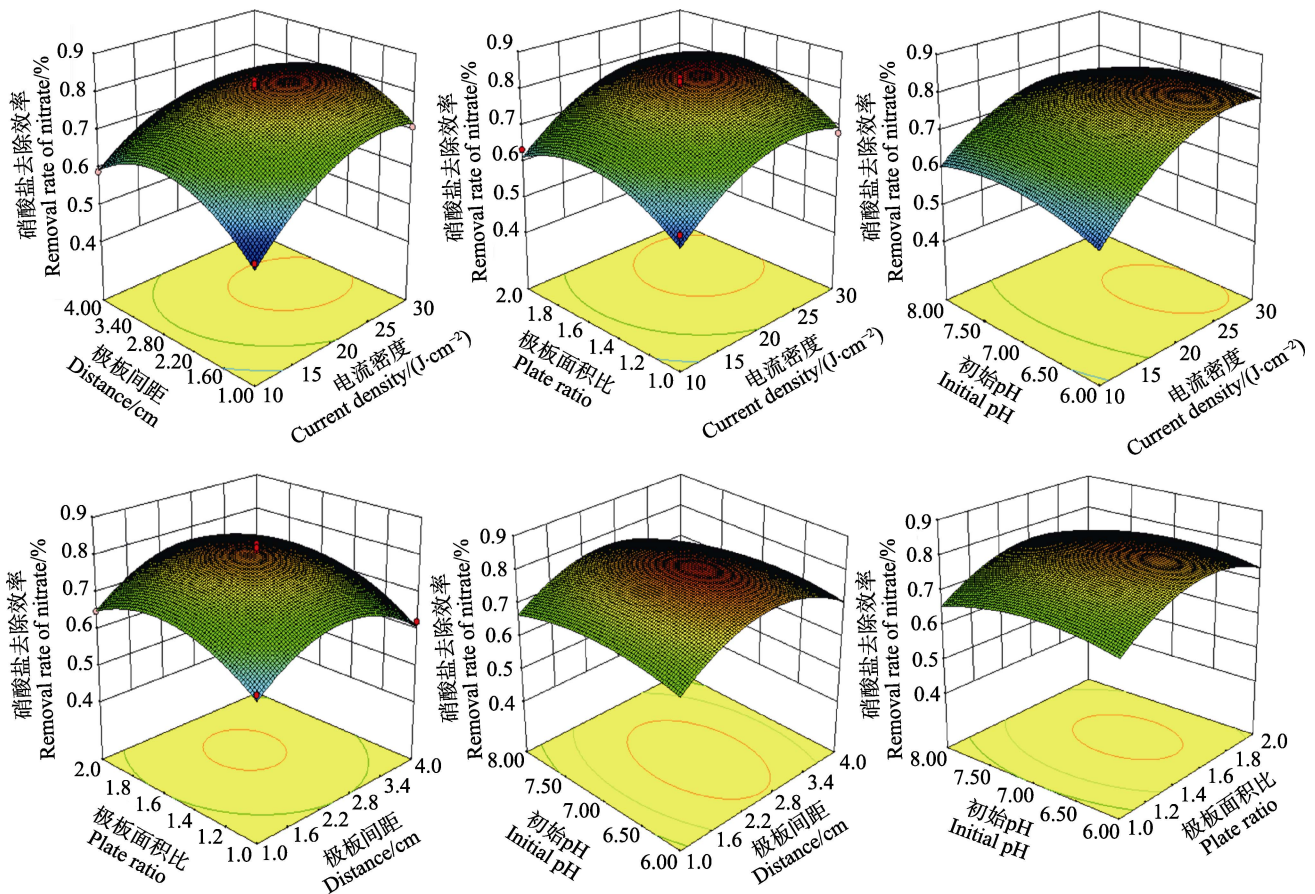


图 10 因素交互作用对硝酸盐去除效率影响的响应面

Fig.10 Response surface plot for effects on nitrate removal under the interaction of different factors

从图 10 可以看出, 等高线的形状以及曲线坡度反映了交互效应的强弱, 等高线呈椭圆形且坡度越陡说明交互作用越显著; 反之为交互作用不显著(张洋等, 2018; 杨晶晶等, 2018)。电流密度与初始 pH 之间交互作用最为明显。通过 NO_3^- 去除率曲面还可以发现, 反应条件中, 电流密度对 NO_3^- 去除效率影响最大, 其次是极板面积比, 这也印证了表 3 中方差分析的结果。响应面呈现折叠的曲面, 表明各因素与响应结果之间的关系比较复杂, 无法用一次线性方程解释, 但所得响应面均为开口向下(图 10), 说明 4 个因素的实验范围内均存在最佳值(王周利等, 2014)。通过对模型回归方程的优化求解, 获得了 NO_3^- 最佳去除率为

83.4%, 此时的反应条件: $J=25.6 \text{ mA/cm}^2$, 极板间距为 2.5 cm, 极板面积比为 1.6 : 1, 初始 pH 为 6.6。

2.3 验证实验

在模型优化后的实验条件下开展 3 次重复试验, 用于验证养殖废水的脱氮效果见图 11。从图 11 可以看出, 实验中 TAN 浓度由 2.28 mg/L 降为 0.29 mg/L, 平均去除率达到 87.3%; NO_3^- 浓度由 13.5 mg/L 降为 2.5 mg/L, 平均去除率达到 81.5%。而响应面模型优化后 NO_3^- 去除率的预估值为 83.4%, 二者间误差为 1.9%, 此外, 对实验中间产物 NO_2^- 浓度分析后发现, 尽管实验过程中 NO_3^- 浓度大幅度上升, 但一段时间后

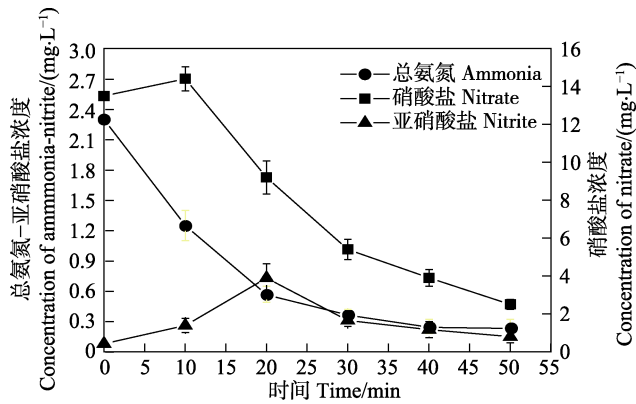


图 11 最佳反应条件下的脱氮效果

Fig.11 The nitrogen removal effect under optimal reaction conditions.

其浓度逐渐下降,且不存在较高浓度 NO_2^- 积累的问题。实验结果表明,采用响应面模型对电化学水处理反应条件进行优化,有助于养殖废水脱氮效率的提高。

3 结论

单因素实验表明,电流密度、极板间距、极板面积比和初始 pH 的改变对 TAN 的去除影响较小,在给定的反应条件下,各组 TAN 的去除率达到 80% 以上;而电流密度、极板间距、极板面积比和初始 pH 的改变显著影响 NO_3^- 的去除,为实现 TAN 和 NO_3^- 的同步去除,须对 NO_3^- 反应条件进行优化。

以电流密度、极板间距、极板面积比、初始 pH 为影响因子,以 NO_3^- 去除率为响应值建立响应面模型,通过对回归方程求解获得去除 NO_3^- 的最佳反应条件:电流密度为 25.6 mA/cm^2 ,极板间距为 2.5 cm,极板面积比为 1.6 : 1,初始 pH 为 6.6,此时, NO_3^- 去除率为 83.4%。

在响应面优化反应条件下开展验证实验,得到 TAN 去除率为 87.3%, NO_3^- 去除率为 81.5%,实验结果表明,采用响应面模型对反应条件进行优化有助于养殖废水脱氮效率的提高。

参 考 文 献

Brylev O, Sarrazin M, Roué L, *et al.* Nitrate and nitrite electrocatalytic reduction on Rh-modified pyrolytic graphite electrodes. *Electrochimica Acta*, 2007, 52(21): 6237–6247

Cao Z. Simultaneous removal of COD and ammonia nitrogen using a novel electro-oxidation reactor: A technical and economic feasibility study. *International Journal of Electrochemical Science*, 2016, 11(5): 4018–4026

Chen H, Huang GL, Wang JD. Industrial application of electro-oxidation to simultaneous removal of COD and ammonia

nitrogen in wastewater. *China Water and Wastewater*, 2016

Chen HH, Zhu JX, Qu KM, *et al.* Effect of different organic carbon sources and C/N On the bio-filter purification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 127–134 [程海华, 朱建新, 曲克明, 等. 不同有机碳源及 C/N 对生物滤池净化效果的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 127–134]

Chen JL. Study and application of electrochemical oxidation technology for ammonia removal. Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2008 [陈金奎. 氨氮的电化学氧化技术及其应用研究. 清华大学博士研究生学位论文, 2008]

Chrisgj VB, Janp S, Sven W, *et al.* The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 2012, 326–329(1): 163–167

Díaz V, Ibáñez R, Gómez P, *et al.* Kinetics of electro-oxidation of ammonia-N, nitrites and COD from a recirculating aquaculture saline water system using BDD anodes. *Water Research*, 2011, 45(1): 125–134

Ding J, Zhao Q, Zhang Y, *et al.* The eAND process: Enabling simultaneous nitrogen-removal and disinfection for WWTP effluent. *Water Research*, 2015, 74: 122–131

European council directive. Directive no.98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Adopted by the Council, on November 3, 1998

Fu XJ, Ma SS, Qu KM, *et al.* Ammonia removal by bio-film and its impact factors in recirculation aquaculture systems. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 95–99 [傅雪军, 马绍赛, 曲克明, 等. 循环水养殖系统生物挂膜的消氨效果及影响因素分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 95–99]

Gao YN, Sun MQ, Zhou LT, *et al.* Study on optimization of modified chitosan of modified chitosan removal of nitrate by response surface methodology. *Environmental Engineering*, 2018(3): 33–37, 43 [郜玉楠, 孙美乔, 周历涛, 等. 响应曲面优化改性壳聚糖强化混凝处理硝酸盐研究. *环境工程*, 2018(3): 33–37, 43]

Gendel Y, Lahav O. Revealing the mechanism of indirect ammonia electrooxidation. *Electrochimica Acta*, 2012, 63: 209–219

Hondav H, Watnab Y, Kikuchi K, *et al.* High density rearing of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* with a closed seawater recirculation system equipped with a denitrification unit. *Aquaculture*, 1993, 41: 19–26

Hu HY, Shan BT, Wang XL, *et al.* Review of common reagents used in wastewater treatment of marine aquaculture. *Marine Sciences*, 2004, 28(12): 59–62 [胡海燕, 单宝田, 王修林, 等. 工厂化海水养殖水处理常用制剂. *海洋科学*, 2004, 28(12): 59–62]

Lahav O, Asher RB, Gendel Y. Potential applications of indirect electrochemical ammonia oxidation within the operation of freshwater and saline-water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 2014, 65: 55–64

Lin JY, Ji LH. Optimization of flavonoids from ginkgo biloba using response surface analysis. *Journal of Chinese Institute of*

- Food Science and Technology, 2013, 13(2): 83–90 [林建原, 季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺. 中国食品学报, 2013, 13(2): 83–90]
- Lin SH, Wu CL. Electrochemical removal of nitrite and ammonia for aquaculture. *Water Research*, 1996, 30(3): 715–721
- Li Z, Zhang YX. Study on nitrate improvement of electrosorption desalination by its following process: Water electrolysis catalytic reduction. *Water and Wastewater Engineering*, 2009, 35(5): 146–150 [李智, 张玉先. 电吸附除盐后续工艺电解水催化还原去除硝酸盐的研究. 给水排水, 2009, 35(5): 146–150]
- Mook WT, Chakrabarti MH, Aroua MK, *et al.* Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: A review. *Desalination*, 2012, 285(3): 1–13
- Reyter D, Bélanger D, Roué L. Nitrate removal by a paired electrolysis on copper and Ti/IrO₂ coupled electrodes—influence of the anode/cathode surface area ratio. *Water Research*, 2010, 44(6): 1918–1926
- Song XF, Bian M, Huang ZT, *et al.* Studies of the ammonia and nitrite removal by electrochemical oxidation in recirculating aquaculture system. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)* 2016, 46(11): 127–135 [宋协法, 边敏, 黄志涛, 等. 电化学氧化法在循环水养殖系统中去除氨氮和亚硝酸盐效果研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(11): 127–135]
- Ruan Y, Lu C, Guo X, *et al.* Electrochemical treatment of recirculating aquaculture wastewater using a Ti-RuO₂-IrO₂ anode for synergetic total ammonia nitrogen and nitrite removal and disinfection. *Transactions of the Asabe*, 2016, 59(6): 1831–1840
- Shu X, Ding J, Zhao QL. Experimental study on the electrochemical oxidation of ammonia wastewater. *Journal of Natural Science of Heilongjiang Univeirsity*, 2012, 29(2): 246–250 [舒欣, 丁晶, 赵庆良. 电化学法处理氨氮废水的实验研究. 黑龙江大学自然科学学报, 2012, 29(2): 246–250]
- Torno J, Einwächter V, Schroeder JP, *et al.* Nitrate has a low impact on performance parameters and health status of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in RAS. *Aquaculture*, 2018, 489: 21–27
- Wang ZL, Wu XH, Yue TL, *et al.* Application of ultra-filtration technology in cider clarification. *Journal of Agricultural Machinery*, 2014, 45(1): 209–213 [王周利, 伍小红, 岳田利, 等. 苹果酒超滤澄清工艺的响应面法优化. 农业机械学报, 2014, 45(1): 209–213]
- Xing Y, Lin J. Application of electrochemical treatment for the effluent from marine recirculating aquaculture systems. *Procedia Environmental Sciences*, 2011, 10(1): 2329–2335
- Xiong GQ. Removal of nitrates and nitrites in water by modified capacitive deionization activated carbon electrode. Master's Thesis of Chongqing University, 2017 [熊关全. 改性活性炭电极电吸附去除水中的硝酸盐和亚硝酸盐. 重庆大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Xu LL, Shi HC, Chen JL. Electrochemical oxidation of ammonia nitrogen waste water using Ti/RuO₂-TiO₂-IrO₂-SnO₂ electrode. *Environment Science*, 2007, 28(9): 2009–2013 [徐丽丽, 施汉昌, 陈金鑫. Ti/RuO₂-TiO₂-IrO₂-SnO₂ 电极电解氧化含氨氮废水. 环境科学, 2007, 28(9): 2009–2013]
- Yang JJ, Duan Y. Light condition optimization for removal of high ammonia nitrogen in wastewater based on *Scenedesmus obliquus* using response surface methodology science. *Technology and Engineering*, 2018(19): 329–334 [杨晶晶, 端允. 响应面法优化斜生栅藻处理高氨氮废水的光照条件. 科学技术与工程, 2018(19): 329–334]
- Yao LJ. Study on strengthening effect of nitrate reduction by electrochemical methods using organics. Master's Thesis of China University of Geosciences, 2015 [姚利军. 有机物强化电化学法去除地下水硝酸盐的研究. 中国地质大学(北京)硕士研究生学位论文, 2015]
- Ye SF, Hu XM, Dong J, *et al.* Catalytic electrolysis removal of nitrate in water by modified Ti substrate electrodes. *China Environmental Science*, 2011, 31(1): 44–49 [叶舒帆, 胡筱敏, 董俊, 等. 钛基修饰电极催化电解去除水中硝酸盐氮的研究. 中国环境科学, 2011, 31(1): 44–49]
- Ye ZY, Wang S, Gao W, *et al.* Synergistic effects of micro-electrolysis-photocatalysis on water treatment and fish performance in saline recirculating aquaculture system. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45066
- Zhang P, Wang S, Chen SB, *et al.* The effects of current density on the efficiency of aquaculture wastewater treatment by electrochemical technology. *Fishery Modernization*, 2018, 45(2): 13–19 [张鹏, 王朔, 陈世波, 等. 电流密度对电化学处理水产养殖废水效率的影响. 渔业现代化, 2018, 45(2): 13–19]
- Zhang SY, Li G, Wu HB, *et al.* An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*, 2011, 45(3): 93–102
- Zhang Y, Chu YX, Wang HP. Operating condition of ammonia nitrogen removal in BMED process optimized by response surface method. *Environmental Science and Technology*, 2018(4): 134–138 [张洋, 褚衍旭, 王红萍. 响应面法优化 BMED 工艺氨氮迁移操作条件. 环境科学与技术, 2018(4): 134–138]
- Zhao J, Li N, Yu R, *et al.* Magnetic field enhanced denitrification in nitrate and ammonia contaminated water under 3D/2D Mn₂O₃/g-C₃N₄ photocatalysis. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 349: 530–538
- Zhao J, Wang WH, Cheng Y, *et al.* Condition optimization for adsorption of ammonia nitrogen in seawater by modified sand using response surface methodology. *Chemical Industry and Engineering*, 2017, 34(3): 65–71 [赵瑾, 王文华, 成玉, 等. 响应面法优化改性砂吸附海水中氨氮的条件. 化学工业与工程, 2017, 34(3): 65–71]

Zheng HJ, Niu P, Zhao ZF, *et al.* Synthesis of Pt@rGO-Bi₂WO₆/FTO and its photoelectrocatalytic properties for methanol oxidation. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2018(1): 83–89 [郑华均, 牛平, 赵浙菲, 等. Pr@GO-Bi₂WO₆/FTO 复合材料的制备及其光电催化甲醇氧化性能. *浙江工业大学学报*, 2018(1): 83–89]

Zhu JX, Liu H, Xu Y, *et al.* Dual-culture techniques for the rapid start-up of recirculating aquaculture system. *Progress in*

Fishery Sciences, 2014, 35(4): 118–124 [朱建新, 刘慧, 徐勇, 等. 循环水养殖系统生物滤器负荷挂膜技术. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 118–124]

Zhu Y. Ammonia treatment by the PbO₂ powder porous electrode and its application in the nitrate treatment. Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2013 [朱艳. PbO₂ 粉末多孔电极处理氨氮及其在硝酸盐去除中的应用. 合肥工业大学硕士研究生学位论文, 2013]

(编辑 陈 严)

Optimization and Validation of Electrochemical Technology for Simultaneous Nitrogen Removal in Aquaculture by Using Response Surface Methodology

ZHANG Peng^{1,2}, ZHANG Long^{1,2}, CHEN Shibo³, ZHU Jianxin^{2①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071;

3. Qingdao Excellent Ocean Group Co., Ltd., Qingdao 266400)

Abstract The simultaneous removal of ammonia and nitrate nitrogen is a challenging process in the treatment of recirculating aquaculture systems. This study first analyzed the effects of current density, plate area ratio, plate spacing, and initial pH on the removal rates of ammonia and nitrate nitrogen by a single-factor experiment. To understand the effects of different influencing factors on the efficiency of nitrogen removal, four-factor and three-level response surface experiments were designed on the basis of the central combination principle of Box-Behnken in Design-Expert software. Subsequently, the reaction conditions for the simultaneous removal of ammonia and nitrate nitrogen were optimized using a response surface model. Finally, the optimized reaction conditions were evaluated using verification experiments. In the single-factor experiments, we found that the changes in the current density, plate area ratio, plate spacing, and initial pH had little effect on ammonia and nitrate nitrogen removal. The removal rate of ammonia is always > 80% in the given reaction conditions, whereas the changes in reaction conditions significantly affected the removal rate of nitrate nitrogen, which ranges from 29.8% to 80.9%. The constructed response surface model showed that the regression coefficient (R^2) was 0.9340 and the correction coefficient (R^2) was 0.8681, which showed that the model has good accuracy. We obtained the optimal reaction conditions using the response surface model: current density was 25.6 mA/cm², plate area ratio between cathode and anode was 1.6:1, plate spacing was 2.5 cm, and initial pH was 6.6. Experimental verification under the reaction conditions proved that the removal rate of nitrate nitrogen could reach up to 81.5% and the removal rate of ammonia up to 87.3%. This experiment showed that electrochemical treatment can effectively achieve the simultaneous removal of ammonia and nitrate nitrogen and that application of the response surface model can improve the nitrogen removal efficiency of electrochemical treatment in aquaculture wastewater.

Key words Aquaculture; Electrochemical technology; Simultaneous nitrogen removal; Response surface methodology

① Corresponding author: ZHU Jianxin, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181111001

http://www.yykxjz.cn/

王锦锦, 廖梅杰, 李彬, 王印庚, 荣小军, 张正, 葛建龙. 基于多个线粒体序列的中韩俄沿海不同地理群体刺参的遗传多样性及种群结构分析. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 75-85

Wang JJ, Liao MJ, Li B, Wang YG, Rong XJ, Zhang Z, Ge JL. Genetic diversity and population structure of different geographical populations of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) from China, South Korea and Russia based on mitochondrial genes. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 75-85

基于多个线粒体序列的中韩俄沿海 不同地理群体刺参的遗传多样性及种群结构分析*



王锦锦^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 李彬^{2,3} 王印庚^{2,3}
荣小军^{2,3} 张正^{2,3} 葛建龙²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

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

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为评价不同海域不同体色特征刺参群体的遗传结构, 本研究采用 PCR 技术扩增了中国、韩国和俄罗斯沿海 8 个刺参(*Apostichopus japonicus*)群体的 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列。根据所获得的 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列分析这 8 个群体的遗传多样性和遗传进化关系。结果显示, 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列长度分别为 543 bp、656 bp 和 509~527 bp。16S rDNA 序列中共检测到 16 个多态位点, 16 种单倍型, 单倍型多样性指数为 0.629, 核苷酸多样性指数为 0.0016, 平均核苷酸差异数 0.880。CO I 序列共检测到 62 个多态位点, 38 种单倍型, 单倍型多样性指数为 0.958, 核苷酸多样性指数为 0.0073, 平均核苷酸差异数为 4.796。D-loop 序列共检测到 200 个多态位点, 61 种单倍型, 单倍型多样性指数为 0.922, 核苷酸多样性指数为 0.0157, 平均核苷酸差异数为 6.834。3 个线粒体片段对于不同群体的遗传多样性检测结果显示, D-loop 和 CO I 序列的多态位点数、单倍型数和核苷酸多样性均显著高于 16S rDNA 序列, 更适用于同一物种不同群体遗传结构的解析。韩国浦项地区 3 个群体遗传多样性最高, 这可能与其所处地理位置洋流影响有关。利用 CO I 基因对采自浦项的 3 种体色刺参进行遗传分化分析, 遗传分化系数 $F_{st} < 0.05$, 不存在遗传分化。对所采集的群体构建的系统进化树结果显示, 青岛海参群体与烟台海参群体聚为一支, 再与韩国群山黑参群体聚为一支, 然后与韩国木浦黑参群体聚在一起, 向外依次为俄罗斯群体及韩国浦项的 3 个群体, 不同种群的遗传结构受洋流影响最大, 其次跟其地理分布有关。

* 国家重点研发计划(2018YFD0901603)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金(2018GH10)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016008)、山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)和山东省自然科学基金博士基金(ZR2016CB46)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Project (2018YFD0901603), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2018GH10), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS (20603022016008), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010), and the Doctoral Fund of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB46)]. 王锦锦, E-mail: jinjin201602@sina.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 副研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-11-11, 收修改稿日期: 2018-12-04

关键词 刺参; 16S rDNA; CO I; D-loop; 遗传多样性

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0075-11

刺参又名仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 广泛分布于太平洋西部的中国、俄罗斯、韩国与日本沿海, 含有丰富的蛋白质, 粘性多糖及多种微量元素, 具有很高的药用价值和营养保健价值, 是我国海水养殖中重要的经济品种(廖玉麟, 1997)。自20世纪80年代刺参人工繁育技术突破以后, 刺参养殖产业快速发展, 截止2017年, 全国刺参养殖面积达21.9万 hm^2 , 养殖产量21.9万t, 直接产值逾300亿元(中国渔业统计年鉴, 2018)。然而, 随着产业的迅猛发展, 刺参养殖产业出现生长速度慢、病害频发、养殖成活率低等种质退化现象。而在韩国和俄罗斯等刺参自然分布海域, 由于过度捕捞和环境污染的加剧, 野生刺参自然资源趋于枯竭, 根据世界自然保护联盟的数据, 近30~50年以来, 野生刺参的生物资源量, 日本下降了30%, 韩国下降了40%, 俄罗斯下降了80%, 中国下降了95%以上。刺参已被世界自然保护联盟收录到濒危物种红色名录的濒危 Endangered(EN)等级(Purcell *et al*, 2013)。因此, 开展刺参种质资源评估和遗传结构分析, 不仅可以为刺参良种选育提供科学数据, 还可为客观评估刺参的种质资源现状提供技术支持。

目前, 用于种质资源评估的分子标记主要包括微卫星DNA和线粒体DNA等。其中, 线粒体DNA(mtDNA)

是细胞核外具有自主复制、转录和翻译能力的遗传因子, 与核DNA相比, 具有分子小、结构简单、演化速度快和母系遗传等优点, 是用于进行种群遗传结构分析的理想标记。目前, 在水产动物中, 用于遗传结构解析的mtDNA片段主要包括16S rDNA、D-loop和CO I基因。本研究采集中国、韩国和俄罗斯沿海6个海域8个不同地理群体的刺参, 分别采用16S rDNA、D-loop和CO I这3个片段对所采集的地理群体种质资源和遗传结构进行评估, 以期科学评估目前刺参种质资源现状提供数据支撑, 并为种质资源保护及开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

实验用野生刺参分别采集于中国青岛、烟台、俄罗斯符拉迪沃斯托克、韩国浦项、韩国木浦和韩国群山共6个海域, 根据所采集刺参体色的差异, 韩国浦项采集的刺参又分为红参、黄参和黑参3个群体, 每个群体随机选取10头刺参作为实验刺参, 合计采集6个海域8个不同地理群体刺参80头。采集的刺参采用冷冻方式运回实验室, 剖取纵肌用于DNA的提取。不同群体的采样地点及信息见图1和表1。

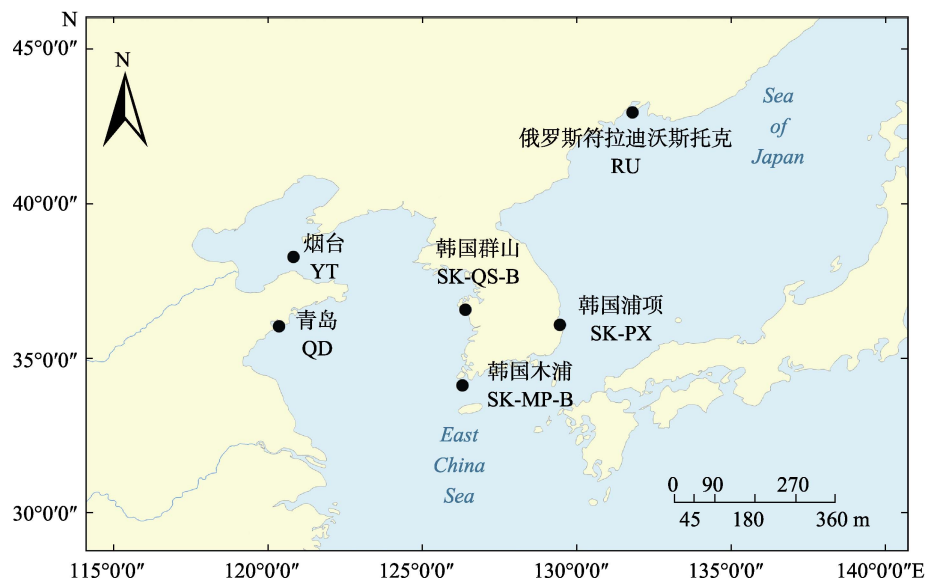


图1 刺参采样地点

Fig.1 Locations of sea cucumber *A. japonicus* sampling

表 1 不同地理种群刺参样本采样信息
Tab.1 Information of *A. japonicus* sampling

群体名称 Population name	采样时间 Collection date	位置 Location	样本量 Number
青岛太平角海参 QD	2017-05-26	36°02'N, 120°21'E	10
韩国浦项黑参 SK-PX-B	2017-06-09	36°05'N, 129°27'E	10
韩国浦项红参 SK-PX-R	2017-06-09	36°05'N, 129°27'E	10
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	2017-06-10	36°05'N, 129°27'E	10
韩国群山黑参 SK-QS-B	2017-06-09	36°34'N, 126°23'E	10
韩国木浦黑参 SK-MP-B	2017-06-09	34°07'N, 126°17'E	10
烟台长岛海参 YT	2017-07-03	38°17'N, 120°49'E	10
俄罗斯海参 RU	2018-04-19	35°39'N, 119°49'E	10

1.2 mtDNA 序列扩增及测序

利用 Omega Mollusc DNA kit 提取海参基因组 DNA, 利用 NanoDrop 1000 及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度及完整性后, 置于-20℃冰箱保存。利用刺参 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列特异引物对 3 个 mtDNA 片段进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物测序, 3 对引物序列见表 2(Kerr *et al*, 2005; Arndt *et al*, 1996; 姬南京等, 2014), 引物由青岛擎科生物公司合成。PCR 总体积为 50 μ l: 2 \times Tsingke Master mix 25 μ l, 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l (50 ng/ μ l), 加 ddH₂O 补足至 50 μ l。PCR 反应扩增程序: 95℃预变性 60 s、95℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 60 s, 经 35 个循环后, 72℃延伸 10 min, 4℃保存。PCR 产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送青岛擎科生物公司进行双向测序。

表 2 刺参线粒体 DNA 扩增用引物序列
Tab.2 Primer sequences of mtDNA of *A. japonicus*

引物 Primer	序列 Sequences(5'-3')	引物出处 Reference
16S ar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Kerr(2005)
16S br	CTCCGGTTTGAAGTCAGATCA	
CO I ef	ATAATGATAGGAGGRTTTGG	Arndt 等 (1996)
CO I er	GCTCGTGTRTCTACRTCCAT	
D-loop-F	CAAGCCCTAAACCCAAGT	姬南京等 (2014)
D-loop-R	ATTCCCTAGATGTAAAGTTCG	

1.3 数据处理

测序所得序列采用 ClustalX1.83 软件编辑、校对和排序(Thompson *et al*, 1997)。采用 DnaSP 5.0 软件计算多态位点数目(Number of polymorphicsites)、单倍型数目(Number of haplotypes)、单倍型多样性(Haplotype diversity)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity)、平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide

differences)、两两群体间的遗传分化系数(F_{st})(Librado *et al*, 2009)。利用 MEGA 6.0 软件统计碱基组成、变异位点数, 计算群体内及群体间遗传距离, 采用 Kimura 2-Parameter 方法构建 N-J(Neighbor-joining)系统发育树(Saitou *et al*, 1987)。利用 Network 5.0 软件构建基于 Median-Joining 的单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 刺参 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列特征分析

经 PCR 扩增、测序, 获得刺参线粒体 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列, 利用 ClustalX1.83 软件进行序列比对、校正去除序列两端非保守碱基后获得 80 个个体的相应序列信息。16S rDNA 序列长度为 543 bp, 碱基组成比例相对稳定(表 3), A 的平均含量为 27.5%, T 的平均含量为 29.1%, G 的平均含量为 21.7%, C 的平均含量为 21.7%, G 与 C 的平均含量及各群体含量均相等, A+T 的含量为 56.6%, 略高于 G+C 含量。CO I 的序列长度为 656 bp, A、T、G、C 的平均含量分别为 32.4%、26.5%、21.7%、19.4%, A+T 的含量为 58.9%, 高于 G+C 含量。D-loop 的序列长度为 509~527 bp, A、T、G、C 的平均含量分别为 34.5%、25.3%、27.0%、13.3%, A+T 的含量为 59.7%, 显著高于 G+C 含量。A+T 含量在不同基因片段中差异显著, 3 个片段中 D-loop 序列最高, 按照不同地理群体进行相应数据统计发现, 在同一序列不同群体中差异不显著。

16S rDNA 的 543 个位点中, 变异位点有 16 个(图 2), 占总位点数的 2.9%, 其中没有发现插入/缺失现象, 转换多于颠换。在 CO I 基因的 656 个位点中, 变异位点 62 个(图 3), 占总位点数的 9.5%, 其中, 没有发现插入/缺失位点, 转换多于颠换。D-loop 的总长度为 551 bp (包含缺失位点), 变异位点 200 个(图 4), 占总位点数的 36.3%, 其中, 68 个位点存在碱基的插入/缺失位点。

表3 刺参不同地理群体 16S rDNA、CO I 和 D-loop 序列的碱基组成(%)

Tab.3 Base compositions of 16S rDNA, CO I and D-loop sequences in different populations of *A. japonicus*(%)

群体 Population	16S rDNA					CO I					D-loop				
	A	T	G	C	A+T	A	T	G	C	A+T	A	T	G	C	A+T
青岛太平角 QD	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6	32.3	26.5	21.8	19.4	58.8	34.5	25.4	26.5	13.5	60.0
烟台长岛 YT	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6	32.3	26.5	21.8	19.4	58.8	34.6	25.4	26.9	13.1	60.0
韩国木浦黑参 SK-MP-B	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6	32.4	26.6	21.6	19.3	59.0	34.6	25.2	26.8	13.4	59.8
韩国群山黑参 SK-QS-B	27.4	29.1	21.7	21.7	56.5	32.4	26.5	21.7	19.4	58.9	34.6	25.2	26.9	13.3	59.8
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	27.5	29.1	21.7	21.7	56.5	32.4	26.6	21.6	19.3	59.0	34.5	25.3	27.0	13.2	59.8
韩国浦项红参 SK-PX-R	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6	32.2	26.5	21.9	19.4	58.7	34.1	25.1	27.3	13.5	59.2
韩国浦项黑参 SK-PX-B	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6	32.3	26.6	21.8	19.3	58.9	34.3	25.1	27.2	13.3	59.4
俄罗斯海参 RU	27.4	29.1	21.7	21.7	56.5	32.5	26.5	21.7	19.4	59.0	34.5	25.5	27.0	13.0	59.9
平均值 Average	27.5	29.1	21.7	21.7	56.6*	32.4	26.5	21.7	19.4	58.9*	34.5	25.3	27.0	13.3	59.7*

表示差异较显著($P<0.01$) represents significant difference ($P<0.01$)

单倍型 Haplotype	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	4	4	5	数量 number			
Hap1	G	A	G	T	A	C	T	T	G	T	C	T	A	A	A	G	47
Hap2	T	4			
Hap3	A	12			
Hap4	G	.	.	4			
Hap5	A	1			
Hap6	C	.	.	1			
Hap7	.	.	.	T	1			
Hap8	A	N	.	.	T	.	.	.	A	1			
Hap9	A	C	1			
Hap10	A	C	G	.	.	1			
Hap11	G	1			
Hap12	A	G	1			
Hap13	.	T	1			
Hap14	A	C	1			
Hap15	G	.	.	.	2			
Hap16	.	.	A	1			

图2 刺参 16S rDNA 序列变异位点

Fig.2 Variable site of 16S rDNA in *A. japonicus*

上方数字表示变异位点在单倍型中对应的位置,

左侧表示单倍型名称, 右侧表示个体数目

Numbers on the top represent the locations of mutative nucleotide acids, on the left are the names of haplotypes, on the right side represent the number of individuals

2.2 不同地理群体刺参的遗传多样性分析

8个群体间的16S rDNA、CO I、D-loop的核苷酸遗传多样性参数见表4。从8个群体80个个体的16S rDNA序列中共检测到16个多态位点、16种单倍型,单倍型多样性指数为0.629,核苷酸多样性指数为0.0016,平均核苷酸差异数0.880,整体遗传多样性较低。8个群体中80个个体的CO I序列共检测到62个多态位点、38种单倍型,单倍型多样性指数为0.958,核苷酸多样性指数为0.0073,平均核苷酸差异数为4.796,说明8个群体的CO I序列单倍型及

多态位点比较丰富,核苷酸差异数较大,其中,韩国浦项地区3个不同体色的刺参单倍型多样性比其他群体更高。从8个群体中80个个体的D-loop序列共检测到200个多态位点、61种单倍型,单倍型多样性指数为0.933,说明8个群体的D-loop序列的多态位点数及单倍型数最为丰富,单倍型多样性最高,核苷酸多样性指数为0.0157,平均核苷酸差异数为6.834,核苷酸差异数最大。对比3个片段的遗传多样性结果可以看出,CO I基因和D-loop的单倍型多样性、多态位点数及核苷酸差异数都显著高于16S rDNA。鉴于NCBI数据库中收录的海参纲CO I基因数据量高,而D-loop序列较少,为了保证后期数据分析的准确性和可比性,本研究选取CO I基因用于后续不同地理群体刺参遗传结构分析。

2.3 群体遗传结构分析

根据所测定的8个群体的CO I序列信息,采用MEGA 6.0软件计算8个群体内和群体间的遗传距离的结果见表5。从表5可以看出,群体内遗传距离为0.0023~0.0084,群体内遗传距离最大的是韩国浦项红参群体(0.0084),其次是韩国浦项黑参群体(0.0075),俄罗斯符拉迪沃斯托克群体的群体内遗传距离最小(0.0023)。8个群体的群体间遗传距离为0.0027~0.0081,韩国浦项红参群体与韩国浦项黑参群体间的遗传距离最大(0.0081),青岛海参群体、烟台群体与韩国浦项海域的3个海参群体遗传距离较大(0.0054~0.0071),俄罗斯符拉迪沃斯托克群体与韩国群山群体的遗传距离最小(0.0027)。

通过DnaSP软件基于CO I序列信息分析刺参群体间的遗传分化的结果见表5。遗传分化系数(F_{st})反映了群体间的遗传分化程度,当 F_{st} 值在0~0.05时,

表 4 刺参不同群体 16S rDNA、CO I 和 D-loop 片段的遗传多样性指数

Tab.4 The genetic diversity indices of partial 16S rDNA, CO I and D-loop sequence in different population of *A. japonicus*

序列片段 Gene fragment	群体 Population	样本数 Sample number	单倍型数 H Number of haplotype	单倍型 多样性 H_d Haplotype diversity	多态位 点数 S Number of polymorphic	平均核苷酸差异数 k Average number of nucleotide difference	核苷酸 多样性指数 P_i Nucleotide diversity
16S rDNA	青岛太平角 QD	10	3	0.511	2	0.556	0.0010
	烟台长岛 YT	10	5	0.756	5	1.156	0.0021
	韩国木浦黑参 SK-MP-B	10	3	0.600	2	0.667	0.0012
	韩国群山黑参 SK-QS-B	10	4	0.533	4	0.800	0.0015
	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	10	4	0.644	4	1.067	0.0020
	韩国浦项红参 SK-PX-R	10	4	0.533	4	0.956	0.0018
	韩国浦项黑参 SK-PX-B	10	4	0.644	3	0.756	0.0014
	俄罗斯海参 RU	10	3	0.733	2	1.000	0.0018
	总体 Overall	80	16	0.629	16	0.880	0.0016
CO I	青岛太平角 QD	10	8	0.933	16	4.600	0.0070
	烟台长岛 YT	10	5	0.867	10	3.733	0.0057
	韩国木浦黑参 SK-MP-B	10	9	0.978	16	4.156	0.0063
	韩国群山黑参 SK-QS-B	10	8	0.956	13	3.111	0.0047
	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	10	8	0.956	22	5.378	0.0082
	韩国浦项红参 SK-PX-R	10	8	0.956	22	5.867	0.0089
	韩国浦项黑参 SK-PX-B	10	8	0.956	24	6.600	0.0101
	俄罗斯海参 RU	10	5	0.867	10	4.067	0.0062
	总体 Overall	80	38	0.958	62	4.796	0.0073
D-loop	青岛太平角 QD	10	9	0.978	59	17.311	0.0345
	烟台长岛 YT	10	7	0.933	20	5.156	0.0109
	韩国木浦黑参 SK-MP-B	10	9	0.978	30	7.533	0.0159
	韩国群山黑参 SK-QS-B	10	7	0.933	47	14.756	0.0290
	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	10	10	1.000	75	22.067	0.0441
	韩国浦项红参 SK-PX-R	10	10	1.000	58	16.200	0.0323
	韩国浦项黑参 SK-PX-B	10	9	0.978	49	13.778	0.0272
	俄罗斯海参 RU	10	7	0.933	37	16.511	0.0324
	总体 Overall	80	61	0.922	200	6.834	0.0157

表 5 基于 CO I 序列的 8 个刺参群体内(对角线)和群体间的遗传距离(对角线下方)及遗传分化系数(对角线上方)

Tab.5 Genetic distances within (diagonal) and between eight different populations (below diagonal), the fixation index (above diagonal) of *A. japonicus*

群体 Population	CO I							
	青岛 QD	烟台 YT	韩国木浦黑参 SK-MP-B	韩国群山黑参 SK-QS-B	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	韩国浦项红参 SK-PX-R	韩国浦项黑参 SK-PX-B	俄罗斯 RU
青岛 QD	0.0054	-0.0532	0.0424	0.0454	0.0612	0.0362	0.0606	0.0931
烟台 YT	0.0045	0.0040	0.1087	0.1171	0.1206	0.0826	0.1063	0.1598
韩国木浦黑参 SK-MP-B	0.0047	0.0043	0.0036	-0.0168	-0.0192	0.0354	0.0225	0.0249
韩国群山黑参 SK-QS-B	0.0044	0.0040	0.0033	0.0030	0.0016	0.0472	0.0404	0.0278
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	0.0058	0.0054	0.0045	0.0043	0.0055	0.0137	0.0053	-0.0125
韩国浦项红参 SK-PX-R	0.0071	0.0068	0.0062	0.0060	0.0070	0.0084	0.0192	0.0246
韩国浦项黑参 SK-PX-B	0.0069	0.0065	0.0057	0.0055	0.0065	0.0081	0.0075	0.0269
俄罗斯 RU	0.0042	0.0037	0.0030	0.0027	0.0038	0.0054	0.0050	0.0023

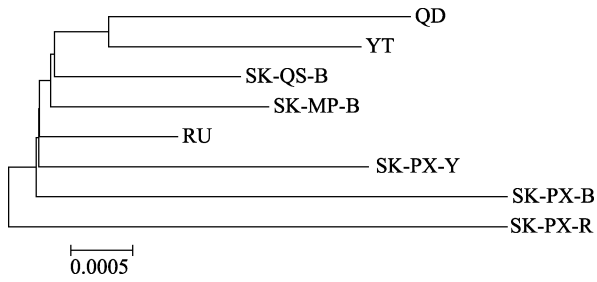


图5 8个群体刺参 CO I 基因的 NJ 系统发育树

Fig.5 Neighbor-joining tree of eight *A. japonicus* groups based on CO I gene

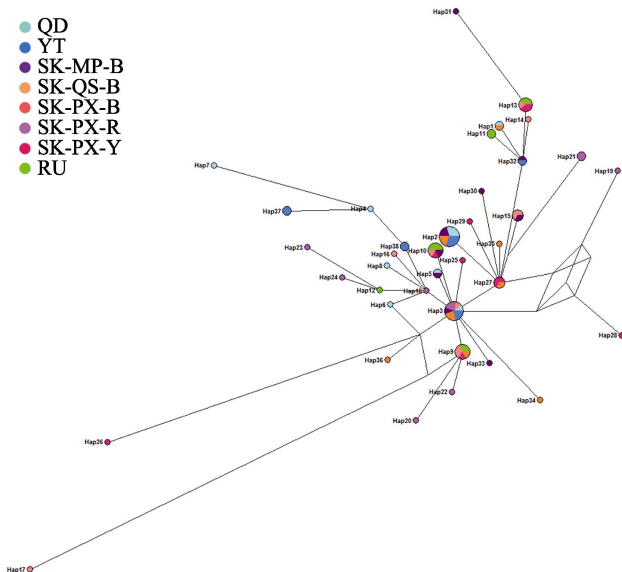


图6 刺参 CO I 基因单倍型网络结构

Fig.6 The haplotype network of *A. japonicus* based on CO I gene

3 讨论

遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和,是评价群体资源状况的一个重要依据。mtDNA 作为核外转录因子,具有演化速度快、母系遗传等优点,常被用于种群遗传结构分析(Liu *et al.*, 2007)。其中,常用到的 mtDNA 标记包括 16S rDNA、Cytb、CO I、D-loop。这些标记曾应用于不同种类鱼(郝君等, 2013; 李大命等, 2017; 孙超等, 2018)、甲鱼(*Onychostoma rara*)(彭珊等, 2009)、海胆属(*Temnopleurus*)(曾晓起等, 2012; 刘晓慧等, 2007)、水母(*Aurelia* sp.)(张瑄妮等, 2015; 王建艳等, 2013)等的遗传结构分析。刺参的线粒体全长包含 37 个基因和 3 个非编码区(李云峰等, 2012)。前期多位研究者分别用 16S rDNA、Cytb、CO I、D-loop 等 mtDNA 片段对不同地理群体的遗传多样性进行了分析。如姬南京等(2014)利用 D-loop 序列的多态性对不同地理群体

仿刺参的遗传结构进行了分析;李颖等(2006)利用 16S rDNA、CO I、IrrRNA-CO I 基因对中国烟台、威海、莱州刺参进行遗传多样性分析及遗传结构分析。为评价不同片段分析刺参遗传多样性的效果,本研究应用 16S rDNA、CO I、D-loop 3 个 mtDNA 片段对 6 个地理种群 8 个群体进行了分析。3 个片段对群体的遗传多样性检测结果表明,基于 3 个序列的各群体的核苷酸多样性指数为 0.0007~0.0441,16S rDNA 序列最为保守,表现出较低的遗传多样性,而 CO I 和 D-loop 遗传多样性较高。这与陈丽梅等(2008)研究的海参 16S rDNA 遗传多样性低于 CO I 基因的遗传多样性一致。相关结果均表明,16S rDNA 不适用于用于同一物种的种内不同群体的遗传结构分析,CO I 和 D-loop 更适于进行种内群体间遗传多样性及遗传结构分析。在海参纲中,相比于 D-loop 序列,CO I 基因信息收录于 NCBI 数据库中的种类及数目较多,更适合于进行比较分析,因而,本研究后续分析选用 CO I 基因。

本研究检测 16S rDNA、D-loop 和 CO I 序列的核苷酸多样性指数分别为 0.0016、0.0157 和 0.0073,多样性指数较低。单倍型分别是 16 种、61 种和 38 种,单倍型多样性分别为 0.629、0.922 和 0.958,单倍型多样性较高,这种核苷酸多样性指数较低,单倍型多样性较高的现象,在其他物种海参线粒体基因片段中也广泛存在(Soliman *et al.*, 2016; Uthicke *et al.*, 2010)。对所获得的 8 个群体的遗传多样性分析结果表明,韩国浦项 3 个不同体色的野生刺参群体遗传多样性指数最高,相比之下,中国青岛和烟台野生群体刺参的遗传多样性较低,这与王鹤等(2016)的研究结果相一致,即韩国刺参群体的遗传多样性比中国群体的遗传多样性丰富。这种状况出现的原因可能是多方面的,首先地理位置差异导致其聚居区域洋流差异及海水温度差异较大,另一方面可能由于在中国青岛和烟台沿海刺参养殖较多,在排水过程中存在苗种逃逸现象,养殖刺参与野生刺参存在一定程度上的基因交流,近亲繁殖现象严重,从而导致青岛和烟台野生刺参出现遗传多样性较低的现象。

利用 CO I 基因对所采集的 8 个群体进行遗传距离分析并构建系统进化树,基于 CO I 基因序列的遗传距离为 0.0023~0.0084。系统进化分析显示,不同群体的遗传结构与地理位置具有一定的相关性,即青岛、烟台、韩国木浦群体和韩国群山的刺参群体采样点为环渤海、黄海、东海相连通的海域地区,其中,青岛、烟台距离最近,在进化树中,这 2 个地理群体的刺参聚为一支,然后再与韩国群山、木浦群体聚为

一支。韩国浦项群体位于韩国东海, 俄罗斯群体采样点位于太平洋沿岸穆拉维约夫-阿穆尔斯基半岛的南端, 临近日本海, 地理距离与其他群体相对较远, 这两地群体位于进化树外侧。本研究结果与潘传燕等(2012)利用微卫星标记进行的相关分析一致, 即种群间相似程度与其地理分布具有一定的相关性。

本研究对采自于韩国浦项的 3 种不同颜色的刺参群体遗传多样性结果分析表明, 该海域的刺参具有较高的遗传多样性, 这可能与其所处的位置受日本暖流及千岛寒流影响, 海水在次表层和中层 2 个层面中不断流动, 运输着来自不同海域的营养物质, 使海域中的浮游生物丰富度增加(王燕, 2015), 致使此地刺参群体变异比较大, 具体的作用机制有待于进一步研究。战爱斌(2007)研究认为, 洋流会促使幼虫甚至成体发生交换, 会促使不同地域的海洋生物的生殖细胞、幼虫甚至成体发生交换, 从而影响不同地理群体的遗传分化(Pante *et al.*, 1992)。韩国浦项 3 个体色群体的遗传分化较小, 还未达到分化成不同种的水平。Zhang 等(2016)利用线粒体全基因组分析得出不同颜色的刺参属于同一物种, 体色差异是由于海洋气候及洋流变化造成的。Sun 等(2010)通过对红色、绿色、黑色刺参的线粒体基因组比较发现, 不同体色刺参分化亦未达到不同物种的分化水平, 这与本研究的结果是一致的。

本研究基于刺参 3 种线粒体 DNA 序列对中、韩、俄沿海野生刺参进行遗传多样性和遗传结构分析结果表明, CO I 基因更适于进行刺参不同地理群体遗传结构分析; 不同地理群体的进化关系跟其地理位置和所处海域的洋流关系密切; 处于同一海域不同体色的刺参虽然其体色差异显著, 但遗传分化不显著。

参 考 文 献

- Arndt A, Marquez C, Lambert P, *et al.* Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1996, 6(3): 425
- Chen LM, Li Q, Li Y. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA and CO I gene and molecular phylogeny of four species of sea cucumber. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(6): 935-942 [陈丽梅, 李琪, 李赞. 4 种海参 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列比较及系统学研究. *中国水产科学*, 2008, 15(6): 935-942]
- Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture. *China fishery statistic yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [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, 2018]
- Hao J, Yang Q, Bao D, *et al.* The sequence comparison of mtDNA D-loop and adjacent regions in six fish species. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(2): 160-165 [郝君, 杨蔷, 鲍迪, 等. 6 种鱼 mtDNA D-loop 及其邻近区段的序列比较分析. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(2): 160-165]
- Ji NJ, Chang YQ, Zhao C, *et al.* D-loop sequences variation and phylogenetic analysis in three geographical populations of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 476-481 [姬南京, 常亚青, 赵冲, 等. 3 个地理群体仿刺参 D-loop 序列的变异及系统发生分析. *水产学报*, 2014, 38(4): 476-481]
- Kerr AM, Janies DA, Clouse RM, *et al.* Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(1): 53-60
- Li DM, Li K, Zhang TQ, *et al.* Genetic polymorphism analysis of Cytb and CO I gene sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 25-31 [李大命, 李康, 张彤晴, 等. 洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) Cytb 和 CO I 基因序列多态性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 25-31]
- Li Y, Liu P, Sun HL, *et al.* Sequence analysis of three mitochondrial genes of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(2): 143-152 [李颖, 刘萍, 孙慧玲, 等. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*) mtDNA 三个基因片段的序列分析. *海洋与湖沼*, 2006, 37(2): 143-152]
- Li YF, Li MY, Wang J, *et al.* Comparative structure of complete mitochondrial genome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2012, 31(8): 454-461 [李云峰, 李梦瑶, 王建, 等. 仿刺参线粒体全基因组序列结构及比较分析. *水产科学*, 2012, 31(8): 454-461]
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452
- Liao YL. *Fauna Sinica Echinodermata Holothuroidea*. Beijing: Science Press, 1997, 148-150 [廖玉麟. *中国动物志 棘皮动物门 海参纲*. 北京: 科学出版社, 1997, 148-150]
- Liu XH, Huang JQ, Zhou ZC, *et al.* Sequence analysis of mtDNA 16S rRNA gene fragments among five species of sea urchins. *Fisheries Science*, 2007, 26(6): 331-334 [刘晓慧, 黄佳琪, 周遵春, 等. 5 种经济海胆线粒体 16S rRNA 基因片段的序列分析. *水产科学*, 2007, 26(6): 331-334]
- Liu ZJ, Cordes JF. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Biotechnology Bulletin*, 2007, 238(1):

- 1–37
- Pan CY, Zang YP, Liao MJ, *et al.* Development of microsatellite DNA markers of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and their application in population genetic variation and structure analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 72–82 [潘传燕, 臧云鹏, 廖梅杰, 等. 仿刺参微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 72–82]
- Pante, M, Williams S, Ablan C, *et al.* Genetic-structure of giant clam (*Tridacna derasa*) populations from reefs in the Indo-Pacific. *Marine Biology*, 1992, 113(2): 231–238
- Peng S, Dai YG. Sequence polymorphism of mtDNA D-loop in the population of the endangered species *Onychostoma rara* from the Qingshui River. *Journal of fisheries of China*, 2009, 33(2): 196–200 [彭珊, 代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性. *水产学报*, 2009, 33(2): 196–200]
- Purcell SW, Mercier A, Conand C, *et al.* Sea cucumber fisheries: Global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries*, 2013, 14(1): 34–59
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- Soliman T, Fernandez-Silva I, Reimer JD. Genetic population structure and low genetic diversity in the over-exploited sea cucumber *Holothuria edulis*, Lesson, 1830 (Echinodermata: Holothuroidea) in Okinawa Island. *Conservation Genetics*, 2016, 17(4): 1–11
- Sun C, Liu HB, Jiang T, *et al.* Comparison of D-loop and cytochrome *b* sequences among different coilia species and their potential use in analysis for the identification of species at early life stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 27–35 [孙超, 刘洪波, 姜涛, 等. 不同鲆属鱼类 Cyt *b* 和 D-loop 序列的比较及其判别早期生活史个体的潜力分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 27–35]
- Sun XJ, Li Q, Kong LF. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants. *Aquaculture*, 2010, 309: 280–285
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876–4882
- Uthicke S, Benzie JA. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: Mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Molecular Ecology*, 2010, 12(10): 2635–2648
- Wan H, Wang TT, Hu LP, *et al.* Microsatellite analysis of genetic characteristics in crosses between Korea population and China population of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2016, 35(1): 60–66 [王鹤, 王田田, 胡丽萍, 等. 仿刺参中国群体与韩国群体杂交子代微卫星标记分析. *水产科学*, 2016, 35(1): 60–66]
- Wang JY, Zhen Y, Wang GS, *et al.* Molecular identification and detection of moon jellyfish (*Aurelia* sp.) based on partial sequencing of mitochondrial 16S rDNA and CO I. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(3): 847–852 [王建艳, 甄毓, 王国善, 等. 基于 mt-16S rDNA 和 mt-CO I 基因的海月水母分子生物学鉴定方法和检测技术. *应用生态学报*, 2013, 24(3): 847–852]
- Wang Y. Microbial community diversity of the surface and intermediate seawater and a columnar sediment of Maluku Strait in Tropical Western Pacific. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [王燕. 热带西太平洋海区中上层海水及马鲁古海峡柱状深海沉积物微生物群落多样性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 1931, 16(2): 97–159
- Zeng XQ, Zhang WF, Gao TX. Molecular phylogenetics of genus *Temnopleurus* based on 16S rRNA and CO I sequences. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(6): 47–51 [曾晓起, 张文峰, 高天翔. 基于线粒体 16S rRNA 与 CO I 基因序列的刻肋海胆属系统发育研究. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(6): 47–51]
- Zhan AB. Development, characterization and application of microsatellite markers in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2007 [战爱斌. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 微卫星标记的筛选及应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007]
- Zhang DN, Zheng LM, He JR, *et al.* DNA barcoding of hydromedusae in northern Beibu Gulf for species identification. *Biodiversity Science*, 2015, 23(1): 50–60 [张瑄妮, 郑连明, 何劲儒, 等. 基于线粒体 CO I 和 16S 片段序列的北部湾北部水螅水母 DNA 条形码分析. *生物多样性*, 2015, 23(1): 50–60]
- Zhang W, Cao ZF, Li YC, *et al.* Taxonomic status of the three color variants in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Evidence from mitochondrial phylogenomic analyses. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27(4): 2330–2333

Genetic Diversity and Population Structure of Different Geographical Populations of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) from China, South Korea and Russia Based on Mitochondrial Genes

WANG Jinjin^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3}①, LI Bin^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3},
RONG Xiaojun^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, GE Jianlong²

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

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 266071;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract In order to explore the genetic structure of sea cucumber populations with different body color characteristics in different sea areas, 16S rDNA, CO I and D-loop gene sequences of eight populations of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) from China, Korea and Russia were amplified by PCR. Genetic diversity and evolutionary relationship of the 8 populations were analyzed by 16S rDNA, CO I and D-loop gene sequences from 80 samples. The results showed that the sequence lengths of 16S rDNA, CO I and D-loop genes were 543 bp, 656 bp and 509~527 bp, respectively. There were 16 polymorphic loci and 16 haplotypes in the 16S rDNA sequence, the haplotype diversity index was 0.629, the nucleotide diversity index was 0.0016, and the average nucleotide diversity was 0.880. A total of 62 polymorphic loci and 38 haplotypes were detected in the CO I sequence, the haplotype diversity index was 0.958, the nucleotide diversity index was 0.0073, and the average nucleotide diversity was 4.796. A total of 200 polymorphic loci and 61 haplotypes were detected in the D-loop sequence. The haplotype diversity index was 0.992, the nucleotide diversity index was 0.0157, and the average nucleotide diversity was 6.834. The results showed that the polymorphic loci, haplotypes and nucleotide diversity of D-loop and CO I sequences were significantly higher than those of 16S rDNA sequences, which were more suitable for the analysis of genetic structure in different populations of the same species. The genetic diversity of the three populations was the highest in the Posco area of South Korea, which may be related to the influence of ocean currents. The CO I gene was used to analyze the genetic differentiation of three body color sea cucumbers collected from Posco, the genetic differentiation coefficient F_{st} was less than 0.05, and there was no genetic differentiation. The results of phylogenetic tree construction using CO I gene showed that the Qingdao and Yantai sea cucumber population were clustered into one branch, then the Korean Mokpo black sea cucumber population clustered into one branch, from the inner outward are successively the Russian population and the Korea Posco population. The results showed that the populations with different body colors were poorly differentiated, and the genetic distances and clustering of different populations had the strongest correlation with their geographical distribution.

Key words *Apostichopus japonicus*; 16S rDNA; D-loop; CO I ; Genetic diversity

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181211001

http://www.yykxjz.cn/

杨凯, 黄智慧, 马爱军, 刘晓菲, 杨双双. 高温胁迫条件下大菱鲂肾脏转录组研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 86–95
Yang K, Huang ZH, Ma AJ, Liu XF, Yang SS. Transcriptome study of kidney of turbot under high-temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 86–95

高温胁迫条件下大菱鲂肾脏转录组研究*



杨 凯^{1,2,3} 黄智慧^{1,3} 马爱军^{1,3①} 刘晓菲^{1,3} 杨双双^{1,3}

(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 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

摘要 为探索大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)耐高温的分子机制, 筛选耐高温相关基因, 采用高通量测序平台(IlluminaHiSeq-2500)分别对 5 个不同高温处理组的大菱鲂肾脏组织开展转录组测序, 进行生物信息学分析, 包括 GO(基因功能注释)、SSR(简单重复序列)分析等。结果显示, 通过组装得到 Unigenes 总数目为 68525, 长度范围为 201~23456 bp, 平均长度为 1124 bp, N50 长度为 2316 bp。将 Unigenes 分别在 Nr、Swissprot、KEGG、KOG、GO 数据库进行序列比对及功能注释, 共注释 25498 条, 其中, Nr 数据库注释到的 Unigenes 最多; 按 GO 功能分类, 共分为细胞组分、分子功能及生物学过程 3 类, 包括 56 个功能组, 其中, 大量 Unigenes 与细胞进程、代谢过程、催化活性、生物调节、应激反应相关。将 Unigenes 进行 pathway 注释, 归属于 218 条代谢通路, 分为 5 类 KEGG 途径: 代谢途径、遗传信息处理、细胞过程、环境信息和生物系统。进行转录因子分析, 共检测到 65 类转录因子, 其中, C2H2 锌指蛋白家族的基因数目最多。通过对不同温度胁迫下基因表达谱结果进行分析, 不同温度组之间存在着显著差异, 在不同温度胁迫组中, 20℃组与 28℃组存在差异最大, 差异基因达到 4734 个, 其中, 上调基因 3386 个, 下调基因 1348 个。本研究建立了大菱鲂热应激肾脏转录组数据库, 为大菱鲂高温胁迫分子机理研究提供了参考数据。

关键词 大菱鲂; 肾脏; 高温胁迫; 转录组; 生物信息学分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0086-10

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一(雷霖霖等, 2002)。大菱鲂为冷温性鱼类, 对温度等环境指标要求较严, 适宜生长水温为 12℃~19℃; 通常在良好的充气和流水

条件下, 耐受高温可达 25℃~26℃(马爱军等, 2012), 但对夏季高温耐受能力较差。因受水温条件限制, 我国北方主要采用“养殖大棚+深井海水”模式进行养殖, 但近年来, 随着地下海水的匮乏, 南北接力养殖

* 现代农业产业技术体系专项(CARS-47-G01)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“鳌山人才”培养计划项目(2017ASTCP-OS04)、国家自然科学基金项目(41706168)、山东省良种工程(2016LZGC031)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-JC0302)共同资助 [This work was supported by Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-47-G01), Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2017ASTCP-OS04), National Natural Science Foundation of China (41706168), Good Seed Project of Shandong Province (2016LZGC031), and Chinese Academy of Fishery Sciences Basal Research Fund Under Contract (2016HY-JC0302)] 杨 凯, E-mail: 791590743@qq.com

① 通讯作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-12-11, 收修改稿日期: 2019-01-03

模式的出现, 养殖生产中对大菱鲂耐高温新品种的需求日益增加(关键等, 2013)。另外, 应用分子生物学手段, 加快开展大菱鲂耐热性状的分子机制研究, 对于培育耐高温的养殖品种具有较大意义。

转录组是指生物体的细胞或组织在特定的状态下基因组所转录的全部 mRNA, 反映了基因在不同生命阶段、生理状态、组织类型以及环境条件下表达的情况(罗辉等, 2015)。生物抗逆性受多个信号转导途径的调控, 需要多基因协同表达(崔文晓等, 2017), 因此, 开展转录组测序分析, 筛选关键信号通路及主效基因、转录因子等, 并利用关键转录因子的调控作用促使多个功能基因表达来提高鱼类机体的抗逆性, 是一种非常有效的方法和途径。近年来, 从转录水平分析生物对环境胁迫的分子响应机制的相关研究屡见不鲜。如在水生生物中, Bilyk 等(2014)利用转录组测序分析, 探索了博氏南冰鱧 (*Pagothenia borchgrevinki*) 应对温度胁迫的分子机制, 并首次推测性别会影响鱼类应对温度胁迫时基因的转录; Huang 等(2018)在热应激条件下对虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 头肾进行了转录组表达谱研究, 但仅开展了常温组(18)、高温组(24) 2 个温度点的比较分析。

本研究为了尽可能完整、系统地获得热应激对大菱鲂肾脏影响的数据信息, 通过增加温度点, 对头肾组织进行转录组测序和生物信息学分析, 包括基因功能注释、SSR(简单重复序列)分析等, 探讨差异基因的表达情况, 为建立大菱鲂热应激条件下的物质代谢途径, 构建信号转导通路模型, 及发掘新的耐温基因提供一定的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 养殖实验及样品采集

实验用大菱鲂养殖于山东省烟台市开发区天源水产有限公司, 均为人工繁育的健康幼鱼。幼鱼为随机挑选, 平均体重为(100±12.3) g, 于实验室玻璃水缸(1 m 直径, 1 m 深)暂养 7 d。根据实验经验, 共设计 5 个实验温度: (13±1)°C(常温 CT)、20°C(T1)、23°C(T2)、25°C(T3)和 28°C(T4)。升温方法参照 Diegane 等(2007)并优化: 从常温(13±1)°C 按每 12 h 增加 1°C 的速度升高至实验水温, 每个处理组设 3 个平行组, 每组投放 15 尾大菱鲂幼鱼。驯养与实验期间, 每日早晚各投喂 1 次自制人工饵料, 并换水 1 次。采用静水法, 自动恒温加热器控温; 到达实验温度并维持 12 h 后, 每个平行组取 3 尾鱼体肾脏组织, 即每个处理组共取 9 尾幼鱼, 将 9 个样本放入 1.5 ml EP 管中

用液氮速冻, 置于-80°C 保存备用。

1.2 RNA 提取

将对对照组及处理组中的每个平行组的 3 个样本混合均匀后, 提取样品总 RNA, 即每组处理 3 份生物学重复。提取方法: 取肾脏组织在液氮中研磨成粉末, 用动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 核酸检测仪(Thermo 公司, 美国)检测 RNA 纯度, 用核酸分析仪 Agilent2100 (安捷伦科技公司, 美国)检测总 RNA 浓度及 RNA 质量。

1.3 肾脏转录组文库构建及测序

RNA-Seq 文库制备及测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成, 测序平台为 Illumina HiSeq™2500, 采用双末端测序方法。

1.4 序列拼接与功能注释、富集

去除原始序列数据中含有接头及低质量的序列后, 得到 Clean reads, 并进行 De novo 组装。使用短 reads 组装软件 Trinity 将转录组从头组装成 Unigenes 数据集。通过 blastx 将 Unigenes 序列比对到 Nr、SwissProt、KEGG 和 COG, 得到 Unigenes 的蛋白功能注释信息。对所有 Unigenes 进行 GO 功能分类统计、KEGG Pathway 注释及通路富集分析。

1.5 预测编码蛋白框和转录因子

按 Nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG/KOG 的优先级顺序将 Unigenes 序列与以上蛋白库做 blastx 比对(E 值<1×10⁻⁵), 利用 Hmsearch 将 Unigenes 的 ORF 比对到 TF 数据库(Animal TFdb)预测 TF, 并将预测的 TF 按照家族类型分类。

1.6 微卫星(SSR)分析

简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)又称微卫星 DNA, 利用 MISA 软件对转录组的所有 Unigenes 进行搜索, 查找 SSR。搜索标准为: 单、一、二、三、四、五、六核苷酸基序(Motif)至少重复次数分别为 10、8、5、4、3、3, 对查找的 SSR 类型进行特征分析(贾新平等, 2014)。

1.7 基因表达差异分析

Unigene 表达量的计算使用 RPKM 法(Reads Per kb per Million reads)计算, RPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响, 计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差

异。分组之间的差异基因统计,利用 FDR 与 \log_2FC 筛选,筛选条件为 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$,其中,FC (Fold Change, FC) 标示两样品间表达量的比值。得到差异表达基因之后,对差异表达基因进行 GO 功能富集分析,KEGG Pathway 注释及通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据组装

利用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序技术对大菱鲆不同温度胁迫条件下肾脏组织开展转录组测序分析,1 个对照组与 4 个实验温度组共获得 Raw reads

及去除杂质后的 Clean reads (表 1)。由表 1 可以看出,共得到 224,473,610 个 Clean reads 片段,包含了 99.7 Gb 的序列信息,GC% 含量平均值为 51.05%。在测序质量值统计评估方面,碱基 Q30 为 88.65%,由以上数据得出,该转录组测序数据量和质量都较高,可为后续的组装提供可靠的原始数据。

采用 Trintiy 软件对 Clean reads 组装,共获得 Unigenes 总数目为 68525,长度范围为 201~23456 bp,平均长度 1124 bp, N50 长度 2316 bp。组装数据统计见表 2。Unigenes 长度分布图见图 1,结果显示,组装完整性较高,从而为后续信息学注释及差异基因的筛选奠定了基础。

表 1 大菱鲆高温胁迫转录组测序数据统计
Tab.1 Statistics of transcriptome sequencing data of heat stress of turbot

样品名称 Sample	Raw reads 总数 Total raw reads	Clean reads 总数 Total clean reads	GC 含量 GC percentage(%)	Q20 Q20 percentage(%)	Q30 Q30 percentage(%)
CK	42,653,941	41,620,119	50.7	95.6	89.1
T1	42,406,232	41,045,886	51.2	95.3	88.4
T2	43,270,232	42,340,163	50.7	95.8	89.3
T3	44,316,876	43,130,094	51.1	95.5	88.5
T4	57,697,730	56,337,348	51.2	95.6	88.9

表 2 大菱鲆高温胁迫转录组组装数据统计
Tab.2 Statistics of transcriptome assembly data of heat stress of turbot

Unigene 总数 Unigene total number	Unigene 最大长度 Unigene max-length (bp)	Unigene 最小长度 Unigene min-length (bp)	Unigene 平均长度 Unigene average length (bp)	N50 长度 N50 length (bp)
68525	23456	201	1124	2316

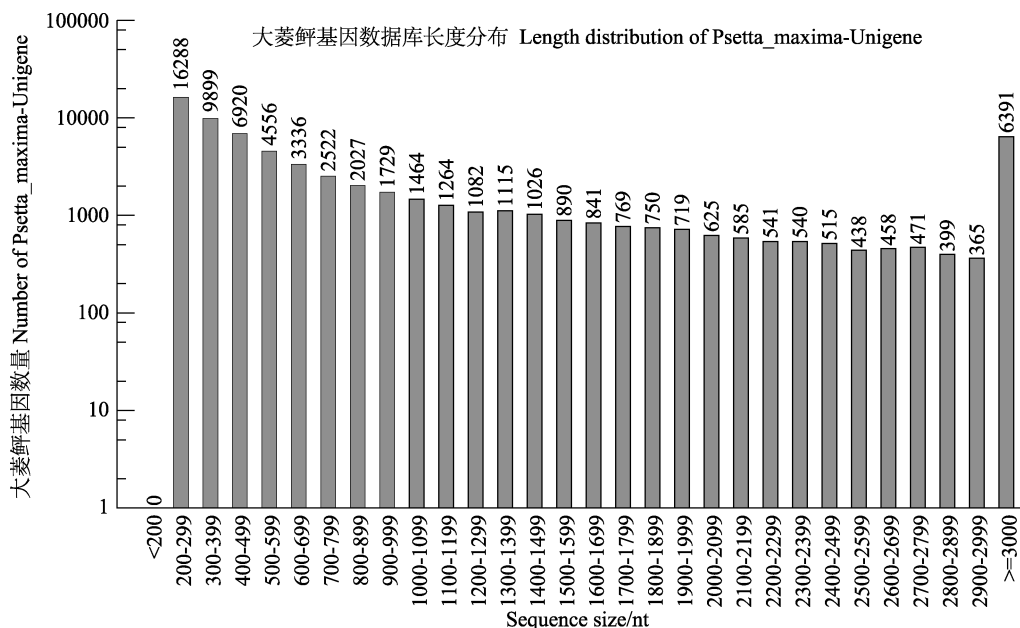


图 1 Unigene 长度分布

Fig.1 The statistics of sequence length of unigenes

2.2 大菱鲂肾脏转录组 Unigenes 的功能注释、分类和代谢途径分析

2.2.1 Unigenes 的注释及序列相似性分析 将 Unigenes 分别在 Nr、Swissprot、KEGG、KOG、GO 数据库进行序列比对及功能注释, 共注释 25498 条 Unigenes。其中, Nr 数据库注释到的 Unigenes 数量最多, 具体结果分别为: Nr 库 25442 条, Swissprot 库 21179 条, KEGG 库 15488 条, KOG 库 17111 条, Go 库 12760 条(表 3)。

表 3 Unigene 的注释结果
Tab.3 The result of Unigene's annotation

数据库 Database	注释 Unigene 数目 Number of annotated Unigene	注释 Unigene 百分比 Percentage of annotated Unigene(%)
Nr	25442	37.1
Swissprot	21179	30.9
KOG	17111	24.9
GO	12760	18.6
Kegg	15488	22.6
Annotation genes	25498	37.2
Total unigenes	68525	100

利用 Blastx 将组装出来的 Unigene 序列与 Nr 数据库进行比对, 结果显示, 功能注释匹配的物种中, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)所占的比例最高(29.2%), 随后依次是雀鲷(*Stegastes partitus*) (23.1%)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (5.3%)、革首南极鱼(*Notothenia coriiceps*) (4.7%)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) (4.7%)等物种。

2.2.2 Unigenes 的 GO 分类 采用 Blast2Go 软件, 结合 GO 数据库对大菱鲂的 Unigene 进行功能分类, 从宏观上分析大菱鲂热应激胁迫后表达基因的功能分布特征。在 Go 分类体系中, 共有 3 个 Ontology, 分别描述基因的生物学过程(Biological process)、细胞组分(Cellular component)和分子功能(Molecular function)。结果表明, 共有 12760 条 Unigenes 获得 GO 注释, 划分为 56 个功能组, 并对每个功能组涉及的 Unigene 进行统计分析(图 2)。注释到 Molecular function 上的基因数目最多, 为 10053 个, 其次是 Biological process 9644 个, Cellular component 6270 个。其中, 细胞进程 6041 个, 单生物代谢过程 5240 个, 代谢过程 4842 个, 催化活性 4681 个, 细胞 3874 个, 生物调节 3535 个, 应激反应 1840 个和信号转导 1334 个功能组中涉及的 Unigenes 较多。这一分类结果显示了大菱鲂热应

激过程中基因表达谱的总体情况。

2.2.3 Unigenes 的 KOG 功能分类 蛋白质直系同源数据库(COG/KOG)对基因产物进行直系同源分类。研究显示, 大菱鲂肾脏转录组共获得 17111 个注释信息, 可归属于 25 类, 并对每类 Unigenes 进行统计分析。其中, 信号转导机制为 8661 个, 一般功能预测为 6528 个, 翻译后修饰、蛋白质折叠和分子伴侣为 3346 个, 转录为 2435 个, 细胞内转运、分泌和小泡运输为 2174 个, 细胞构架为 1925 个, 其他类别的基因表达丰度均各不相同(图 3)。

2.2.4 Unigenes 的 KEGG 分析 结合 KEGG 数据库注释信息, 进一步将大菱鲂肾脏 Unigenes 进行 Pathway 注释, 其中, 有 15488 个 Unigenes 获得对应的 Ko 编号, 归属于 218 条代谢通路, 分类为 5 类 KEGG 途径: 代谢途径、遗传信息处理、细胞过程、环境信息和生物系统。其中, 代谢途径主要包括碳水化合物代谢通路、氨基酸代谢通路、能量代谢通路、脂类代谢通路、核苷酸代谢通路等, 占据 KO 注释 Unigenes 的 25.4%(3941 条); 遗传信息处理主要包括翻译, 折叠、分选和相互作用, 转录, 复制和修复等, 共注释到 1907 条 Unigenes, 占 12.3%; 细胞过程主要由转运和代谢作用, 细胞生长与死亡, 运输分解代谢, 细胞连接等组成, 共注释到 2927 条 Unigenes, 占 18.9%; 环境信息主要包括信号转导, 信号分子与相互作用, 共注释 3230 条 Unigenes, 占 20.8%; 此外 2161 条 Unigenes 被注释到生物系统中。Unigenes 数量最多的 20 个代谢途径见图 4, 涉及细胞内吞、信号转导、能量代谢、循环系统、细胞连接等。

2.3 CDS 分析

通过 Blast 比对得到 CDS 核酸和氨基酸序列分布, ESTscan 预测编码区的核酸和氨基酸序列的长度分布(图 5)。

2.4 Unigenes 的转录因子分析

转录因子是能够结合在基因上游特异的核苷酸序列上的蛋白质, 能调控其靶基因的转录。对大菱鲂肾脏 Unigenes 进行转录因子分析, 共检测到 65 类转录因子。其中, C2H2 锌指蛋白家族的基因数目最大, 达到 429 个 Unigenes; 调节动物生长发育、响应逆境胁迫相关的 Homeobox 同源异位基因, 有 101 个 Unigenes; 与 Bhlh 家族相关的有 86 个 Unigenes; 参与抗逆响应的 TF-Bzip 家族相关的 Unigenes 有 83 个; 参与组织损伤修复、细胞迁移、再生等生命进程的 HMG

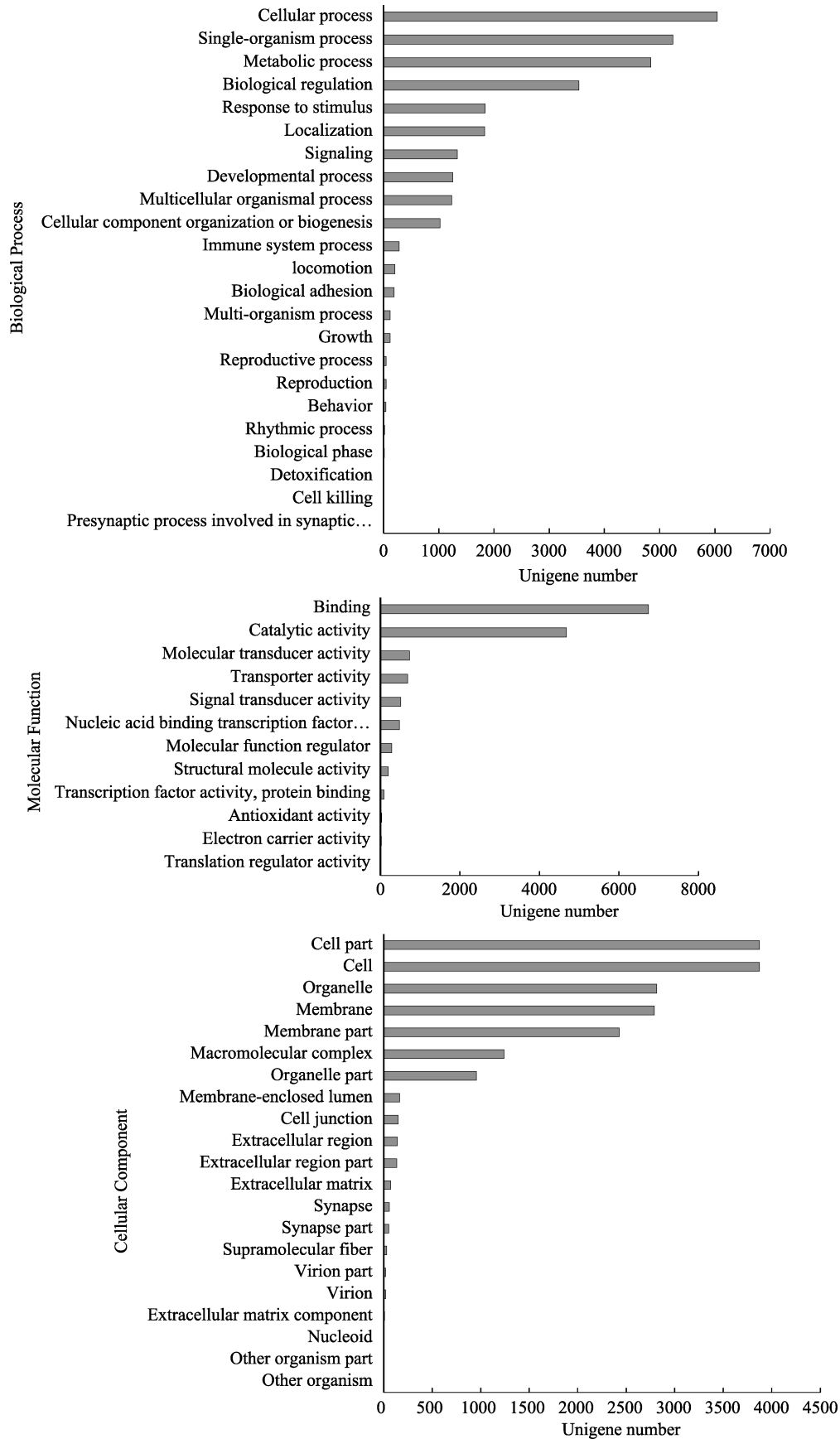


图 2 Unigenes 的 GO 功能分类图
Fig.2 GO functional categories of Unigenes

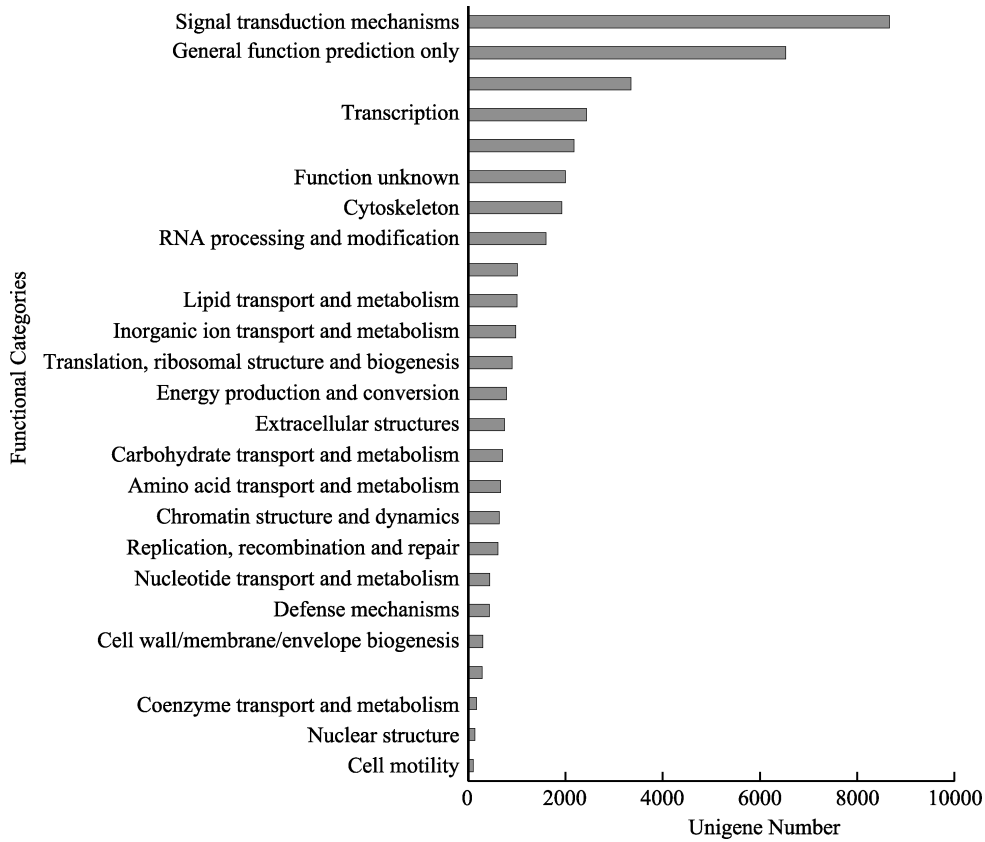


图 3 Unigenes 的 KOG 功能分类
Fig.3 KOG function classification of Unigenes

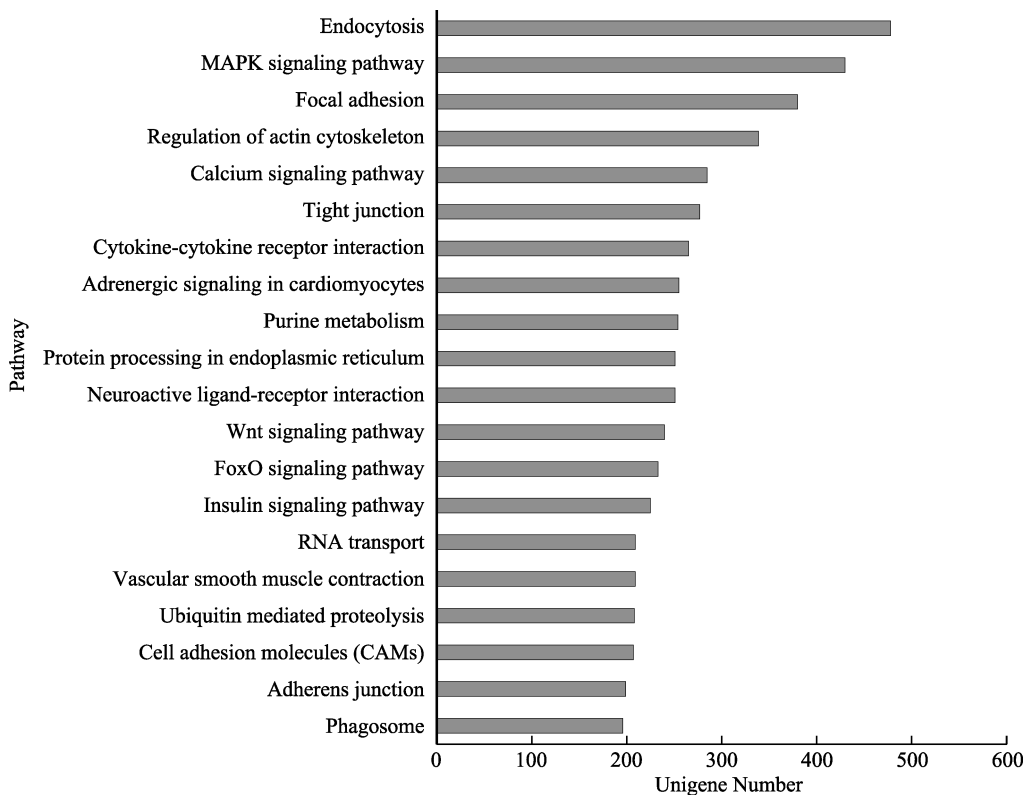


图 4 Unigenes 的 KEGG 功能分类
Fig.4 KEGG function classification of Unigenes

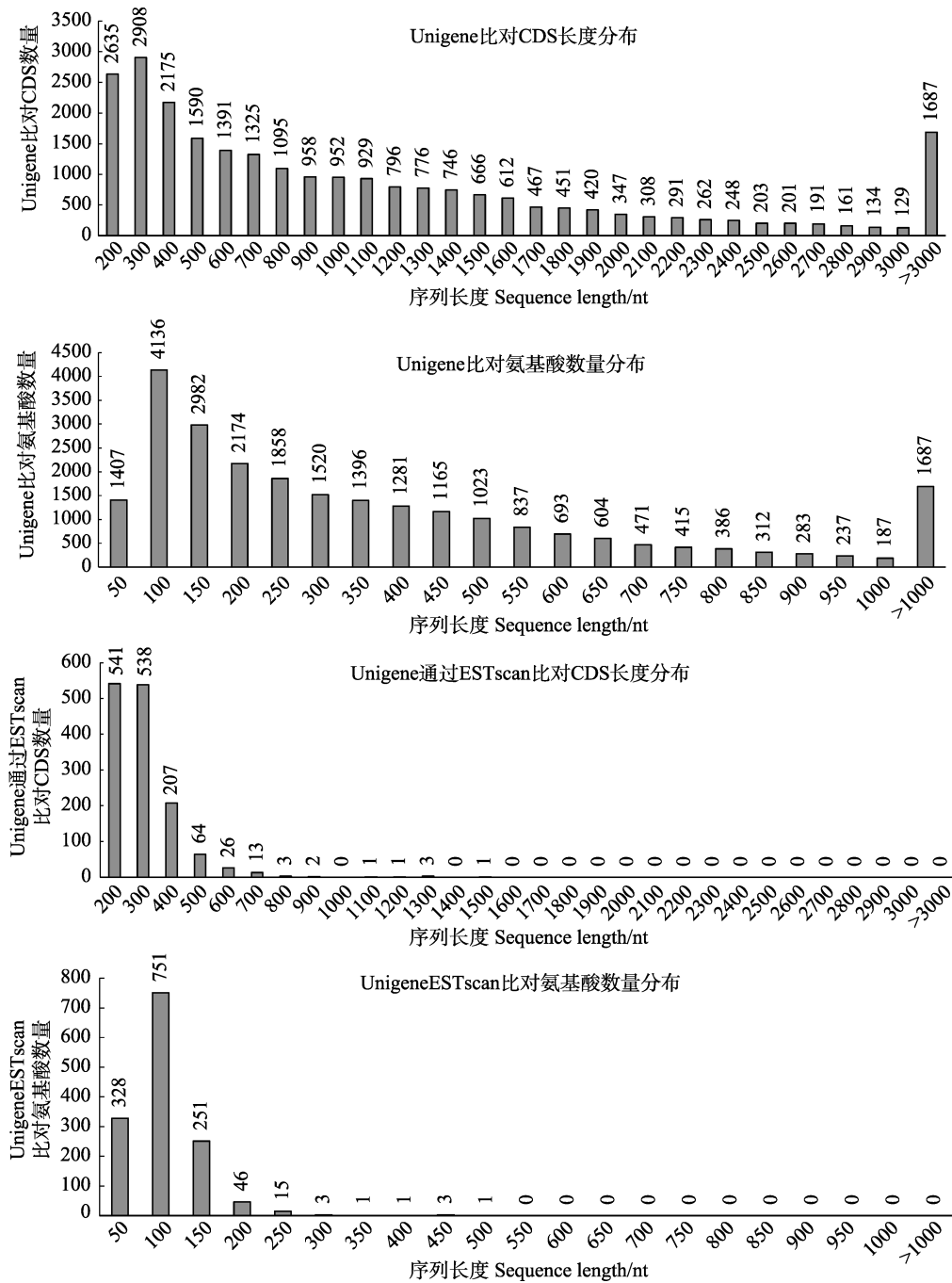


图5 CDS分析

Fig.5 CDS analysis

基因有 55 个 Unigenes; MYB 家族 42 个, ZBTB 家族 38 个; Fork-head 家族 34 个, THR-like 家族 33 个; 其余家族基因数目相对较少。

2.5 SSR 分析

对大菱鲆肾脏转录组的 68525 条 Unigenes 进行 SSR 位点搜索, 共检测到 21177 个 SSR 位点。SSR 类型丰富, 其中, 包括二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复, 各碱基重复数量分别为 1100、

7604、1941、393 和 231 个。

2.6 基因在大菱鲆不同温度胁迫中的表达分析

对 5 组不同高温胁迫环境(CT: 常温, T1: 20°C, T2: 23°C, T3: 25°C, T4: 28°C)的基因进行表达比较分析, 结果显示(图 6), CT 组同 4 个高温组均表现出较大的差异, 而且上调基因占较大比重; T1 组与 T4 组存在较大的差异, 差异基因达到 4734 个, 其中, 上调基因 3386 个, 下调基因 1348 个; T1 与 T3 组差异

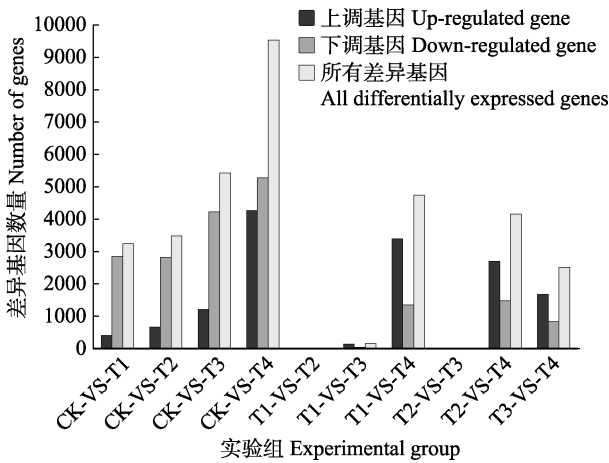


图 6 差异基因统计

Fig.6 Statistics of different expression genes

表达基因 163 个, 其中, 上调基因 131 个, 下调基因 32 个; T2 与 T4 组差异基因 4157 个, 其中, 上调基因 2691 个, 下调基因 1466 个; T3 与 T4 组差异表达基因 2501 个, 其中, 上调基因 1673 个, 下调基因 828 个; 而 T1 与 T2 组、T2 与 T3 组的差异表达基因较少, 分别为 25 和 36。

3 讨论

作为变温性动物, 鱼类对环境温度等指标要求较严, 其中, 热应激是影响鱼体生长发育最严重的环境胁迫(周朝伟等, 2018), 鱼类在长期进化过程中对热应激的响应形成了一套完善的应答协调机制, 因此, 揭示其热应激胁迫的分子机制, 培育出耐高温的新品种, 在目前全球气候变暖的背景下显得尤为迫切。

转录组高通量测序是功能基因组研究的一个重要技术手段, 通过数字基因表达谱技术, 可以将不同组织、各个发育阶段以及逆境胁迫下的差异表达基因快速检测出来, 在功能基因组学研究方面正在发挥着重要的作用(王申昌等, 2016)。该技术目前在水产动物中的应用显著增加, 对于鱼类疾病、免疫、生长、抗逆、系统进化和生物毒理过程及机理等方面的研究都有极大帮助(陈琼等, 2014; 陈之航等, 2017)。为尽可能完整、系统地获得热应激对大菱鲆肾脏影响的转录组数据信息, 本研究选取 5 个不同的温度梯度处理, 开展了大菱鲆高温胁迫转录组分析。

通过对不同温度胁迫下基因表达谱结果进行分析, 不同温度组之间存在较显著的差异, 尤其是 CT、T1、T3 和 T4 组, 4 个温度组的差异表达基因较多, 而 T2 与 T1、T3 组之间的差异基因个数较少。我们推测, 随着温度的升高, 鱼体的生理机能发生不断的

变化从而适应胁迫, 当到达某个温度区域时, 机体将处于一个平衡态, 机体变化相对较小, 但如果温度继续升高, 则打破这一平衡, 继续调整, 从而适应胁迫。

逆境条件下, 许多胁迫相关基因在转录水平都会有所增加, 其主要原因是转录因子对目标基因启动子的顺式作用元件的特异结合(赵丽娟等, 2016)。本研究对大菱鲆肾脏热应激转录因子进行了分析, 共检测到 65 类转录因子, 为深入研究大菱鲆热应激适应机制提供分子基础和依据。其中, C2H2 锌指蛋白家族的基因数目最多, 其又称为 TFIIIA 类型的锌指蛋白(TFIIIA 因子是 RNA 聚合酶 III 转录 5S rRNA 基因所必需), 在真核细胞中广泛富集的锌指蛋白之一(Laity *et al*, 2001)。在植物中研究较多, 主要参与胁迫应答信号转导和细胞过程, 如 ZAT7 基因在盐胁迫下的表达主要在根中有所增高(Yilmaz *et al*, 2007); TF III A 型锌指蛋白 SCOF-1, 作为冷调控基因(Cold-regulated, COR)的正调节物, 通过与脱落酸效应元件相互作用来调控 COR, 增强植物的耐寒能力(Kim *et al*, 2001); 从牵牛花中得到的锌指蛋白 ZPT2-3, 其在植物体内的过表达可以增强耐寒能力(Sugano *et al*, 2003)。在人类疾病方面也有相关的研究报道, 其对信号通路的下游基因表达有着明显的调控作用, 可以选择性结合特异的靶结构, 调控细胞的生长、增殖、分化和凋亡等(雷陈, 2010)。但在水生生物中的研究却极少, 本文研究结果显示, 高温胁迫条件下, C2H2 锌指蛋白家族 Unigene 数目远远高于其他转录因子, 其中, 差异表达基因数为 108 个, 表明 C2H2 锌指蛋白家族的部分基因在大菱鲆热胁迫条件下发生表达水平的变化, 哪些基因与热应激相关? 这些基因是如何参与胁迫应答信号转导过程的? 目前, 在海水鱼类未见报道, 本课题组将在今后的研究中继续深入开展。

本研究首次利用 Illumina Hiseq 高通量测序技术对大菱鲆肾脏组织在 5 个不同温度胁迫条件下的 cDNA 文库进行测序, 建立了大菱鲆热应激肾脏转录组数据库, 相关数据更加完整、系统, 为今后开展海水鱼类热应激胁迫分子调控机制提供数据支撑, 也为耐高温选育工作提供更多新的功能基因和分子标记。

参 考 文 献

- Bilyk KT, Cheng CHC. RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic *Cryopelagic nototheniid* fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Marine Genomics*, 2014, 18: 163–171
- Chen Q, Gu ZF, Wang AM, *et al*. Data reassembling reveals

- more information of transcriptome for *Pinctada fucata martensii* Dunker. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 97–102 [陈琼, 顾志峰, 王爱民, 等. 马氏珠母贝转录组数据的重新组装. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 97–102]
- Chen ZH, Dong JJ, Sun CF, *et al.* cDNA cloning and analyses of two myosin heavy chain isoforms of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on transcriptome sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 51–61 [陈之航, 董浚键, 孙成飞, 等. 基于转录组测序对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) 2种肌球蛋白重链基因的克隆与分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 51–61]
- Cui WX, Ma AJ, Huang ZH, *et al.* Effects of salinity stress on the mRNA expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 32–40 [崔文晓, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) PRL 基因、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因对盐度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 32–40]
- Diegane N, Chen YY, Lin YH, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22: 686–694
- Guan J, Liu HJ, Guan SG, *et al.* Selection of high temperature broodstocks of turbot by using population selection method. *Scientific Fish Farming*, 2013(3): 50–51 [关键, 刘洪军, 官曙光, 等. 使用群体选育法选择大菱鲆耐高温亲鱼群体. *科学养鱼*, 2013(3): 50–51]
- Huang JQ, Li YJ, Liu Z, *et al.* Transcriptomic responses to heat stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 32–40
- Jia XP, Sun XB, Deng YM, *et al.* High-throughput sequencing and analysis of the transcriptome of the bird's nest fern. *Journal of Horticulture*, 2014, 41(11): 2329–2341 [贾新平, 孙晓波, 邓衍明, 等. 鸟巢蕨转录组高通量测序及分析. *园艺学报*, 2014, 41(11): 2329–2341]
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, *et al.* A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant Journal*, 2001, 25(3): 247–259
- Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(1): 39–46
- Lei C. Initial exploration of the function of ZNFD-a C2H2-type zinc finger protein. Master's Thesis of Suzhou University, 2010 [雷陈. C2H2 型锌指蛋白——ZNFD 的生物学功能初探. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Lei JL, Men Q, Wang YG, *et al.* The factory farming mode of Dalingyu “greenhouse shed + deep well seawater”. *Marine Aquatic Research*, 2002, 23(4): 1–7 [雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. *海洋水产研究*, 2002, 23(4): 1–7]
- Luo H, Ye H, Xiao SJ, *et al.* Application of transcriptomics technology in aquatic animal research. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598–607 [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用. *水产学报*, 2015, 39(4): 598–607]
- Ma AJ, Huang ZH, Wang XA, *et al.* Breeding and temperature resistance performance evaluation of high temperature resistant line of turbot. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 797–804 [马爱军, 黄智慧, 王新安, 等. 大菱鲆耐高温品系选育及耐温性能评估. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 797–804]
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, *et al.* Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal*, 2003, 36(6): 830–841
- Wang SC, Hu SL, Cao Y, *et al.* High-throughput transcriptome sequencing and differentially expressed gene analysis of Liangshan Cizhu. *North China Agricultural Journal*, 2016, 31(3): 65–71 [王身昌, 胡尚连, 曹颖, 等. 梁山慈竹高通量转录组测序及差异表达基因分析. *华北农学报*, 2016, 31(3): 65–71]
- Yilmaz SC, Morsy MR, Song LH, *et al.* The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(12): 9260–9268
- Zhao LJ, Yi XY, Zeng YL. Research progress on plant stress related C2H2 zinc finger protein. *Molecular plant breeding*. 2016, 14(3): 578–585 [赵丽娟, 易小娅, 曾幼玲. 植物逆境相关 C2H2 型锌指蛋白的研究进展. *分子植物育种*, 2016, 14(3): 578–585]
- Zhou CW, Hu XW, Lei L, *et al.* Effects of heat stress on biochemical indices and HSP70 mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 65–71 [周朝伟, 胡续雯, 雷璐, 等. 热应激对银鲫生化指标和 HSP70 mRNA 表达的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 65–71]

Transcriptome Study of Kidney of Turbot under High-Temperature Stress

YANG Kai^{1,2,3}, HUANG Zhihui^{1,3}, MA Aijun^{1,3}①, LIU Xiaofei^{1,3}, YANG Shuangshuang^{1,3}

(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; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract In order to explore the molecular mechanism of high-temperature tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* L., and to screen heat tolerance related genes, the IlluminaHiSeq-2500 platform was used to sequence the transcriptome of five turbot kidneys from five different heat treatments, through bioinformatics analysis, including GO (gene function annotation), SSR (simple repeat sequence) analysis, etc. The main results obtained were as follows: the total number of Unigenes obtained by assembly was 68525, the length range was 201~23456 bp, the average length was 1124 bp, and the length of N50 was 2316 bp. Sequence alignment and function annotation of Unigenes was conducted in Nr, Swissprot, KEGG, KOG, and GO databases. A total of 25,498 clusters were obtained, of which the Nr database noted the most Unigenes; and according to GO function classification, had three kinds of cell components, molecular functions, and biological processes, including 56 functional groups. A large number of Unigenes were related to cell processes, metabolic processes, catalytic activities, biological regulation, and stress response. Further, Unigenes were classified into 218 metabolic pathways and five KEGG pathways: metabolic pathway, genetic information processing, cellular processes, environmental information, and biological systems. A total of 65 transcription factors were detected by transcription factor analysis, with the C2H2 Zn finger protein family having the highest number of genes. Through the analysis of gene expression profiles under different temperature stress, there were significant differences among different temperature groups, In the 20°C and 28°C groups, the difference was the largest; 4734 genes, of which 3386 were up-regulated and 1348 were down-regulated. In this study, we established a database of renal transcriptional groups in turbot under heat stress, which provides abundant data for the study of molecular mechanisms of heat stress in turbot.

Key words Turbot; Kidney; Hyperthermia stress; Transcriptome; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181212001

http://www.yykxjz.cn/

谭杰, 李凤辉, 陈四清, 马添翼, 陈爱华, 葛建龙, 孙慧玲, 王亮. 不同培育水温和饲料对刺参人工促熟效果的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 96-103

Tan J, Li FH, Chen SQ, Ma TY, Chen AH, Ge JL, Sun HL, Wang L. Effect of temperature and diet on the reproductive condition of sea cucumber *Apostichopus japonicus* broodstock. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 96-103

不同培育水温和饲料对刺参人工促熟效果的影响*

谭杰^{1,2} 李凤辉¹ 陈四清^{1,2} 马添翼³ 陈爱华⁴
葛建龙^{1,2} 孙慧玲¹ 王亮^{5①}

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. 威海市文登区海洋与渔业局 威海 264400; 4. 山东省乳山市水产技术推广站 威海 264500;
5. 烟台市海洋经济研究院 烟台 264003)

摘要 本文采用单因素分析方法,研究了不同培育水温和饲料对刺参(*Apostichopus japonicus*)人工促熟效果的影响。在实验条件下,分别设置2种升温模式(水温从5℃逐渐升至12℃后恒温培育,从5℃逐渐升至15℃后恒温培育)和3种不同饲料[鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)粉组:50%鼠尾藻粉+50%海泥;海带(*Laminaria japonica*)粉组:50%海带粉+50%海泥;混合藻粉组:25%鼠尾藻粉+25%海带粉+50%海泥]。实验过程中,定期测量刺参体壁粗成分;实验结束后,分析雌性刺参性腺粗成分,同时检测雌参的繁殖力指标和子代质量指标。结果显示,在15℃水温培育的雌参性腺中粗蛋白和粗脂肪含量高于在12℃水温培育的雌参,分别为(62.54±1.78)%和(10.83±1.04)%。15℃水温下培育的雌参性腺指数、排放率和平均排卵量均高于12℃水温下培育的雌参,分别为(6.87±2.02)%、(16.00±2.31)%和(312.0±59.3)×10⁴粒。饲料实验中,鼠尾藻粉和混合藻粉组雌参性腺中的粗蛋白含量显著高于海带粉组($P<0.05$),为(60.82±0.52)%和(59.18±1.26)%,海带粉组雌参性腺中粗脂肪含量为(8.82±1.55)%,高于鼠尾藻粉和混合藻粉组。3个饲料实验组的雌参在繁殖力指标上差异不显著,但混合藻粉组的雌参繁殖力指标最高。混合藻粉组受精卵孵化率和早期幼体体长均显著高于海带粉组。研究表明,采用15℃水温培育的雌参繁殖力高于12℃水温培育的雌参,但二者产生的子代质量差异不显著;在实验范围内,采用不同饲料培育的雌参繁殖力指标没有显著差异,但混合藻粉组亲参所产子代质量高于鼠尾藻粉组和海带粉组。

关键词 刺参; 促熟; 性腺发育; 水温; 饲料

中图分类号 S96 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0096-08

* 国家重点研发计划(2018YFD0901603)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022016019)、农业农村部北方海水养殖重点实验室基金(2018-KF-01)和山东省自然科学基金博士基金(ZR2016CB46)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901603), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016019), the Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China (2018-KF-01), and the Doctoral Fund of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB46)]. 谭杰, E-mail: tanjie@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王亮, 副研究员, E-mail: 2681563817@qq.com

收稿日期: 2018-12-12, 收修改稿日期: 2019-02-28

我国于 20 世纪 80 年代初步建立了刺参苗种繁育技术,之后在很长时间内,用于刺参苗种繁育的亲参多采用池塘养殖或自然海区的成参,亲参的采捕受到严重的季节限制。刺参性腺发育成熟至进入夏眠之间的时间较短,因为错过了亲参的采捕时机或采捕的亲参质量较差而耽误苗种繁育工作的现象时有发生。另一方面,自然界或人工养殖的刺参最早在 4 月底或 5 月初性腺达到成熟,此时采卵,当苗种进入稚参阶段时,海水水温达到 20℃左右,海水中的桡足类开始大量繁殖,争夺稚参的饲料,同时对稚参造成伤害。到当年秋季苗种投放季节,苗种的规格小,投放后成活率低。在室内进行亲参的人工控温促熟可有效解决以上问题。亲体的人工促熟技术在贝类和甲壳类中得到广泛研究和应用,包括海湾扇贝(*Argopecten irradians*)(吕豪等, 2008)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)(Pronker *et al.*, 2008)、紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)(Palma-Fleming *et al.*, 2010)、欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*)(Araya *et al.*, 2012)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Xu *et al.*, 2017)等。

环境因素对海洋无脊椎动物的季节性繁殖行为具有重要影响,其中最主要的 2 个因素为温度和食物(Martinez *et al.*, 2003)。研究表明,即使在非繁殖季节,适当地控制培育水温也能诱导贝类的配子发生(Heasman *et al.*, 1996)。因此,确定最有利于刺参性腺发育的培育水温是进行亲参人工促熟的第一步。适宜的水温启动配子发生,但亲体的繁殖力主要受可获得的食物数量和和质量的影响。不同动物性腺发育的营养需求也不相同(Martinez *et al.*, 2000a)。目前,有关刺参性腺发育时期的营养需求的研究鲜有报道。

本文研究了不同培育水温和饲料对刺参亲参繁殖力和子代质量的影响,同时,对培育过程中亲参的体壁粗成分变化和培育结束时雌参性腺粗成分进行分析,以期对刺参人工促熟技术的建立提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用刺参于 12 月初采捕自山东乳山海渊水产养殖公司的养殖池塘。亲参采捕后,运至室内培育池进行培育,培育密度为 15 头/m³。培育期间,持续充气,保持溶解氧在 5 mg/L 以上。每天上午 06:00 换水一次,换水时将池水排空,清除池底的粪便和残饵,之后加入新的与原池温度相同的海水。每日早晚各投喂 1 次金牌配合饲料(粗蛋白 25.4%,粗脂肪 4.9%,粗灰分 39.3%,粗纤维 8.0%),早晨与傍晚投喂

量比例为 3 : 7,日投喂量为刺参体重的 5%~10%,根据摄食情况进行调整。亲参培育期间,室内光照强度控制在 500 lx 以下。亲参入池时,水温为 5℃,亲参在此水温下暂养 7 d 后,开始水温和饲料实验。实验开始前解剖 5 头刺参,取得性腺,经显微镜观察,确定性腺中尚未出现卵子和精子。

1.2 水温实验

12℃和 15℃是目前刺参苗种生产中进行亲参人工促熟常采用的培育水温。因此,本实验采用 2 种水温控制方案:1)培育水温每天升高 0.5℃,升至 12℃后保持恒定;2)培育水温每天升高 0.5℃,升至 15℃后保持水温恒定。每个水温控制方案设置 3 个平行,每个平行 150 头亲参。实验期间,亲参投喂金牌配合饲料,混合 1 : 1 的海泥投喂。

1.3 饲喂实验

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)和海带(*Laminaria japonica*)是刺参配合饲料常采用的原料,本研究采用 3 种饲料投喂亲参:1)鼠尾藻粉组:50%鼠尾藻粉+50%海泥;2)海带粉组:50%海带粉+50%海泥;3)混合藻粉组:25%鼠尾藻粉+25%海带粉+50%海泥,每个实验组设置 3 个平行,每个平行 150 头亲参。根据预实验结果(未发表数据),用 15℃水温培育的亲参性腺发育优于用 12℃水温培育的亲参,为节省实验时间与成本,本实验部分采用 15℃水温培育亲参。实验开始后水温每天升高 0.5℃,升至 15℃后保持恒定。实验开始前,对鼠尾藻粉、海带粉和混合藻粉粗成分进行测定。

1.4 体壁和性腺的粗成分分析

在实验开始前和实验第 30、60 和 90 天,每个培育池解剖 3 头刺参获得体壁,于-80℃保存,用于体成分分析。每个培育池在诱导催产之前,取 5 头雌参,测量性腺指数,之后将性腺于-80℃保存,用于粗成分分析。粗蛋白的测定采用凯氏定氮法(Dorsey *et al.*, 1977),粗脂肪的测定采用索氏抽提法(Mann *et al.*, 1985),总碳水化合物的测定参考 Dubois 等(1956)的方法。

性腺指数=性腺湿重/体壁重×100%。

1.5 雌参繁殖力和子代质量分析

在实验过程中,如果任意一个实验组中的刺参表现出临近排放的迹象,如夜间个别雄参自然排精,大量亲参在水体表层沿池壁活动频繁、昂首摇头等,则该实验组继续保持培育水温 7 d,之后每天升温 0.5℃,升至 17℃后,采用阴干流水法进行人工诱导产卵。

亲参阴干 1 h 后, 水流冲击 15 min, 然后向池中注入 22℃ 的砂滤海水。当观察到亲参开始排精或产卵后, 立刻将其从池中取出, 置于盛满海水的 10 L 水桶中, 单独排放。

每个培育池中随机取出 100 头亲参进行催产, 统计排卵雌参头数, 计算雌参的排放率。

雌参排放率=排卵雌参数/催产亲参参数×100%。

待所有雌参停止排卵后, 计算雌参平均排卵量。将每个池中的雌参所排卵子混合, 随机测量 100 个卵子的卵径, 然后用同一培育池中的雄参所排精子进行人工授精。2 h 后, 计算受精率。

受精率=发生卵裂的受精卵数/总卵子数×100%。

各培育池所获得的受精卵分别在 21℃ 水温中孵化, 孵化密度为 3 个/ml。受精 48 h 后, 统计孵化率, 并随机测量 30 个幼体的体长。

孵化率=小耳幼体数/受精卵数×100%。

各组在统计受精率和孵化率时取样 3 次, 每次统计的个体数为 100 个。

1.6 数据分析

实验结果用平均值±标准误(Mean±SE)表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 对刺参体壁成分数据作培育时间×培育水温的双因素方差分析(Two-way ANOVA), 并利用 Tukey's test 进行各实验组平均值之间的多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 温度实验

2.1.1 体壁成分变化 当培育水温为 12℃ 时, 亲参体壁中粗蛋白和粗脂肪含量均呈先短暂降低而后逐渐升高的趋势。当培育水温为 15℃ 时, 在整个培育过程中, 亲参体壁中粗蛋白和粗脂肪含量逐渐升高。整个实验过程中, 2 种培育温度下亲参体壁中粗蛋白含量变化均不显著(图 1a)。在 12℃ 实验组, 亲参体壁中粗脂肪含量在整个实验过程中变化不显著, 而在 15℃ 实验组, 实验第 90 天, 刺参体壁中的粗脂肪含量显著高于其他时间点($P<0.05$)(图 1b)。双因素方差分析显示, 培育水温和时间的交互作用对亲参体壁中粗蛋白和粗脂肪含量影响不显著。

当培育水温为 12℃ 时, 亲参体壁中的总碳水化合物含量先逐渐升高, 至实验第 60 天, 又逐渐降低。当培育水温为 15℃ 时, 刺参体壁中的总碳水化合物含量呈先降低后升高、然后再降低的趋势。方差分析显示, 在 2 个实验组中, 亲参体壁中总碳水化合物含

量在整个培育过程中没有发生显著变化(图 1c)。

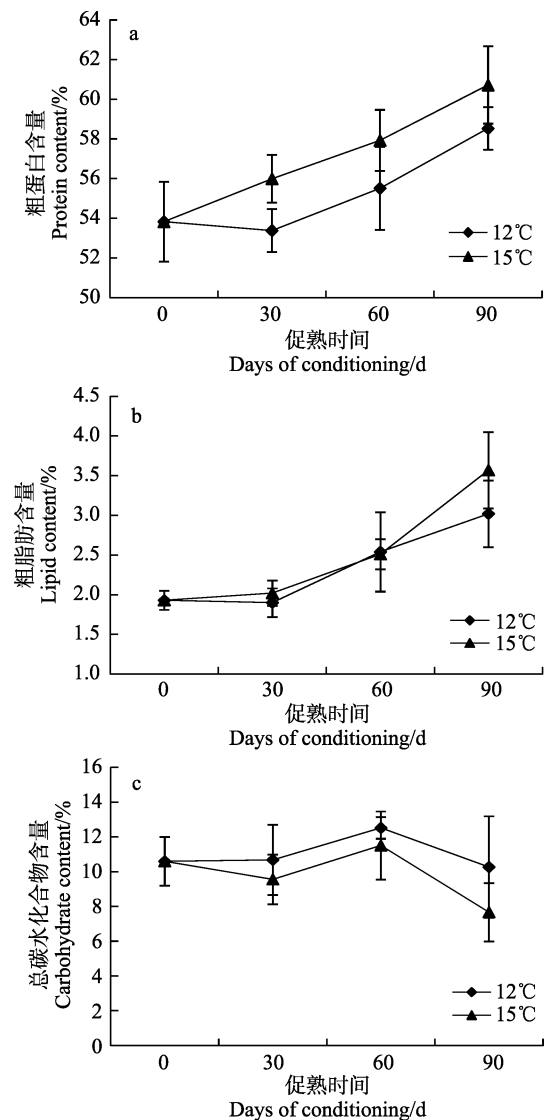


图 1 不同培育水温对刺参体壁中粗蛋白(a)、粗脂肪(b)和总碳水化合物(c)含量的影响

Fig.1 Percentage of proteins(a), lipids(b) and carbohydrates(c) in the body wall of *A. japonicus* conditioned at two different temperature regimes

2.1.2 雌参性腺粗成分 2 个实验组中, 雌参性腺中各粗成分含量没有显著差异。但采用 15℃ 水温培育的雌参其性腺中粗蛋白和粗脂肪含量高于采用 12℃ 水温培育的雌参, 而性腺中总碳水化合物含量后者高于前者(表 1)。

2.1.3 雌参繁殖力与幼体质量 根据亲参的培育情况, 分别在实验第 119 天和第 92 天对 12℃ 和 15℃ 培育的亲参进行了人工催产, 催产之前解剖部分亲参, 测量了性腺指数。在 15℃ 水温培育的雌性刺参的性腺指数、卵子受精率和受精卵孵化率高于 12℃ 实验

表 1 培育水温对雌性刺参性腺粗成分的影响
Tab.1 Percentage of proteins, lipids and carbohydrates in the female gonad of *A. japonicus* conditioned at two different temperature regimes

培育水温 Condition temperature	粗蛋白 Protein(%)	粗脂肪 Lipid(%)	总碳水化合物 Carbohydrate(%)
12℃	59.60±1.74	9.64±1.02	15.08±2.50
15℃	62.54±1.78	10.83±1.04	10.01±2.60

组,但二者之间没有显著差异。12℃实验组的雌参排出的卵子卵径和幼体体长高于 15℃实验组,但二者之间没有显著差异。在 15℃水温培育的雌参的平均排卵量和排放率均显著高于在 12℃水温培育的雌参 ($P<0.05$)(表 2)。

2.2 饲喂实验

2.2.1 饲料粗成分 实验中采用的藻粉粗成分如表 3 所示,其中,鼠尾藻粉的粗蛋白含量最高,为

(18.28±0.03)%,海带粉的粗脂肪和碳水化合物含量最高,为(0.74±0.08)%和(72.05±5.40)%。

2.2.2 体壁粗成分变化 在实验过程中,投喂鼠尾藻粉和混合藻粉的亲参,体壁中的粗蛋白和粗脂肪含量逐渐升高,而投喂海带粉的亲参体壁中粗蛋白和粗脂肪含量呈先降低、后逐渐升高的趋势。在整个实验过程中,投喂海带粉和混合藻粉的亲参体壁中粗蛋白含量变化不显著;投喂鼠尾藻粉和混合藻粉的亲参体壁中的粗脂肪含量变化不显著。投喂鼠尾藻粉的亲参在实验第 90 天,体壁中的粗蛋白含量显著高于其他时间点($P<0.05$),并且显著高于投喂海带粉和混合藻粉的亲参($P<0.05$,图 2a)。投喂海带粉的亲参在实验第 90 天,体壁中的粗脂肪含量显著高于初始值($P<0.05$),并且显著高于投喂鼠尾藻粉和混合藻粉的亲参。培育时间和饲料种类对亲参体壁中的粗脂肪含量均具有显著影响,且二者的交互作用显著($F=4.299$; $P<0.05$,图 2b)。

表 2 培育水温对雌参繁殖力、卵子与幼体质量的影响

Tab.2 Reproductive capacity and offspring quality of *A. japonicus* females conditioned at two different temperature regimes

培育水温 Condition temperature	性腺指数 Gonad index(%)	雌参排放率 Spawning rate of females(%)	平均排卵量 Fecundity ($\times 10^4$)	卵径 Oocyte diameter(μm)	受精率 Fertilization(%)	孵化率 Hatching rate(%)	小耳幼体体长 Early larval body length(μm)
12℃	3.91±1.51	6.00±1.15 ^a	157.00±33.5 ^a	163.20±2.59	90.80±0.86	78.00±3.39	479.90±8.78
15℃	6.87±2.02	16.00±2.31 ^b	312.00±59.3 ^b	162.27±2.90	92.80±1.50	82.00±2.55	463.73±9.51

注:不同实验组间标有不同小写字母表示有显著性差异($P<0.05$),标有相同小写字母表示无显著性差异($P>0.05$),下同

Note: The means in different groups with different letters are significantly different ($P<0.05$), and the means in different groups with the same letters are not significantly different ($P>0.05$), the same as below

表 3 亲参培育饲料粗成分
Tab.3 Biochemical composition of *A. japonicus* conditioning diets

饲料 Diets	粗蛋白 Protein(%)	粗脂肪 Lipid(%)	总碳水化合物 Carbohydrate(%)
鼠尾藻粉 <i>S. thunbergii</i> powder	18.28±0.03 ^c	0.28±0.02 ^a	57.86±0.32 ^a
海带粉 <i>L. japonica</i> powder	11.97±0.02 ^a	0.74±0.08 ^c	72.05±5.40 ^b
混合藻粉 Mixed algae powder	15.51±0.71 ^b	0.50±0.04 ^b	63.95±6.74 ^a

3个饲料实验组的亲参体壁中的总碳水化合物含量都呈先降低、后升高、然后又降低的趋势。饲料种类对亲参体壁中的总碳水化合物含量没有显著影响,培育时间对亲参体壁中总碳水化合物含量影响显著

($P<0.05$),二者之间不存在交互作用。投喂混合藻粉的亲参,在实验第 90 天,体壁中总碳水化合物含量显著低于初始值($P<0.05$)。投喂海带粉的亲参在实验第 90 天,体壁中总碳水化合物的含量显著低于实验第 60 天时的值($P<0.05$,图 2c)。

2.2.3 雌参性腺粗成分 投喂鼠尾藻粉和混合藻粉的雌参性腺中粗蛋白的含量显著高于海带粉组($P<0.05$)。投喂海带粉的雌参性腺中粗脂肪含量最高,投喂混合藻粉的雌参性腺中粗脂肪含量最低,但 3 组之间没有显著差异。投喂海带粉的雌参性腺中总碳水化合物含量最高,投喂混合藻粉的雌参性腺中总碳水化合物含量最低,但 3 组之间没有显著差异(表 4)。

2.2.4 雌参繁殖力与幼体质量 3个饲料实验组的雌参的性腺指数、平均排卵量、排放率、卵子卵径和受精率没有显著差异。混合藻粉组的受精卵孵化率和早期幼体体长显著高于海带粉组($P<0.05$,表 5)。

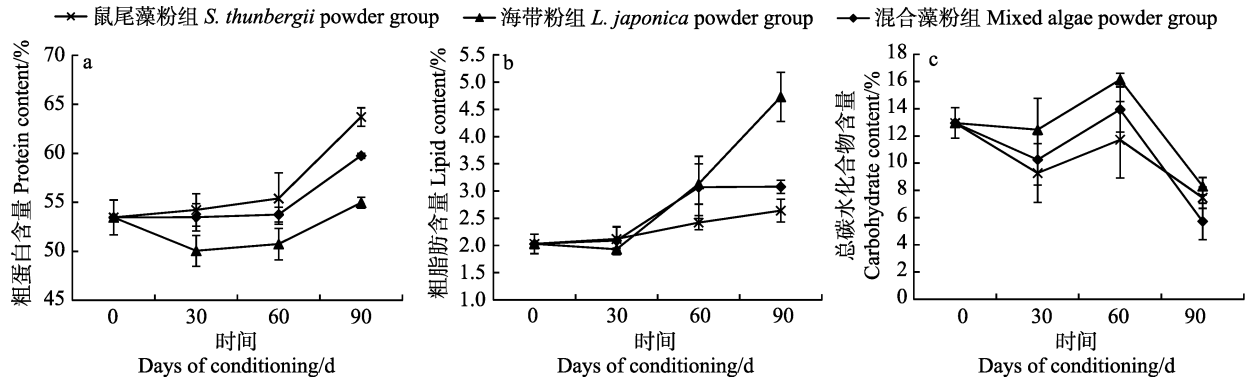


图 2 不同饲料对亲参体壁粗成分的影响

Fig.2 Body wall chemical composition of *A. japonicus* conditioned with three different diets

表 4 不同饲料对雌参性腺粗成分的影响

Tab.4 Gonad chemical composition of female *A. japonicus* conditioned with three different diets

饲料 Diet	粗蛋白 Proteins(%)	粗脂肪 Lipids(%)	总碳水化合物 Carbohydrates(%)
鼠尾藻粉组 <i>S. thunbergii</i> powder	60.82±0.52 ^b	8.45±0.77	13.86±1.60
海带粉组 <i>L. japonica</i> powder	52.17±2.11 ^a	8.82±1.55	17.75±1.83
混合藻粉组 Mixed algae powder	59.18±1.26 ^b	8.29±0.56	12.31±1.40

3 讨论

很多研究表明,温带海域海洋无脊椎动物的配子发生受海水温度影响和调控(Fabioux *et al*, 2005; Marshall *et al*, 2012)。高水温可以加快冰岛扇贝(*Chlamys islandica*) (Thorarinsdottir, 1993)、紫扇贝(Wolff, 1998)和绿海胆(*Strongylocentrotus droebachiensis*) (Siikavuopio *et al*, 2006)的性腺发育。本研究中,采用 15℃水温培育的亲参在实验第 82 天观察到个别雄参自然排精,而采用 12℃水温培育的亲参在实验第 103 天才观察到个别雄参自然排精。这表明,提高水温也能加快刺参的性腺发育。也有研究表明,升高培育水温并不能缩短紫扇贝配子发育所需的时间(Martinez *et al*, 2000a)。Griffond 等(1992)认为,在卵黄发生前期,水温过高会加速机体的新陈代谢,部分储存的用于卵黄发生的能量被消耗,造成产生的卵子数量减少,质量下降。张鹏(2012)研究发现,当水温为 16℃时,刺参用于生长能的比例占摄食所获总能量的比例最高。这说明,可能当水温为 16℃时,刺参摄食所获得的能量转化

为性腺的效率更高,性腺发育更快。而 16℃~20℃为刺参的自然产卵水温(于东祥等, 2010),采用 16℃水温进行亲参培育,易导致亲参流产。本研究中,采用 15℃水温培育的亲参,其排放率和平均排卵量均显著高于在 12℃水温培育的亲参。因此,综合考虑,15℃可能为刺参人工促熟的最佳水温。

对性腺发育的生物学零度和性成熟的有效积温的研究可以为水产动物人工促熟技术的建立提供基础(夏长革等, 2006; 吕豪等, 2008; 徐永江等, 2011)。国内已有多位学者对刺参的生物学零度和有效积温展开了研究。张玉勇(2005)报道,俄罗斯刺参性腺发育的生物学零度为 6.64℃,生殖腺发育有效积温为 759℃·d。李爽等(2016)报道,渤海湾地区刺参生殖腺发育的生物学零度为 6.14℃,而有效积温为 800.19℃·d。曹增名等(2017)报道,刺参生殖腺发育的生物学零度为 6.88℃,有效积温为 717.31℃·d。经计算,本研究中,刺参生殖腺发育的生物学零度为 4.81℃,而有效积温为 881.11℃·d,生物学零度比上述研究低,而有效积温较上述研究高。上述研究中,亲参培育温度的平均值范围为 13.07℃~15.80℃,而在本研究的水温实验中,亲参培育温度的平均值分别为 11.85℃和 14.02℃,这可能是造成本研究中刺参性腺发育生物学零度低而有效积温高的原因。

亲体培育饲料的营养成分对海洋动物繁殖力和卵子质量具有重要影响(Uriarte *et al*, 2004)。提高亲贝培育饲料中的粗蛋白水平,能加快紫扇贝的性腺发育,提高雌性扇贝的繁殖力(Farias *et al*, 2001)。采用粗蛋白含量高的饲料培育太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)亲体,可提高亲体性腺中的粗脂肪含量和受精卵的孵化率(Uriarte *et al*, 2004)。本研究中,投喂不同饲料的刺参所产受精卵的孵化率差异显著。混合藻粉和鼠尾藻粉中的粗蛋白含量均显著高于海带粉,采用前 2 种饲

料培育的亲参排放率和平均产卵量以及所产受精卵的孵化率和早期幼体体长均高于采用海带粉培育的亲

参, 这说明一定程度上提高饲料中的粗蛋白水平, 有利于亲参的性腺发育和提高卵子质量。

表 5 不同饲料对亲参繁殖力和子代质量的影响

Tab.5 Reproductive capacity and larvae quality of *A. japonicus* conditioned with three different diets

饲料 Diet	性腺指数 Gonad index(%)	雌参排放率 Spawning rate of females(%)	平均排卵量 Fecundity ($\times 10^4$)	卵径 Oocyte diameter(μm)	受精率 Fertilization(%)	孵化率 Hatching rate(%)	小耳幼体体长 Early larval body length(μm)
鼠尾藻粉组 <i>S. thunbergii</i> powder	4.19 \pm 0.77	13.67 \pm 1.45	240.67 \pm 44.44	164.15 \pm 3.22	92.60 \pm 1.63	75.33 \pm 4.03 ^{ab}	457.77 \pm 16.13 ^{ab}
海带粉组 <i>L. japonica</i> powder	3.24 \pm 0.87	12.33 \pm 2.40	220.00 \pm 24.58	159.85 \pm 3.28	93.60 \pm 2.01	66.00 \pm 3.40 ^a	428.08 \pm 18.66 ^a
混合藻粉组 Mixed algae powder	4.89 \pm 0.96	14.00 \pm 2.89	256.00 \pm 52.17	161.92 \pm 6.34	93.00 \pm 1.48	80.67 \pm 3.86 ^b	497.31 \pm 11.63 ^b

本研究中, 采用海带粉培育的雌参繁殖力低于另外 2 组, 其所产受精卵孵化率和幼体体长也显著低于采用混合藻粉培育的雌参, 这可能是因为海带粉中总碳水化合物含量较高, 而粗蛋白含量较低。Hammer 等(2006)研究了饲料中蛋白和总碳水化合物水平对海胆(*Lytechinus variegatus*)性腺发育的影响, 研究表明, 随着饲料中的粗蛋白水平升高和总碳水化合物水平降低, 海胆性腺中的生殖细胞比例升高, 同时, 卵子的卵径增大。Heflin 等(2012)认为, 饲料中的总碳水化合物水平过高会妨碍海胆对蛋白质的消化利用。

饲料中粗脂肪含量对海洋无脊椎动物繁殖力和卵子质量也具有重要影响, 一些不饱和脂肪酸是配子发生以及由受精卵发育至幼体的过程中所必需的营养成分(Navarro *et al.*, 2000)。本研究中, 海带粉中的粗脂肪含量显著高于鼠尾藻粉, 这可能是采用混合藻粉培育的亲参性腺指数、雌参排放率、平均排卵量以及受精卵孵化率和小耳幼体体长高于另外 2 组的主要原因之一。除了饲料的粗成分以外, 饲料中含有的其他微量成分如矿物质、维生素、固醇和天然色素等, 也一定程度上决定了其营养价值(Kian *et al.*, 2004)。所以, 采用多种饲料原料混合投喂所获得的效果一般要好于单独投喂某一种饲料原料的效果(Martinez *et al.*, 2000a)。

在贝类配子发生过程中, 肌肉或消化腺内的碳水化合物代谢加速, 为性腺中蛋白质和脂类的合成提供能量和前体(Martinez *et al.*, 1998; Vite-García *et al.*, 2008)。Barber 等(1985)对海湾扇贝在配子发生阶段的排氨率和耗氧率以及闭壳肌中肝糖原水平进行了测量, 研究表明, 扇贝在配子发生过程中, 闭壳肌中的

总碳水化合物转化为脂肪储藏在卵黄中。在本研究所有实验组中, 亲参在培育后期体壁内的总碳水化合物含量都表现出明显的下降趋势, 至实验后期, 亲参体壁中的总碳水化合物含量均低于初始值, 而性腺中粗脂肪含量高于其在体壁中的含量。这说明, 和扇贝一样, 在配子发生过程中, 刺参体壁中的总碳水化合物转化为卵子中的脂肪, 为受精卵的发育储备能量。

本研究中, 12℃培育的亲参以及饲料实验中以海带粉为饲料的亲参在实验开始后, 体壁中粗蛋白和粗脂肪含量都出现短暂的降低。Martinez 等(2000b)的研究表明, 当饲料不足或者培育水温过高时, 扇贝闭壳肌内蛋白质和粗脂肪含量也会出现短暂的降低, 这是因为此时闭壳肌中的碳水化合物提供的能量不足, 扇贝消耗蛋白质和粗脂肪来获得能量, 造成闭壳肌中二者含量出现短暂的降低。同样, 在刺参的配子发生过程中, 刺参优先从食物和代谢体壁中的碳水化合物来获得能量, 当获得的能量不足以支持性腺发育, 则代谢蛋白质和脂肪来获得能量。当水温不适宜时, 刺参摄食水平和消化率降低(包杰, 2008), 因此, 消耗体壁或肌肉内的蛋白质和脂肪来为性腺发育提供能量。而当以海带粉为饲料时, 因为海带粉蛋白质含量较低, 同时, 过高的碳水化合物含量妨碍了刺参对蛋白质的消化利用, 摄食获得的能量不足, 因此, 消耗体壁或肌肉内的蛋白质和脂肪来为性腺发育提供能量。

参 考 文 献

Araya RG, Mingant C, Petton B, *et al.* Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and

- subsequent larval development. *Aquaculture*, 2012, 364–365: 272–280
- Barber BJ, Blake NJ. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Marine Biology*, 1985, 87(1): 13–18
- Bao J. Effects and mechanism of environment on growth of green and red sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [包杰. 环境因子对青刺参和红刺参(*Apostichopus japonicus*)代谢与生长及其机制的影响. 中国海洋大学博士学位论文, 2008]
- Cao ZM, Cheng ZX. The relationship between effective accumulated temperature and fecundity of sea cucumber. *Shandong Fisheries*, 2017, 34(7): 5–6 [曹增名, 程朝霞. 有效积温与刺参产卵量关系的初步探究. *齐鲁渔业*, 2017, 34(7): 5–6]
- Dorsey TE, McDonald PW, Roels OA. A heated biuret-Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins. *Analytical Biochemistry*, 1977, 78(1): 156–164
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356
- Fabioux C, Huvet A, Souchu PL, *et al.* Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 2005, 250(1–2): 458–470
- Farias A, Uriarte I. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20(1): 97–105
- Griffond B, Gomot P, Gomot L. Influence de la temperature sur le déroulement de l'ovogenese chez l'escargot *Helix aspersa*. *Journal of Thermal Biology*, 1992, 17(3): 185–190
- Hammer H, Hammer B, Watts S, *et al.* The effect of dietary protein and carbohydrate concentration on the biochemical composition and gametogenic condition of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 334(1): 109–121
- Heasman MP, O'Connor WA, Frazer AW. Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*, 1996, 143(1): 75–90
- Heflin LE, Gibbs VK, Powell ML, *et al.* Effect of dietary protein and carbohydrate levels on weight gain and gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 2012, 358–359: 253–261
- Kian AYS, Mustafa S, Rahman RA. Broodstock condition and egg quality in tiger prawn, *Penaeus monodon*, resulting from feeding bioencapsulated live prey. *Aquaculture International*, 2004, 12(4–5): 423–433
- Li S, Li G, Pan YZ, *et al.* Study on the biological zero point and effective accumulated temperature for the gonad development of sea cucumber. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2016, 44(1): 81–82 [李爽, 李耕, 潘玉洲, 等. 刺参生殖腺发育的生物学零度和有效积温研究. *安徽农业科学*, 2016, 44(1): 81–82]
- Lü H, Li X, Dong YC, *et al.* The relation between effective accumulated temperature and gonad development period of scallop, *Argopecten irradians*. *Marine Sciences*, 2008, 32(4): 57–60 [吕豪, 李霞, 董义超, 等. 海湾扇贝种贝人工促熟条件下积温和性腺发育周期的关系. *海洋科学*, 2008, 32(4): 57–60]
- Mann R, Gallager SM. Physiological and biochemical energetics of larvae of *Teredo navalis* L. and *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalvia: Teredinidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1985, 85(3): 211–228
- Marshall R, Mckinley RS, Pearce CM. Effect of temperature on gonad development of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa* Gould, 1850). *Aquaculture*, 2012, 338–341: 264–273
- Martinez G, Mettifogo L. Mobilization of energy from adductor muscle for gametogenesis of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Journal of Shellfish Research*, 1998, 17(1): 113–116
- Martinez G, Aguilera C, Mettifogo L. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*, 2000a, 183(1–2): 149–159
- Martinez G, Brokordt K, Aguilera C, *et al.* Effect of diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000b, 247(1): 29–49
- Martinez G, Perez H. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 2003, 228(1–4): 153–167
- Navarro JM, Leiva GE, Martinez G, *et al.* Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 247(1): 67–83
- Palma-Fleming H, Navarro JM, Peña E, *et al.* Effect of three conditioning diets on the fatty acid composition of gonads and muscle of *Argopecten purpuratus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2010, 36(3): 605–620
- Pronker AE, Nevejan NM, Peene F, *et al.* Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquaculture International*, 2008, 16(4): 297–307
- Siikavuopio SI, Christiansen JS, Dale T. Effects of temperature and season on gonad growth and feed intake in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 2006, 255(1–4): 389–394
- Thorarinsdottir GG. The iceland scallop, *Chlamys islandica* (O.F. Müller), in Breidafjörður, west Iceland: II. Gamete development and spawning. *Aquaculture*, 1993, 110(1): 87–96
- Uriarte I, Farias A, Hernandez J, *et al.* Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Effects of enriched diets. *Aquaculture*, 2004, 230(1–4): 349–357
- Vite-García N, Saucedo PE. Energy storage and allocation during reproduction of pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* at Bahia de la Paz, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(2): 375–383
- Wolff M. Spawning and recruitment in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. *Marine Ecology Progress Series*, 1998, 42(3): 213–217
- Xia CG, Su YM, Chang YQ. Biological zero temperature and effective accumulated temperature of embryonic development in sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Fisheries Science*, 2006, 25(8): 379–382 [夏长革, 苏延明, 常亚青. 光棘球海胆胚胎发育生物学零度和有效积温的初步研究. *水产科学*, 2006, 25(8): 379–382]
- Xu HG, Zhang YL, Luo K, *et al.* Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 2017, 479: 556–563
- Xu YJ, Liu XZ, Liu JG, *et al.* Histological and morphometric studies on the annual gonadal maturation cycle of spotted halibut *Verasper variegatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(3): 7–15 [徐永江, 柳学周, 刘君刚, 等. 圆斑星鲽卵巢发育的组织学和数量形态特征研究. *渔业科学进*

- 展, 2011, 32(3): 7-15]
- Yu DX, Sun HL, Chen SQ, *et al.* Health culture technology of sea cucumber. Beijing: China Ocean Press, 2010 [于东祥, 孙慧玲, 陈四清, 等. 海参健康养殖技术. 北京: 海洋出版社, 2010]
- Zhang P. Effect of salinity, light intensity and temperature on growth and energy metabolism of red and green variants of *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012, 1-140 [张鹏. 盐度、光照强度、温度对青色系、红色系仿刺参(*Apostichopus japonicus*)生长和能量分配的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 1-140]
- Zhang YY. Hybridization of Chinese and Russian populations of *Apostichopus japonicus* and comparison on main traits of F₁. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2005 [张玉勇. 中国与俄罗斯不同地理种群刺参杂交育种及杂交子一代性状的比较研究. 大连水产学院硕士研究生学位论文, 2005]

(编辑 陈辉)

Effect of Temperature and Diet on the Reproductive Condition of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Broodstock

TAN Jie^{1,2}, LI Fenghui¹, CHEN Siqing^{1,2}, MA Tianyi³, CHEN Aihua⁴,
GE Jianlong^{1,2}, SUN Huiling¹, WANG Liang⁵①

(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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Wendeng Ocean and Fisheries Administration, Weihai 264400;
4. Fisheries Technology Extension Center of Rushan, Rushan 264500;
5. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003)

Abstract The effects of two factors (temperature and diet) on the gonadal development and quality of the resulting offspring of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) were examined in this study. Two temperatures (12°C and 15°C) and three diets (50% *Sargassum thunbergii* Kuntze powder + 50% sea mud, 50% *Laminaria japonica* powder + 50% sea mud, and 25% *S. thunbergii* Kuntze powder + 25% *L. japonica* powder + 50% sea mud) were tested through single factor experiments. In addition, changes in the biochemical composition of the body wall during conditioning and biochemical composition of the female gonad after conditioning in different treatments were also quantified. Sea cucumbers were maintained in seawater, which was changed daily and provided with aeration, and were fed at a daily ration equivalent to 5%~10% of their dry biomass. Three replicate tanks were assayed for each treatment. Gonad index and spawning rate of female animals, egg diameter, fertilization rate of eggs, hatching rate of larvae, and body length of early auricularia were also evaluated. The results of the temperature treatments revealed that spawning rate, gonad index, and fecundity of females were significantly affected by temperature, and significantly higher at 15°C than that at 12°C ($P<0.05$). In the diet treatments, there were no significant differences in gonad index, spawning rate, and fecundity of females among the three groups; however, the mixed algae powder group showed the highest values. Hatching rate of embryos and body length of early larvae in the mixed algae powder group were significantly greater than that in the *L. japonica* powder group. The results indicated that egg quality was the best in a broodstock supplied with mixed macroalgae powder and sea mud. Biochemical analysis of the body wall revealed that carbohydrate levels in the *A. japonicus* body wall declined during conditioning, supporting the theory that carbohydrates are mobilized to provide energy or precursors for lipid or protein synthesis in the gonad.

Key words *Apostichopus japonicus*; Conditioning; Gonad development; Temperature; Diet

① Corresponding author: WANG Liang, E-mail: 2681563817@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190122003

http://www.yykxjz.cn/

张鹏飞, 常青, 陈四清, 徐郑鑫, 赵捷杰. 绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 104–111

Zhang PF, Chang Q, Chen SQ, Xu ZX, Zhao JJ. Diet feeding rhythm and analysis of gastric evacuation associated mathematical models in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 104–111

绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律 及胃排空模型研究*



张鹏飞^{1,2} 常 青^{2①} 陈四清^{2,3} 徐郑鑫^{2,4} 赵捷杰^{1,2}

(1. 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 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. 淮海工学院 连云港 222005)

摘要 为探究绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*)幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型, 分别采用一次饱食投喂法(将一昼夜划分为 8 个时段, 分别为 06:00、09:00、12:00、15:00、18:00、21:00、00:00 和 03:00, 每个时段作 1 个处理, 每天每个处理饱食投喂 1 次)和分段式连续投喂法(将一昼夜划分为与一次饱食投喂法相同的 8 个时段, 每天每个实验桶连续投喂 8 次)两种方法研究绿鳍马面鲈幼鱼的昼夜摄食节律, 实验持续 7 d。此外, 分别测定绿鳍马面鲈幼鱼[体重为(4.28±0.46) g]饱食后 0、2、4、6、8、10、12、14、16、20、24 和 28 h 时的胃内容物湿重, 并用线性模型、指数模型和平方根模型 3 种数学模型拟合了绿鳍马面鲈幼鱼的胃排空率。结果显示, (1)在两种投喂方式下, 实验鱼均表现为 24 h 一周期的摄食节律。在分段式连续投喂方式下, 摄食率在 03:00、06:00、09:00 和 12:00 无显著差异, 在 15:00 达到峰值后急速降低($P<0.05$), 并在 00:00 达到最低值; 饲料效率与一次饱食投喂方式下的 03:00、06:00、15:00 和 18:00 投喂组无显著差异, 特定生长率显著高于一次饱食投喂($P<0.05$)。 (2)在一次饱食投喂方式下, 实验鱼在 18:00 后摄食率急速降低($P<0.05$), 并在 00:00 达到最低值; 实验鱼在 09:00 和 12:00 投喂组的特定生长率和饲料效率显著高于一天中的其他时间($P<0.05$), 每天 09:00~12:00 时间段投喂绿鳍马面鲈幼鱼可显著提高其生长和饲料效率。 (3) 3 种模型中, 胃排空率用平方根模型拟合得最好, 方程为 $y^{0.5}=2.802-0.204t$ ($R^2=0.987$); 根据平方根模型, 胃内饲料在饱食投喂 10 h 左右完全排空, 达到投喂前水平, 80%胃排空时间为 6 h。综合上述指标, 建议在生产实践中每天 09:00~15:00 时间段饱食投喂绿鳍马面鲈幼鱼 3 次, 每次间隔 3 h。

关键词 绿鳍马面鲈; 摄食节律; 饲料效率; 特定生长率; 胃排空率

中图分类号 S965.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0104-08

自然条件下, 鱼类为适应温度、光照、饵料等环境因素变化而表现出一种特定的摄食规律, 称为摄食

* 农业部外海渔业开发重点实验室开放课题(LOF 2017-05)、广东省渔业生态环境重点实验室开放基金(FEEL-2017-10)和中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费项目(20603022017014)共同资助 [This work was supported by Key Laboratory of Open-Sea Fishery Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (LOF 2017-05), Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment (FEEL-2017-10), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017014)]. 张鹏飞, E-mail: 1573852630@qq.com

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

收稿日期: 2019-01-22, 收修改稿日期: 2019-02-27

节律(韩冬, 2005)。鱼类的摄食节律显著影响其生长性能, 根据鱼类的摄食节律制定适宜的投喂时间, 可显著提高饲料效率, 降低养殖成本及减轻水质污染(Boujard *et al.*, 1992; Azzaydi *et al.*, 1999)。胃排空率(Gastric evacuation rate, GER, g/h)是指摄食后食物从胃中排出的速率(张波等, 2000)。胃排空率影响鱼类的摄食量、生理代谢水平和食物消化率(Sweka *et al.*, 2004), 同时, 胃排空率还可以评估鱼类消化功能及评价鱼类的投喂频率(Cortés, 1997; 孙晓锋等, 2011)。对鱼类的摄食节律和胃排空模型进行研究, 在鱼类食欲恢复、大多数体细胞增殖期间投喂饲料, 能显著提高其摄食率, 并最大化的增加饲料效益(Spieler, 1977; 朱云海等, 2013)。

绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*), 俗称面包鱼、马面鱼、扒皮鱼(丁民权, 1994), 主要分布于日本、朝鲜半岛沿海及中国的东海、南海、黄海、渤海和台湾沿海, 其中东海的产量较高(张家男, 2011)。绿鳍马面鲈主要在 60~120 m 水深区域索饵, 属外海暖温性近底层鱼类(秦忆芹, 1981); 富含高度不饱和脂肪酸 EPA、DHA 和牛磺酸等氨基酸, 是营养价值极高的健康食品(徐大风等, 2018)。绿鳍马面鲈曾在 20 世纪 80 年代之前, 是中国第二大海洋捕捞经济鱼类, 仅次于带鱼(*Trichiurus lepturus*)(许学龙等, 1992), 但由于近些年的过度捕捞, 其资源量急剧下降, 产量已无法满足人们的需求, 迫切需要进行人工养殖。养殖过程中, 应根据养殖对象的摄食规律及食欲恢复时间, 制定合理的投喂策略(汪春玲等, 2018)。本研究以绿鳍马面鲈为对象, 旨在为其适宜投喂时间、投喂方法等提供理论依据, 以期降低养殖成本、提高养殖效益。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2018 年 9 月在山东省烟台市天源水产有限公司进行, 实验鱼为 2018 年 6 月该公司人工繁育所得的同一批次绿鳍马面鲈幼鱼。实验鱼在 6.3 m × 1.8 m × 2.0 m 的水泥池中饲养, 孵化 30 d 后, 每日 09:00 和 15:00 饱食投喂进口新爱鱼仔商品饲料 1 次, 直至实验开始。实验饲料与日常投喂的饲料成分相同(进口新爱鱼仔 5 号配合饲料, 林兼产业株式会社生产), 粒径为 3 mm。剔除不规则颗粒后, 随机数 3 份 1000 粒称重, 平均重量为 0.018 g, 计算每粒饲料的重量, 以便计算摄食量。

1.2 实验方法

1.2.1 绿鳍马面鲈昼夜摄食节律实验 分别采用两种实验方法来探究绿鳍马面鲈幼鱼[初始体重为 (4.50±0.36) g]的昼夜摄食节律。第 1 种方法为“一次饱食投喂昼夜摄食节律法”, 将 1 天分为 8 个时间段, 分别为 06:00、09:00、12:00、15:00、18:00、21:00、00:00 和 03:00; 每个时间段作为 1 个处理水平, 每个处理设置 3 个重复, 每天每个实验桶仅饱食投喂 1 次。第 2 种方法为“分段式连续投喂昼夜摄食节律法”, 将 1 天分为 8 个时间段(与一次饱食投喂昼夜摄食节律法中的时间段保持一致), 连续饱食投喂 8 次, 1 个处理, 3 个重复。

1.2.2 绿鳍马面鲈胃肠排空实验 实验开始前 2 d 停止喂食, 使其胃肠排空。随机取 8 尾鱼, 解剖观察所有鱼胃肠内均无饲料后, 开始实验。实验期间, 实验鱼[初始体重为 (4.28±0.46) g]在 09:00 饱食投喂与昼夜摄食节律实验相同的饲料 1 次, 取样时间设定在摄食后 0、2、4、6、8、10、12、14、16、20、24 和 28 h。每次取样时, 将每缸中的实验鱼随机捞出 8 尾, 放入含有 100 mg/L MS-222 水溶液的塑料桶中进行深度麻醉。解剖, 取出鱼胃和肠, 用滤纸吸干表面水分, 称重。然后, 解剖鱼胃, 取出胃内容物, 用蒸馏水清洗胃, 再用滤纸吸干胃表面水分, 称重, 2 次所得重量差值即为胃内饲料重量(湿重), 每次所得胃内饲料重量的平均值作为该取样时间的胃内饲料重量。

1.3 饲养管理

绿鳍马面鲈幼鱼的昼夜摄食节律实验在 27 个圆形平底塑料缸(直径为 80 cm, 体积为 300 L)组成的室内流水养殖系统中进行。将绿鳍马面鲈幼鱼从暂养池转入实验系统中驯养, 暂养时间为 7 d。实验开始前, 将实验鱼饥饿 2 d, 从中随机挑选体质健壮、大小均一的个体, 每缸 20 尾, 每个处理设置 3 个平行。实验中, 绿鳍马面鲈分别按照两种实验方法进行饱食投喂, 投喂结束后, 用虹吸管将剩余饲料吸出。分别记录每个实验桶每次投喂的饲料重量、残饵粒数、实验开始和结束时各桶中实验鱼重量、特定生长率(由每个实验桶中 20 尾鱼的总初始重量和总终末重量计算得到)。实验期间的水温为 24.5℃~26.0℃, pH 为 6.8~7.0, 白天为自然光照, 夜间使用白炽灯照明, 水面全光照强度为 2000~3000 lx, 溶解氧 > 7.2 mg/L, 氨氮 < 0.5 mg/L。实验鱼昼夜摄食节律实验周期为 7 d。

将绿鳍马面鲈胃排空实验所使用的 150 尾实验鱼放养于 1 个圆形平底塑料缸中(直径为 160 cm, 体

积为 1200 L), 流水养殖, 微充气, 实验水温为 24℃。

1.4 数学模型

分别采用指数模型、线性模型和平方根模型来拟合胃内含物重量的变化规律。

线性模型: $Y=A-B\times t$

指数模型: $Y=A\times e^{-B\times t}$

平方根模型: $Y^{0.5}=A-B\times t$

式中, Y 为瞬时胃内残余饲料湿重=胃内残余饲料湿重(g)/鱼体重(g) $\times 100$, B 为瞬时胃排空率, t 为摄食后时间(h), A 为常数。通过比较各拟合模型的相关系数(R^2)、残差平方和(RSS)及残差的标准差(SDR)来选择绿鳍马面鲈幼鱼的最佳胃排空模型。

1.5 数据分析与统计

摄食量(g)=投喂总量-(残饵粒数 \times 单位颗粒重量)

特定生长率(%/d)= $100\times(\ln$ 终末体重 $-\ln$ 初始体重)/实验天数

摄食率(%bw)= $100\times$ 总干物质摄食量/[初始体重+终末体重]/2]

平均摄食率(%bw/d)= $100\times$ 总干物质摄食量/[实验天数 \times (初始体重+终末体重)/2]

饲料效率(%)= $100\times$ 鱼体增重(湿重)/总摄食量(干重)

结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 实验结果经单因素方差分析(One-way ANOVA)后, 若差异显著, 则进行邓肯多重比较, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 投喂方式对摄食节律的影响

两种投喂方式下, 绿鳍马面鲈在一昼夜的不同时间段表现出不同的摄食强度(图 1)。在一次饱食投喂条件下, 绿鳍马面鲈在 09:00、12:00、15:00 和 18:00 投喂组的日摄食率明显高于 03:00、06:00、21:00 和 00:00 投喂组($P<0.05$)。综合 1~7 d 的日摄食率来看, 绿鳍马面鲈表现为 24 h 一周期的日摄食率, 摄食高峰有 4 个, 分别为 09:00、12:00、15:00 和 18:00。绿鳍马面鲈 7 d 的平均摄食率表现出与日摄食率相同的变化规律。

在分段式连续投喂下, 一昼夜中每个时间点的摄食率均低于一次饱食投喂摄食率; 绿鳍马面鲈的摄食率在 15:00 出现 1 个摄食高峰, 之后日摄食率逐渐下降并在 00:00 达到最低值($P<0.05$); 综合 1~7 d 的日摄

食率, 绿鳍马面鲈也表现出 24 h 一周期的日摄食率。绿鳍马面鲈 7 d 的平均摄食率仅在 15:00 出现 1 个摄食高峰。

2.2 投喂时间段对生长性能的影响

投喂时间段对绿鳍马面鲈幼鱼的特定生长率和饲料效率有显著影响。12:00 投喂组的总摄食量最高, 分段式连续投喂条件下的总摄食量约为一次饱食投喂条件下 12:00 投喂组的 2.8 倍(图 2)。一次饱食投喂条件下绿鳍马面鲈特定生长率的最大值出现在 12:00 投喂组, 其次为 09:00、15:00、18:00 投喂组, 最小值出现在 00:00 投喂组, 最大值约为最小值的 13 倍(图 3)。分段式连续投喂条件下的特定生长率约为一次饱食投喂条件下特定生长率最大值的 1.3 倍。一次饱食投喂条件下 12:00 投喂组的饲料效率最高, 其次为 09:00 投喂组, 饲料效率的最小值也出现在 00:00 投喂组, 最大值约为最小值的 3.8 倍(图 4)。分段式连续投喂条件下的饲料效率与一次饱食投喂条件下 03:00、06:00、15:00 和 18:00 投喂组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 消化道排空时间及胃排空模型

绿鳍马面鲈在摄食后, 0~10 h 胃内含物比率急剧下降, 在 10 h 基本完全排空(图 5)。而在摄食后 0~4 h 全肠内含物比率迅速升高并在 4 h 达到最大值, 4~8 h 全肠内含物比率基本不变, 8 h 后迅速下降, 在 24 h 时基本已完全排空。分别使用 3 种数学模型拟合绿鳍马面鲈胃排空实验数据, 以相关系数 R^2 、残差平方和(RSS)及残差的标准差(SDR)为参考, 优劣程度均为平方根模型>线性模型>指数模型(表 1), 因此, 平方根模型更适于描述绿鳍马面鲈胃排空曲线。由平方根模型可得, 胃内容物在饱食投喂后 10 h 左右完全排空, 达到投喂前水平; 80% 胃排空时间为 6 h。

3 讨论

3.1 投喂方式对绿鳍马面鲈昼夜摄食节律影响

本研究采取一次饱食投喂和分段式连续投喂两种方法来研究绿鳍马面鲈的摄食节律。比较发现, 一次饱食投喂条件下绿鳍马面鲈日摄食率在 09:00 达到峰值后保持稳定, 18:00 后开始下降, 并在 00:00 达到最低值; 分段式连续饱食投喂条件下, 绿鳍马面鲈在 15:00 日摄食率达到峰值后开始下降, 同样在 00:00 达到最低值。两种实验方法均表明, 绿鳍马面鲈的摄食节律为 24 h 一周期, 均较好地反应出绿鳍马面鲈的日摄食节律, 与其他学者的研究结果不同(韩冬, 2005; 郑珂珂等, 2010; 董桂芳等, 2013), 对比上述学者的研

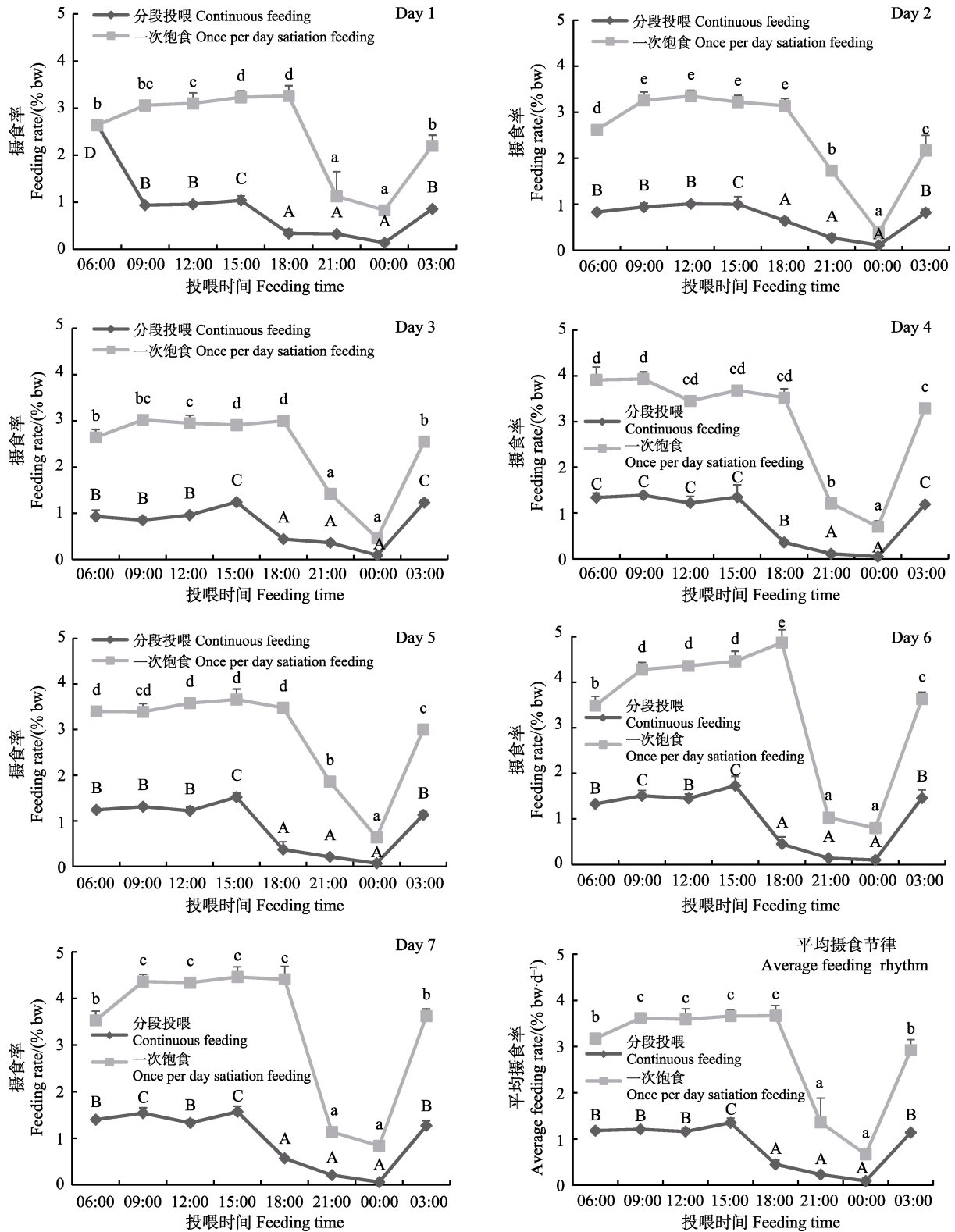


图 1 一次饱食投喂和分段式连续投喂下绿鳍马面鲈的昼夜摄食节律变化(平均值±标准误, $n=3$)
 Fig.1 Variations of diet feeding rhythm of *T. septentrionalis* under a once-per-day satiation feeding and a continuous feeding at a fixed interval (Mean±SE, $n=3$)

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同
 Data with different lowercase letters are significantly different at $P<0.05$;
 Data with different capital letters are significantly different at $P<0.05$. The same as below

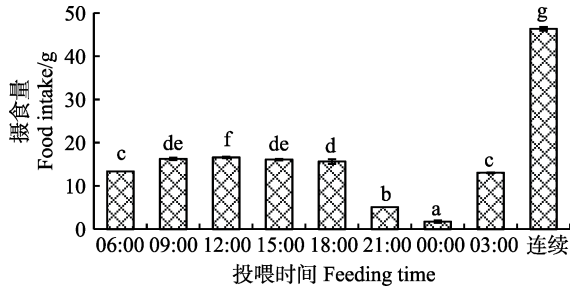


图2 不同投喂时间段下绿鳍马面鲈幼鱼的摄食量
Fig.2 Food intake of *T. septentrionalis* at different feeding time

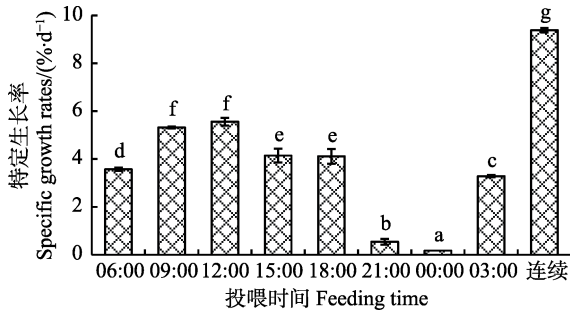


图3 不同投喂时间段绿鳍马面鲈幼鱼的特定生长率
Fig.3 Specific growth rate of *T. septentrionalis* at different feeding time

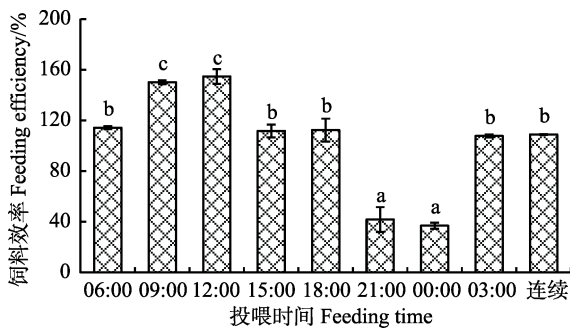


图4 不同投喂时间段下绿鳍马面鲈幼鱼的饲料效率
Fig.4 Feeding efficiency of *T. septentrionalis* at different feeding time

表1 绿鳍马面鲈幼鱼胃排空曲线的3种数学模型拟合
Tab.1 The imitation with three types of mathematical models for gastric evacuation of *T. septentrionalis*

数学模型 Model	公式 Equation	R ²	RSS	SDR
线性模型 Linear model	$y = -0.7559t + 7.2943$	0.962	1.577	0.562
指数模型 Exponential model	$y = 12.482e^{-0.367t}$	0.820	2.071	0.644
平方根模型 Square root model	$y^{0.5} = 2.802 - 0.204t$	0.987	0.341	0.261

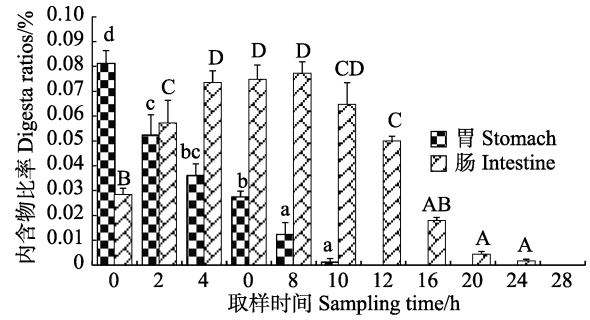


图5 绿鳍马面鲈摄食后胃和全肠内含物比例变化 (平均值±标准误, n=8)

Fig.5 Post-prandial digesta ratios of stomach and intestines of *T. septentrionalis* (Mean±SE, n=8)

究结果,分析认为,绿鳍马面鲈抢食活泼、消化速率快,可能是两种实验方法均较好反应摄食节律的原因。

鱼类的摄食节律分为白天摄食、晚上摄食、晨昏摄食和无明显节律4种类型(Helfmann, 1986)。研究发现,绿鳍马面鲈在一次饱食投喂条件下,09:00~18:00投喂组的日摄食率高于21:00~06:00投喂组;分段式连续投喂条件下,日摄食率在15:00达到峰值后开始下降,这表明绿鳍马面鲈是白天摄食型鱼类,与宝石鲈(*Scortum barcoo*)(孙砚胜等, 2012)、台湾泥鳅(*Paramisgurnus* sp.)(张运邦等, 2017)等摄食节律相同。鱼类的摄食节律与环境、温度、光照等密切相关(Fraser *et al*, 1995),秦忆芹(1981)对东海外海绿鳍马面鲈摄食习性的研究中发现,傍晚到上半夜(18:15~21:00)其摄食强度最高,而本研究两种投喂方式下,该时间段的摄食率均显著低于03:00~18:00 ($P < 0.05$),这可能是由于实验环境、实验鱼存在差异,其研究的是海洋中的绿鳍马面鲈摄食强度,属野生鱼类,摄食强度受到海洋中温度、光照及饵料种类、数量等影响;本研究的实验条件为工厂化海水流水养殖系统,具有稳定的环境及充足的饲料,实验鱼是经人工驯化2年的亲鱼繁育所得。

3.2 投喂时间段对绿鳍马面鲈幼鱼生长性能的影响

鱼类的摄食节律是对自然界中温度、光照、索饵、躲避天敌等外界因素长期的适应所形成的,这种规律会影响鱼类一天中的营养分配及代谢强度,索饵活动时间较强,可能其对食物的利用率也较高(麦康森等, 2011)。本研究中,不同投喂时间段的绿鳍马面鲈特定生长率差异显著,09:00和12:00投喂组绿鳍马面鲈的特定生长率约为21:00和00:00的13倍。Zoccarato等(1993)对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)摄食时间及摄食水平的研究发现,16:00投喂组实验鱼生长显著高于09:00投喂组。不同投喂时间段对幼鱼生长具有显著

影响的报道也见于鲈形目的研究中, 表现为在夜间投喂, 生长效果比白天要好, 这与其夜间摄食的习性相对应(Hogendoorn, 1981; Baras *et al*, 1998; Bolliet *et al*, 2001)。郑珂珂等(2010)对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)的摄食节律及适宜投喂时间研究中发现, 15:00、18:00、03:00投喂的实验鱼特定生长率为06:00、09:00、12:00投喂实验鱼特定生长率的2倍。这说明投喂时间对鱼类的特定生长率有一定的影响。

本研究也发现, 不同时间投喂的绿鳍马面鲈对饲料利用存在差异, 绿鳍马面鲈的饲料效率表现为09:00和12:00投喂组显著高于其他时刻($P<0.05$), 21:00和00:00投喂组的饲料效率最低。对于其他鱼类, 部分学者提出无法判定对饲料利用的差异是源于摄食率还是饲料效率(Sundararaj *et al*, 1982)。对于绿鳍马面鲈来说, 一次饱食投喂条件下, 09:00和12:00投喂组的摄食率与15:00和18:00投喂组无显著性差异, 但是饲料效率却表现为09:00和12:00投喂组显著高于15:00和18:00投喂组($P<0.05$), 这表明投喂时间对绿鳍马面鲈生长的影响可能主要是由饲料效率引起。投喂时间对饲料效率具有显著影响的研究也有很多报道, 如 Noeske-Hallin 等(1985)对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)适宜投喂时间的研究发现, 不同投喂时间, 其饲料效率差异显著; Baras等(1996)对淡水白鲈(*Piaractus brachypomus*)的研究发现, 夜间投喂的实验鱼比白天投喂的实验鱼饲料转化效率高。郑珂珂等(2010)在对大菱鲂幼鱼的昼夜摄食节律研究中发现, 投喂国产鲈鲷类商品饲料时, 15:00和18:00投喂组大菱鲂饲料效率显著高于其他投喂组, 约为06:00、09:00和12:00投喂组的2倍。这充分的说明, 根据鱼类的摄食节律, 合理的安排投喂时间, 可促进鱼类的生长和提高饲料利用。

3.3 绿鳍马面鲈胃肠排空时间及胃排空模型

胃肠排空显著影响鱼类的食欲, 排空率在一定程度上能够反应鱼类的可摄食量(Riche *et al*, 2004)。但养殖实践中并不能完全按照胃排空时间来确定投喂时间的间隔, 如崔超等(2014)研究投喂频率对俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)幼鱼生长的影响时, 建议每天投喂频率 ≥ 4 次, 时间间隔 <6 h; 而张涛等(2015)研究俄罗斯鲟幼鱼胃排空模型时, 认为80%胃排空的15h作为投喂间隔可使饲料获得充分利用。本研究以胃肠内含物质量分析法研究绿鳍马面鲈的胃肠排空时间。绿鳍马面鲈在摄食4h后胃内含物下降约52%, 肠内含物4h达到最大值, 并在4~8h维持不变, 在24h基本完全排空。根据平方根模型, 绿鳍马面鲈胃

内容物完全排空的时间为10h左右, 80%胃排空的时间为6h左右, 理论上投喂间隔6h可使绿鳍马面鲈食欲基本得到恢复。在对其摄食节律的研究中发现, 分段式连续投喂条件下, 仅间隔3h的09:00和12:00摄食量并无差异; 一次饱食投喂条件下, 09:00和12:00投喂组的饲料效率及特定生长率均最佳。因此, 以胃排空率达到80%作为投喂最佳时间间隔的判定指标并不充分, 还要考虑到鱼类的摄食节律。

4 结论

本研究中, 一次饱食投喂条件下的绿鳍马面鲈在每天09:00和12:00时间段的摄食率、特定生长率及饲料效率均表现出最佳的效果, 表明每天09:00~12:00时间段投喂绿鳍马面鲈可显著提高其生长和饲料利用效率。分段式连续投喂8次的条件下, 总摄食量为一次饱食投喂条件下12:00投喂组的2.8倍, 但特定生长率仅为1.3倍, 增加投喂量, 在生长性能上并未得到对应的倍数增加趋势; 日摄食率在15:00达到峰值后开始下降, 并在00:00达到最小值, 表明多次投喂时, 绿鳍马面鲈摄食强度从15:00开始逐渐降低。根据平方根模型, 绿鳍马面鲈幼鱼投喂后3h胃排空率可达较高水平(41%), 同时, 在投喂实验中发现, 投喂3h后实验鱼抢食依旧十分活泼。综合上述指标, 建议在生产实践中, 每天09:00~15:00时间段饱食投喂绿鳍马面鲈幼鱼3次, 每次间隔3h。

参 考 文 献

- Azzaydi M, Martínez FJ, Zamora S, *et al*. Effect of meal size modulation on growth performance and feeding rhythms in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 1999, 170(3-4): 253-266
- Baras E, Mélard C, Grignard JC, *et al*. Comparison of food conversion by pirapatinga *Piaractus brachypomus* under different feeding times. *Progressive Fish-Culturist*, 1996, 58(1): 59-61
- Baras E, Tissier F, Westerloppe L, *et al*. Feeding in darkness alleviates density-dependent growth of juvenile vundu catfish *Heterobranchus longifilis* (Clariidae). *Aquatic Living Resources*, 1998, 11(5): 335-340
- Bolliet V, Azzaydi M, Boujard T. Effect of feeding time on feed intake and growth. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M. *Food intake in fish*. Oxford: Blackwell Science Inc, 2001, 233-249
- Boujard T, Leatherland JF. Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 1992, 35(6): 109-131
- Cortés. A critical review of methods of studying fish feeding

- based on analysis of stomach contents: Application to *elasmobranch* fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1997, 54(3): 726–738
- Cui C, Yu N, Long LN, *et al.* Effects of feeding frequency on growth, digestive enzymes activities and ammonia excretion of juvenile Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. *Marine Fisheries*, 2014, 36(1): 35–43 [崔超, 禹娜, 龙丽娜, 等. 投喂频率对俄罗斯鲟幼鱼生长、消化酶活力和氨氮排泄的影响. *海洋渔业*, 2014, 36(1): 35–43]
- Ding MQ. On the stocks of filefish *Navodon septentrionalis* and their distributions in the East China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(1): 45–56 [丁民权. 东海绿鳍马面鲀群体及其分布. *水产学报*, 1994, 18(1): 45–56]
- Dong GF, Yang YO, Chen L, *et al.* Diet feeding rhythm and gastrointestinal evacuation time of juvenile channel catfish and hybrid sturgeon. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 876–884, 890 [董桂芳, 杨严鸥, 陈路, 等. 斑点叉尾鲷和杂交鲟幼鱼昼夜摄食节律和胃肠排空时间的研究. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 876–884, 890]
- Fraser NHC, Heggenes J, Metcalfe NB, *et al.* Low summer temperatures cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Canadian Journal of Zoology*, 1995, 73(3): 446–451
- Han D. Modeling for feeding system and pollution evaluation in Chinese longsnout catfish. Doctoral Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2005 [韩冬. 长吻鮠投喂管理和污染评估动态模型的研究. 中国科学院水生生物研究所博士研究生学位论文, 2005]
- Helfmann GS. Fish behaviour by day, night and twilight. In: Pitcher TJ (eds.). *The behaviour of teleost fishes*. Boston: Springer, 1986, 366–387
- Hogendoorn H. Controlled propagation of the African catfish, *Clarias lazera* (C. & V.): IV. Effect of feeding regime in fingerling culture. *Aquaculture*, 1981, 24: 123–131
- Mai KS, Chen LQ, Chen NS, *et al.* Nutrition and feed of aquatic animals. Beijing: China Agriculture Press, 2011, 10–53 [麦康森, 陈立桥, 陈乃松, 等. 水产动物营养与饲料学. 北京: 中国农业出版社, 2011, 10–53]
- Noeske-Hallin TA, Spieler RE, Parker NC, *et al.* Feeding time differentially affects fattening and growth of channel catfish. *Journal of Nutrition*, 1985, 115(9): 1228–1232
- Qin YQ. A study on the feeding habit of the filefish of Dong Hai. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(3): 245–251 [秦忆芹. 东海外海绿鳍马面鲀摄食习性的研究. *水产学报*, 1981, 5(3): 245–251]
- Riche M, Haley DI, Oetker M, *et al.* Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia (*Oreochromis niloticus*)(L.). *Aquaculture*, 2004, 234(1–4): 657–673
- Spieler RE. Diel and seasonal changes in response to stimuli: A plague and a promise for mariculture. *Proceedings of the Annual Meeting—World Mariculture Society*, 1977, 8(1–4): 865–882
- Sun XF, Feng J, Chen JH, *et al.* Effects of feeding frequency on gastric evacuation, growth benefit and body composition of juvenile genetic improved farmed tilapia strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1677–1683 [孙晓锋, 冯健, 陈江虹, 等. 投喂频率对尼罗系吉富罗非鱼幼鱼胃排空、生长性能和体组成的影响. *水产学报*, 2011, 35(11): 1677–1683]
- Sun YS, Zhang XQ, Shi DJ, *et al.* Feeding rhythm and daily food intake of Jade Perch *Scortum barcoo*. *Fisheries Science*, 2012, 31(1): 28–31 [孙砚胜, 张秀倩, 史东杰, 等. 宝石鲈摄食节律和日摄食率的初步研究. *水产科学*, 2012, 31(1): 28–31]
- Sundararaj BI, Nath P, Halberg F. Circadian meal timing in relation to lighting schedule optimizes catfish body weight gain. *Journal of Nutrition*, 1982, 112(6): 1085–1097
- Sweka JA, Cox MK, Hartman KJ. Gastric evacuation rates of brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2004, 133(1): 204–210
- Wang CL, Liang MQ, Xu HG. Optimum feeding frequency for *Litopenaeus vannamei* during the breeding period. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 74–82 [汪春玲, 梁萌青, 徐后国. 凡纳滨对虾亲虾繁殖期间适宜投喂频率的研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 74–82]
- Xu DF, Liu K, Wang PF, *et al.* Analysis of nutritional composition in the muscle of *Thamnaconus septentrionalis*. *Marine Sciences*, 2018, 42(5): 122–129 [徐大风, 刘琨, 王鹏飞, 等. 绿鳍马面鲀肌肉营养成分分析和营养评价. *海洋科学*, 2018, 42(5): 122–129]
- Xu XL, Zheng YJ, Liu S. Estimation of stock size of filefish *Thamnaconus modestus* in the East China Sea and Yellow Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1992, 23(6): 651–656 [许学龙, 郑元甲, 刘松. 东、黄海绿鳍马面鲀的资源评估. *海洋与湖沼*, 1992, 23(6): 651–656]
- Zhang B, Sun Y, Tang QS. Gastric evacuation rate of black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(2): 287–289 [张波, 孙耀, 唐启升. 黑鲷的胃排空率. *应用生态学报*, 2000, 11(2): 287–289]
- Zhang JN. Reproductive regulation and fry breeding technology of *Thamnaconus septentrionalis* Günther. Master's Thesis of China Ocean University, 2011 [张家男. 绿鳍马面鲀的生殖调控与苗种繁育技术. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhang T, Li WJ, Zhuang P, *et al.* Analysis of gastric evacuation characteristics and associated mathematical models in juvenile *Acipenser gueldenstaedtii*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 151–155 [张涛, 李伟杰, 庄平, 等. 俄罗斯鲟幼鱼的胃排空特征及其数学模型. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 151–155]
- Zhang YB, Wang YM, Pu ZW, *et al.* Feeding rhythm and daily feeding amount of larval Taiwan loach. *Journal of Neijiang Normal University*, 2017, 32(8): 77–81 [张运邦, 王永明, 蒲宗旺, 等. 台湾泥鳅仔鱼摄食节律及日摄食量. *内江师范学院学报*, 2017, 32(8): 77–81]
- Zheng KK, Fang W, Kong FH, *et al.* Feeding rhythm and optimal

- feeding time for turbot *Scophthal musmaximus* L. juvenile. *Fishery Modernization*, 2010, 37(5): 26–30 [郑珂珂, 方伟, 孔凡华, 等. 大菱鲆幼鱼的摄食节律及适宜投喂时间. *渔业现代化*, 2010, 37(5): 26–30]
- Zhu YH, Wang YB, Hu ZH. Gastric evacuation of juvenile *Nibea japonica*. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 448–452 [朱云海, 王跃斌, 胡则辉, 等. 日本黄姑鱼幼鱼的胃排空率. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 448–452]
- Zoccarato I, Boccignone M, Palmegiano GB, et al. Meal timing and feeding level: Effect on performance in rainbow trout. In: *Fish nutrition in practice*. Ed. INRA, Les Colloques, 1993, 297–300

(编辑 马瑾艳)

Diet Feeding Rhythm and Analysis of Gastric Evacuation Associated Mathematical Models in Juvenile *Thamnaconus septentrionalis*

ZHANG Pengfei^{1,2}, CHANG Qing^{2①}, CHEN Siqing^{2,3}, XU Zhengxin^{2,4}, ZHAO Jiejie^{1,2}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

Abstract To investigate the diet feeding rhythm of juvenile of *Thamnaconus septentrionalis* and gastric emptying model, a once-per-day satiation feeding treatment (one day was divided into eight time periods, each time period was used as one treatment, and the fish of each treatment were fed to apparent satiation once a day) and a continuous feeding treatment with fixed intervals (one day was divided into eight time periods, the fish in each tank were fed to apparent satiation, eight times a day) were conducted for 7 days. The experimental fish [(4.28±0.46) g] were removed at various intervals (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, and 28 h) after satiation feeding. The wet mass of the chyme was determined and the applicability of the three mathematical models (linear model, exponential model, and square root model) was compared by the fitness of gastric evacuation data in juvenile *T. septentrionalis*. The results showed that *T. septentrionalis* exhibit a 24 h diet feeding cycle under two feeding scenarios. The feeding rate under the segmental continuous feeding mode was not significantly different at 03:00, 06:00, 09:00, and 12:00, but decreased rapidly after reaching a peak at 15:00 ($P<0.05$), and at 0:00 reached the lowest value ($P<0.05$). The feed efficiency was not significantly different at 03:00, 06:00, 15:00, and 18:00 in the once-per-day satiation feeding, and the specific growth rate was significantly higher than that of a once-per-day satiation feeding ($P<0.05$). (2) The feeding rate of experimental fish decreased rapidly after 18:00 in the continuous feeding with a fixed interval ($P<0.05$), and reached the lowest value at 00:00 ($P<0.05$). The specific growth rate and feed efficiency at 09:00 and 12:00 in the experimental fish were significantly higher than at the other times of the day ($P<0.05$), optimal feeding times in *T. septentrionalis* culturing were during 15:00~18:00. (3) Among the three models, the gastric emptying rate was best fitted the square root model, and the equation was $y^{0.5}=2.802-0.204t$ ($R^2=0.987$). According to the square root model, the feed in the stomach was fed for 10 h. The left and right sides were completely emptied to the level before feeding, and the 80% gastric emptying time was 6 h. Based on the above indicators, it is recommended to feed the *T. septentrionalis* 3 times every day during the production practice from 09:00 to 15:00, with an interval of 3 h.

Key words *Thamnaconus septentrionalis*; Feeding rhythm; Feeding efficiency; Specific growth rate; Gastric evacuation rate

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181101001

http://www.yykxjz.cn/

温久福, 蓝军南, 曹明, 周慧, 区又君, 李加儿. 盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 112-118

Wen JF, Lan JN, Cao M, Zhou H, Ou YJ, Li JE. Effects of salinity on the histological structure of the gills, spleen, and muscle in *Lateolabrax maculatus* juveniles. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 112-118

盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响*

温久福¹ 蓝军南^{1,2} 曹明³ 周慧¹ 区又君^{1①} 李加儿¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 水产科学国家级实验教学示范中心 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室 上海 201306; 3. 广东省渔业种质保护中心 广州 511453)

摘要 为了探究不同盐度对花鲈(*Lateolabrax maculatus*)幼鱼组织结构的影响,用组织学方法对不同盐度条件下(0、10、15、20、30)花鲈幼鱼的鳃、脾及肌肉组织结构进行研究。结果显示,盐度为 0 时,花鲈幼鱼鳃丝排列紧密,顶端膨大呈棒状,鳃小片细胞饱满,有少量泌氯细胞。花鲈幼鱼鳃丝宽度随盐度的升高而缩小,鳃小片间距则逐渐增大,差异显著($P<0.05$);盐度为 20 时,部分鳃小片变形脱落,鳃丝上的泌氯细胞明显增多增大;盐度为 30 时,鳃丝宽度较大,出现断裂脱落,鳃丝上细胞排列疏松,泌氯细胞明显膨大,有溶解现象。脾脏在淡水条件下(盐度为 0),淋巴细胞数目较少,血细胞较多;在低盐环境中(盐度为 10、15),淋巴细胞增大,数量增多,黑色素巨噬细胞中心数量增加;在高盐度下(盐度为 30),脾细胞和部分淋巴细胞出现肿大、空泡化现象,细胞排列疏松。盐度为 0 时,花鲈幼鱼肌纤维排列较为疏松,多角形或长椭圆形,长径和短径较大、密度较小;盐度为 15 时,肌纤维短径变小、密度增大,与 0、10 盐度组均差异显著,盐度为 30 时,肌纤维长径增大、密度减小;随着盐度的增加,肌纤维长径和短径均有先减小后增加的趋势,单位面积肌纤维数量则先增加后减小,差异显著($P<0.05$)。结果表明,花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构变化特征与其所处的环境盐度有关。

关键词 盐度;花鲈;鳃;脾脏;肌肉;组织结构

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0112-07

盐度是影响海水硬骨鱼类生存的重要环境因子之一。不同鱼类对环境盐度有特定的适应范围。为应对外界盐度的改变,大多数硬骨鱼类进化形成了完备的渗透压调节功能。广盐性鱼类能在较大盐度范围下生活,在盐度发生变化时,相关组织结构会发生适应性变化,从而保持较好的摄食、吸收和能量转化效率。鳃是鱼类的主要渗透调节器官,参与调节机体渗透

压、pH、离子浓度、耗氧率及氨氮排泄等,以维持机体内外环境平衡(Shivakumar *et al.*, 1986; Ern *et al.*, 2018)。国内外学者已在红姑鱼(*Sciaenops ocellatus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、斑尾复鰕虎鱼(*Synechogobius ommaturus*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)等多种鱼类中研究了盐度对鳃组织结构以及酶活性的影响(Ern *et al.*, 2018;

* 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016TS02)资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2016TS02)]. 温久福, E-mail: nhswjf@163.com

① 通讯作者: 区又君, 研究员, E-mail: ouyoujun@126.com

收稿日期: 2018-11-01, 收修改稿日期: 2018-12-10

Gibbons *et al.*, 2018; Shui *et al.*, 2018; 陈世喜等, 2017; 罗海忠等, 2015)。盐度的波动还会对机体造成应激胁迫, 脾脏是重要的免疫器官, 研究发现, 水体中盐度变化对鱼类脾脏淋巴细胞、粒细胞以及巨噬细胞的形态、结构有较大的影响(王晓杰等, 2006)。已有研究结果显示, 鱼类肌肉组织中肌纤维直径和密度受到盐度的影响, 最终通过这些变化来调控肌肉的增生速率(何燕富等, 2016; 秦桂香等, 2010)。

花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、鲈科 (Serranidae)、花鲈属 (*Lateolabrax*), 俗名七星鲈、海鲈、寨花等, 在我国以及朝鲜、日本沿海等均有分布, 是我国重要经济海水鱼类之一。因其适应盐度范围较广, 在海水、半咸水、淡水中均有养殖。近年来, 对花鲈营养、免疫及渗透调节机制等的研究较多(胡晓伟等, 2018; 张晓燕等, 2018; 潘艳艳等, 2016; 张婷婷等, 2017; 李富祥等, 2018)。然而, 在不同盐度下, 花鲈的组织结构变化等方面鲜有报道。本研究主要以花鲈幼鱼为对象, 观察其在不同盐度条件下鳃、脾和肌肉组织的结构变化, 为其健康养殖中水环境调控技术的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼采自中国水产科学研究院南海水产研究所珠海基地, 为淡水培育幼苗, 暂养于蓝色养殖箱中 (55 cm×30 cm×42 cm), 养殖用水为曝气处理的自来水, 盐度为 0, 水温为 27℃~29℃, 连续 24 h 充气, 每日定时投喂 2 次配合饲料, 日换水量为总水量的 1/3, 暂养时间为 7 d。暂养结束后, 挑选体格健壮, 规格相近[平均体长为(4.01±0.27) cm]的个体进行实验。

1.2 实验设计

实验设 5 个实验组 S0、S10、S15、S20 和 S30, 对应盐度分别为 0、10、15、20 和 30, 其中, S0 为对照组, 每组设 3 个平行, 每个实验组放幼鱼 50 尾。实验用水为曝气自来水与净化处理的自然海水调配而成。实验开始前, 盐度每隔 24 h 提高 5, 用盐度计进行校准, 误差不超过 0.5, 达到相应盐度后开始实验。实验期间, 充气、水温控制、换水量及投喂管理与暂养时相同。实验时间为 30 d。

1.3 实验方法

实验结束后, 在各实验组随机取样, 取幼鱼右侧鳃丝、脾脏及躯干部右侧肌肉组织样品, 于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。将固定好的组织样品制成石蜡

切片, 常规 HE 染色, 中性树脂封片, Zeiss 显微镜下观察并拍照。

1.4 数据测量及分析

采用 Image-ProPlus 5.1 软件测量鳃丝宽度、鳃小片长度、鳃小片宽度、鳃小片间距; 参考秦桂香等 (2010) 的方法测量肌纤维的长径和短径, 以实验用显微镜 (200×) 拍摄的图片 (视野的一个内切矩形) 为单位面积计算肌纤维密度。测量所得数据均用 SPSS 22.0 软件和 Excel 2010 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同盐度条件下花鲈幼鱼存活率

不同盐度条件下花鲈幼鱼养殖死亡率见表 1, 除盐度为 30 条件下有 3 尾鱼死亡外, 其他组均无死亡。

表 1 不同盐度下花鲈幼鱼的死亡率
Tab.1 Mortality of *L. maculatus* juveniles under different salinities

盐度 Salinity	死亡率 Mortality (%)		
	10 d	20 d	30 d
0	0	0	0
10	0	0	0
15	0	0	0
20	0	0	0
30	4	2	0

2.2 鳃

盐度为 0 时, 花鲈幼鱼鳃丝排列紧密, 形状较长, 顶端膨大呈棒状, 内有大量的血细胞; 鳃丝两侧有较长的扁平囊状鳃小片平行排列; 鳃小片由扁平细胞、柱细胞、血细胞及泌氯细胞组成, 细胞饱满, 排列紧密; 有少许泌氯细胞分布于鳃小片基部, 近乎椭圆形, 体积较小细胞核呈蓝紫色, 细胞质着色较浅; 鳃小片上有较多的血细胞, 扁平细胞较厚, 排列紧密 (图 1.1)。盐度为 10 时, 泌氯细胞增大, 数量增多, 血细胞减少 (图 1.2); 鳃丝宽度显著小于 S0 组, 鳃小片变宽, 扁平细胞增厚, 其他结构无明显变化 (表 2)。盐度为 15 时, 鳃丝较长, 排列整齐, 宽度显著变窄 ($P<0.05$); 鳃小片间距增大, 长度缩短, 宽度变窄, 与 S0、S10 组均差异显著 ($P<0.05$); 泌氯细胞体积增大, 数量增多 (图 1.3)。盐度为 20 时, 鳃丝较 S15 组宽, 鳃小片减少, 鳃小片间距较宽, 长度缩短 (表 2); 泌氯细胞体积明显增大, 细胞排列疏松, 扁平上皮细胞有脱落溶解现象 (图 1.4)。盐度为 30 时, 鳃丝宽度较大, 出现断裂脱落现象, 鳃丝上细胞排列疏松, 泌氯细胞

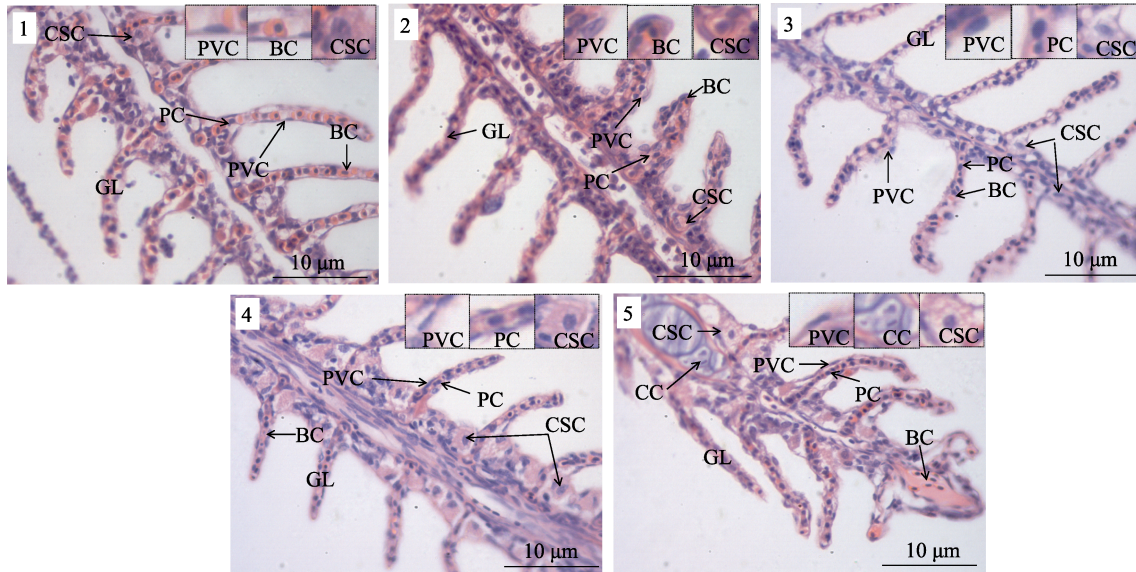


图1 盐度对花鲈幼鱼鳃的影响

Fig.1 The effect of salinity on the gills of *L. maculatus* juveniles

1: 盐度 0; 2: 盐度 10; 3: 盐度 15; 4: 盐度 20; 5: 盐度 30

BC: 血细胞; CSC: 泌氯细胞; GL: 鳃小片; PVC: 扁平上皮细胞; PC: 柱细胞; CC: 软骨细胞

1: Salinity 0; 2: Salinity 10; 3: Salinity 15; 4: Salinity 20; 5: Salinity 30

BC: Blood cell; CSC: Chloride secreting cell; GL: Gill lamellae; PVC: Pavement cell; PC: Pillar cell; CC: Chondrocyte

表2 盐度对花鲈幼鱼鳃组织测量性状的影响

Tab.2 The effect of salinity on the gill meristic characters of *L. maculatus* juveniles (μm)

盐度 Salinity	鳃丝宽度 Breadth of gill filament	鳃小片间距 Intervals of gill lamella	鳃小片长度 Length of gill lamella	鳃小片宽度 Breadth of gill lamella
0	4.31±0.75 ^a	1.85±0.42 ^a	5.13±1.54 ^a	0.99±0.20 ^a
10	3.21±0.65 ^b	1.88±0.37 ^a	4.89±1.08 ^a	1.20±0.32 ^b
15	1.96±0.86 ^c	2.72±0.20 ^b	3.98±0.82 ^b	0.70±0.10 ^c
20	3.78±1.75 ^b	2.61±0.39 ^b	3.41±0.39 ^b	0.86±0.11 ^d
30	4.22±1.01 ^{ac}	3.01±1.15 ^c	6.38±1.85 ^{ac}	0.87±0.12 ^{ad}

注: 同列数据上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 下同Note: Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups ($P<0.05$), the same as below

明显膨大, 见溶解状态(图 1.5); 鳃小片数量较少, 形态不规则, 小片间距和长度显著增大($P<0.05$) (表 1)。

2.3 脾脏

花鲈脾脏外层为由结缔组织和扁平细胞组成的被膜, 被膜往里为实质组织, 结缔组织往内部延伸使实质组织形成脾小叶, 小叶间排列紧密界限不明显。脾脏内有大量的血管和血细胞。脾实质由红髓质和白髓组成, 二者分界不明显, 互相穿插; 红髓染色较浅, 主要由红细胞组成; 白髓染色较深, 主要由大量的淋巴细胞和少量巨噬细胞及颗粒细胞组成; 脾细胞形态多样, 呈圆形、椭圆形或多角形(图 2)。盐度为 0 时, 脾脏有较多血细胞, 淋巴细胞较少(图 2.1); 盐度为 10 时, 血细胞减少, 有较多的巨噬细胞, 淋巴细胞

聚集中心明显(图 2.2); 盐度为 15 时, 出现较多的黑色素巨噬细胞中心(图 2.3); 盐度为 20 时, 脾窦范围增大, 血细胞增多(图 2.4)。盐度为 30 时, 见部分脾细胞和淋巴细胞肿大, 并出现空泡, 细胞间排列较为疏松, 有少许细胞溶解, 差异较为明显(图 2.5)。

2.4 肌肉

花鲈幼鱼肌肉组织由神经、结缔组织、血管以及形状大小不规则的肌纤维组成, 肌纤维由结缔组织包围成纤维束, 肌纤维有许多细胞核, 排列在基膜附近, 椭圆形或梭形, 呈蓝紫色。肌肉横切肌纤维呈多角形、椭圆形或梭形, 排列较紧密, 直径不均一(图 3)。盐度为 0 时, 肌纤维排列较为疏松, 多角形或长椭圆形, 长径和短径较大, 密度较小(表 3)。盐度为 10 时, 肌

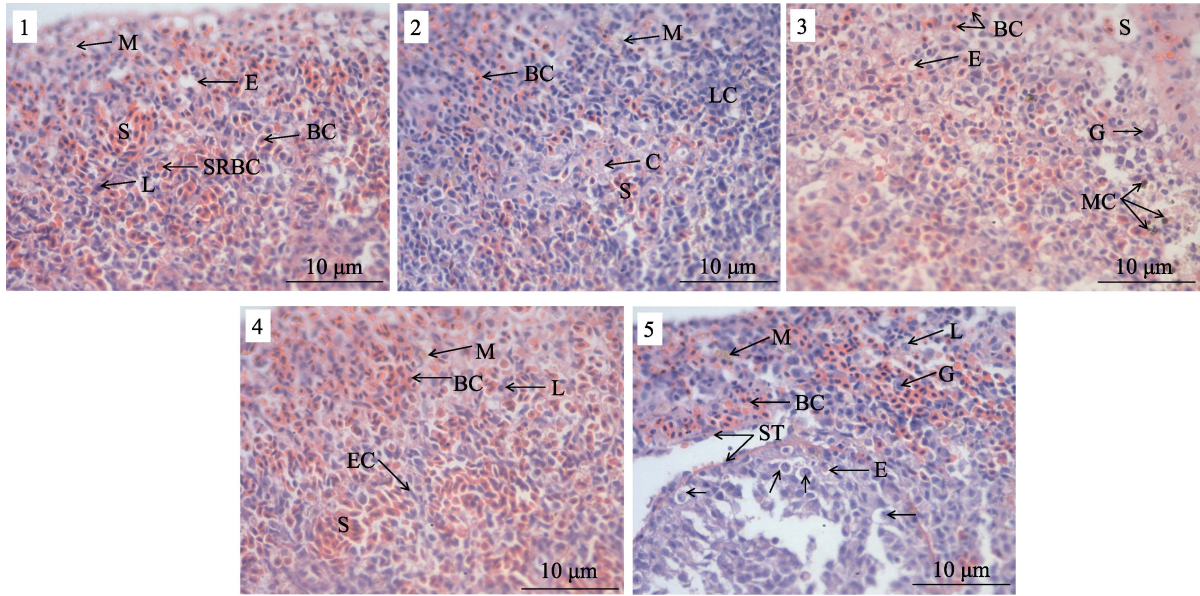


图 2 盐度对花鲈幼鱼脾脏的影响

Fig.2 The effect of salinity on the spleens of *L. maculatus* juveniles

1: 盐度 0; 2: 盐度 10; 3: 盐度 15; 4: 盐度 20; 5: 盐度 30, “↑” 示淋巴细胞肿大和空泡化
 BC: 血细胞; E: 椭圆体; EC: 内皮细胞; C: 脾索; G: 粒细胞; L: 淋巴细胞; LC: 淋巴细胞中心;
 M: 巨噬细胞; MC: 黑色素巨噬细胞中心; S: 脾窦; ST: 脾小梁; SRBC: 衰老红细胞

1: Salinity 0; 2: Salinity 10; 3: Salinity 15; 4: Salinity 20; 5: Salinity 30. “↑” indicate lymphocyte enlargement and vacuolation
 BC: Blood cell; C: Splenic cord; E: Ellipsoid; G: Granulocyte; L: Lymphocyte; LC: Lymphocytes center; M: Macrophage;
 MC: Melano-macrophage center; S: Spleen sinus; ST: Spleen trabecular; SRBC: Senile red blood cell

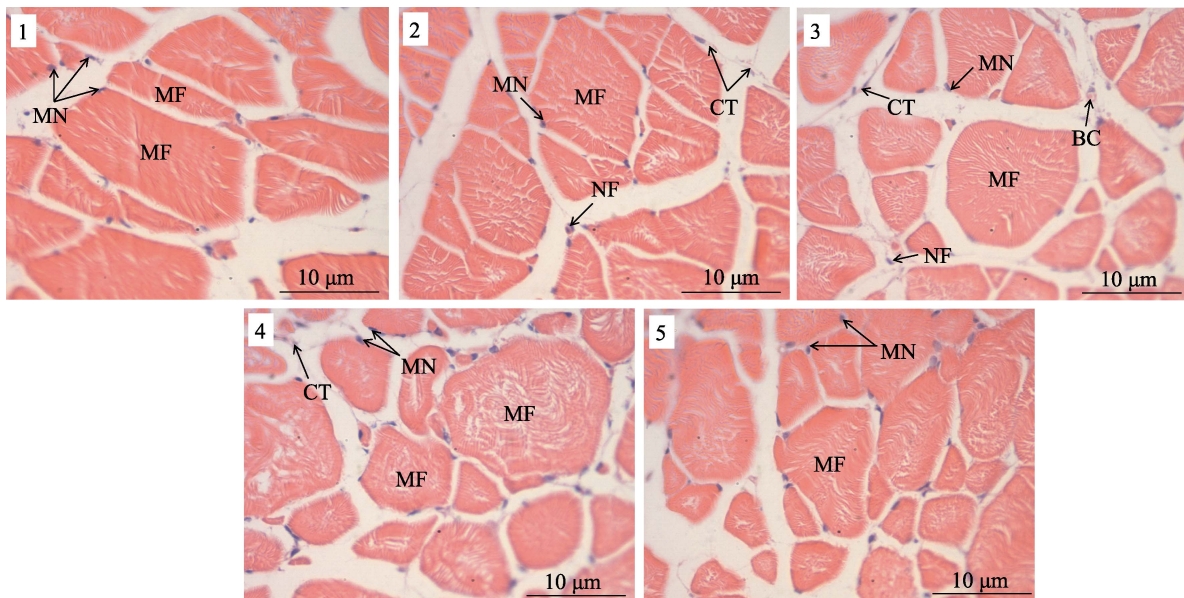


图 3 盐度对花鲈幼鱼肌肉的影响

Fig.3 The effect of salinity on the muscle of *L. maculatus* juveniles

1: 盐度 0; 2: 盐度 10; 3: 盐度 15; 4: 盐度 20; 5: 盐度 30
 BC: 毛细血管; CT: 结缔组织; MF: 肌纤维; MN: 肌细胞核; NF: 神经纤维

1: Salinity 0; 2: Salinity 10; 3: Salinity 15; 4: Salinity 20; 5: Salinity 30
 BC: Blood capillary; CT: Connective tissue; MF: Muscel fiber; MN: Myocyte nucleus; NF: Nerve fiber

表 3 盐度对花鲈幼鱼肌肉测量性状的影响
Tab.3 The effect of salinity on the muscle meristic characters of *L. maculatus juveniles*

盐度 Salinity	肌纤维长径 Length-diameter of muscle fiber (μm)	肌纤维短径 Short-diameter of muscle fiber (μm)	密度(根/单位面积) Density (pieces per unit area)
0	11.09 \pm 4.07 ^a	5.78 \pm 2.23 ^a	33.33 \pm 4.99 ^a
10	7.64 \pm 3.14 ^b	5.25 \pm 2.46 ^a	94.33 \pm 5.91 ^b
15	7.36 \pm 2.71 ^b	4.60 \pm 1.79 ^b	116.00 \pm 12.03 ^c
20	7.77 \pm 3.53 ^b	4.77 \pm 2.26 ^b	79.00 \pm 9.42 ^d
30	10.93 \pm 4.77 ^a	4.40 \pm 2.22 ^b	65.67 \pm 9.53 ^d

纤维长径变小,短径变化不明显,排列较紧密,形状较规则,呈多角形,密度显著增大(图 3、表 3)。盐度为 15 时,肌纤维短径变小,密度增大,与 S0、S10 组均差异显著($P<0.05$)。盐度为 20 时,肌纤维椭圆形或多角形,排列疏松,纤维束间隙较大(图 3d)。盐度为 30 时,肌纤维长径增大,密度减小(表 3)。

3 讨论

该实验中各组花鲈幼鱼的存活率都较高,表明在 0~30 的盐度范围内,花鲈幼鱼能够保持完整的渗透调节能力,能够生长、存活。

该实验结果显示,花鲈在淡水和低盐环境中(S0 和 S10)其鳃丝和鳃小片较宽、形态较长,细胞饱满,排列紧密,有利于与水体充分接触,更易摄入水中的无机离子以适应低渗环境;泌氯细胞体积较小,数量很少,表现出适应低渗环境的形态特征;扁平细胞较厚,排列紧密,可能是防止离子自由渗漏(Evans *et al.*, 2005)。随着盐度的增加,鳃丝宽度变小,鳃小片间距增大,长度变短;泌氯细胞体积显著增大。当盐度达到 20 时,部分鳃小片变形脱落,鳃丝上的泌氯细胞明显增多增大;盐度为 30 时,鳃丝宽度较大,出现断裂脱落,鳃丝上细胞排列疏松,泌氯细胞明显膨大,见溶解状态。这与鲮鱼(*Mugil cephalus*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)(于娜等, 2012; Nolan *et al.*, 1999)的研究结果基本一致。随着盐度的增加,花鲈幼鱼为适应环境需增加水、氧交换量以维持渗透平衡,其鳃丝的结构发生一定程度的萎缩,鳃丝细胞缩小和鳃小片间距增大,当盐度超过一定的耐受范围(盐度为 30 时),其鳃丝结构不同程度的脱落或分离。鳃丝上的泌氯细胞数量明显增加,胞体变大,说明其泌氯功能和细胞的代谢水平明显提高,发挥了 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子代谢平衡调节作用(Prunet *et al.*, 1994)。花鲈为维持机体渗透平衡,在不同盐度下,鳃组织发生适应性改变,过高的盐度波动会造成组织损伤。

脾脏是硬骨鱼类的免疫、造血和滤血器官,其主要免疫细胞有淋巴细胞、颗粒细胞、巨噬细胞等(王鸿鹄等, 2006; 李长玲等, 2002)。各种免疫细胞具有机体免疫和吞噬的功能。低盐胁迫下,许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)脾脏组织中淋巴细胞数量增多聚集,粒细胞形态结构变化较显著(王晓杰等, 2006)。该研究结果显示,淡水环境中(盐度为 0),花鲈幼鱼脾脏有较多红细胞,淋巴细胞较少,免疫能力较弱。随着盐度增加,在盐度为 10 和 15 的环境中,淋巴细胞增加,出现明显的淋巴细胞聚集中心,此外,巨噬细胞增多,黑色素巨噬细胞聚集,颗粒细胞增大,推测是由于盐度胁迫使其产生适应性免疫反应,增强脾脏免疫功能。在盐度为 30 时,脾细胞和部分淋巴细胞出现肿大、空泡化现象,可能是由于高盐度长时间胁迫使花鲈幼鱼免疫细胞受损,导致整体细胞功能减弱;严重的部分细胞溶解,黑色素巨噬细胞聚集中心减少,推测高盐度胁迫使巨噬细胞的结构受损,阻碍黑色素巨噬细胞的集结发育,黑色素巨噬细胞中心数量减少。高盐度的水环境和较大的盐度变化会对花鲈幼鱼的生长发育产生不利影响。

肌肉的组织结构主要由构成肌肉的肌纤维数量、肌纤维的直径大小、长度以及肌原纤维决定,而肌纤维直径是描述肌肉特征的重要参数。研究表明,营养水平、运动方式、环境因子等直接影响肌纤维的发育(郭琼林等, 1993; Johnston *et al.*, 2000、2003)。研究结果显示,随着盐度的增加,花鲈幼鱼肌纤维长径和短径均有先减小后增加的趋势,单位面积肌纤维数量则呈先增加后减小的趋势,差异显著($P<0.05$)。研究表明,肌纤维数目在出生前已固定,因此,在出生后的生长发育中主要是肌纤维直径与长度的增加(Stickland *et al.*, 1975)。肌纤维密度反映了肌肉增生速率的大小,推测是鱼类增长速度在不同盐度下差异的原因之一(关文静等, 2008)。本研究在不同盐度条件下,花鲈幼鱼的肌肉组织结构产生差异,随着肌纤维增粗,肌肉间结缔组织与脂肪组织的增加,肌纤维密

度下降, 该结果可为解析其生长调控机理提供参考。

参 考 文 献

- Chen SX, Wang PF, Ou YJ, *et al.* Acute and chronic hypoxia effect on gills of golden pompano (*Trachinotus ovatus*). South China Fisheries Science, 2017, 13(1): 124–130 [陈世喜, 王鹏飞, 区又君, 等. 急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹鳃器官的影响. 南方水产科学, 2017, 13(1): 124–130]
- Ern R, Esbaugh AJ. Effects of salinity and hypoxia-induced hyperventilation on oxygen consumption and cost of osmoregulation in the estuarine red drum (*Sciaenops ocellatus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2018, 222: 52–59
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97–177
- Gibbons TC, McBryan TL, Schulte PM. Interactive effects of salinity and temperature acclimation on gill morphology and gene expression in threespine stickleback. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2018, 221: 55–62
- Guan WJ, Zhu YF, Chen ZD. Muscle quality in fish related to characteristics of muscular fibers. Fisheries Science, 2008, 27(2): 101–104 [关文静, 朱艺峰, 陈芝丹. 鱼类肌纤维特性与鱼肉品质关系. 水产科学, 2008, 27(2): 101–104]
- Guo QL, Lu QZ. Observation on the development of blood cells in kidney and spleen of grass carp. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(1): 40–45 [郭琼林, 卢全章. 草鱼肾脏和脾脏血细胞发育过程的观察. 水生生物学报, 1993, 17(1): 40–45]
- He YF, Wang LM, Liu N, *et al.* Effects of acute salinity stress and chronic salinity acclimatization on survival and muscle component of Malaysia red tilapia. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(3): 280–284 [何燕富, 王兰梅, 刘念, 等. 急性盐度胁迫和慢性盐度驯化对马来西亚红罗非鱼存活及肌肉组分的影响. 大连海洋大学学报, 2016, 31(3): 280–284]
- Hu XW, Shangguan JB, Li ZB, *et al.* Effects of dietary chitosan oligosaccharide on the performance, digestion and serum biochemical indexes of the juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Acta Oceanologica Sinica, 2018, 40(2): 69–76 [胡晓伟, 上官静波, 黎中宝, 等. 饲料中添加壳寡糖对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼的生长、消化和血清生化指标的影响. 海洋学报, 2018, 40(2): 69–76]
- Johnston IA, Alderson R, Sandham C, *et al.* Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 2000, 189(3–4): 335–349
- Johnston IA, Manthri S, Alderson R, *et al.* Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Experimental Biology, 2003, 206(8): 1337–1351
- Li CL, Cao FJ, Liu CW, *et al.* The microstructure of spleen and head kidney in *Plectorhynchus cinctus*. Marine Science Bulletin, 2002, 21(2): 30–35 [李长玲, 曹伏君, 刘楚吾, 等. 花尾胡椒鲷脾脏和头肾显微结构的观察. 海洋通报, 2002, 21(2): 30–35]
- Li FX, Wang PF, Yan LL, *et al.* Molecular cloning and expression pattern analysis of *irak4* in sea perch (*Lateolabrax maculatus*). South China Fisheries Science, 2018, 14(5): 70–79 [李富祥, 王鹏飞, 闫路路, 等. 花鲈 *irak4* 基因 cDNA 的克隆与表达分析. 南方水产科学, 2018, 14(5): 70–79]
- Luo HZ, Li WY, Fu RB, *et al.* The effects of salinity on the growth of juvenile *Eleutheronema tetradactylum* and Na⁺/K⁺-ATPase enzyme. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 94–99 [罗海忠, 李伟业, 傅荣兵, 等. 盐度对四指马鲛 (*Eleutheronema tetradactylum*) 幼鱼生长及其鳃丝 Na⁺/K⁺-ATPase 酶的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 94–99]
- Nolan DT, Op't Veld RLJM, Balm PHM, *et al.* Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement. Aquaculture, 1999, 177(1–4): 297–309
- Pan YY, Gu XY, Zhang DM, *et al.* Effects of fasting and refeeding on *Lateolabrax japonicus* intestinal microflora diversity. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(5): 776–784 [潘艳艳, 顾晓英, 张德民, 等. 饥饿及恢复喂食对花鲈肠道菌群多样性的影响. 水产学报, 2016, 40(5): 776–784]
- Prunet P, Pisam M, Claireaux JP, *et al.* Effects of growth hormone on gill chloride cells in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). American Journal of Physiology, 1994, 266(2): 850–857
- Qin GX, Wei Q, Yu JQ. Histological characterization muscular and gill of *Gymnocypris przewalskii*. Journal of Qinghai University (Natural Science), 2010, 28(2): 4–7 [秦桂香, 魏青, 余家庆. 青海湖裸鲤肌肉和鳃组织结构特征. 青海大学学报(自然科学版), 2010, 28(2): 4–7]
- Shivakumar K, Jayaraman J. Salinity adaptation in fish: Interaction of thyroxine with fish gill mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 245(2): 356–362
- Shui C, Shi Y, Hua X, *et al.* Serum osmolality and ions, and gill Na⁺/K⁺-ATPase of spottedtail goby *Synechogobius ommaturus* (R.) in response to acute salinity changes. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(2): 79–83
- Stickland NC, Widdowson EM, Goldspink G. Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs. British Journal of Nutrition, 1975, 34(3): 421–428
- Wang HH, Li CL, Cao FJ, *et al.* Microstructure of head-kidney and spleen in *Lutjanus sanguineus*. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2006, 25(3): 360–367 [王鸿鹄, 李长玲, 曹伏君, 等. 红笛鲷头肾和脾脏显微结构的观察. 台湾海峡, 2006, 25(3): 360–367]
- Wang XJ, Zhang XM, Jiang M. Salinity stress on the ultrastructure of gill, head kidney and spleen of rockfish

- (*Sebastes schlegeli*). Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(S1): 85–90 [王晓杰, 张秀梅, 姜明. 盐度胁迫对许氏平鲉鳃、头肾、脾脏超微结构的影响. 中国海洋大学学报, 2006, 36(S1): 85–90]
- Yu N, Li JE, Ou YJ, *et al.* Structural changes in gill and kidney of juvenile grey mullet under different salinity. Ecological Science, 2012, 31(4): 424–428 [于娜, 李加儿, 区又君, 等. 不同盐度下鲮鱼幼鱼鳃和肾组织结构变化. 生态科学, 2012, 31(4): 424–428]
- Zhang TT, Chen XR, Liang MQ, *et al.* Effects of different protein hydrolysates on growth performance and non-specific immunity of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 96–105 [张婷婷, 陈效儒, 梁萌青, 等. 不同蛋白水解物对花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 生长性能及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 96–105]
- Zhang XY, Wen HS, Zhang KQ, *et al.* Analysis of the isotonic point and effects of seawater desalination on the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ concentration, Na^+/K^+ -ATPase activity and relative gene expressions in *Lateolabrax japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(8): 1199–1208 [张晓燕, 温海深, 张凯强, 等. 花鲈等渗点分析及海水淡化对 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 浓度、 Na^+/K^+ -ATP 酶活性及基因表达的影响. 水产学报, 2018, 42(8): 1199–1208]

(编辑 马璀艳)

Effects of Salinity on the Histological Structure of the Gills, Spleen, and Muscle in *Lateolabrax maculatus* Juveniles

WEN Jiufu¹, LAN Junnan^{1,2}, CAO Ming³, ZHOU Hui¹, OU Youjun¹Ⓐ, LI Jiaer¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300; 2. Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; National Demonstration Center for Experimental Fisheries, Science Education; Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai 201306; 3. Guangdong Provincial Fishery Germplasm Conservation Center, Guangzhou 511453)

Abstract To explore the histological features of *Lateolabrax maculatus* juveniles cultured at different salinities, the structures of the gills, spleen, and muscle were analyzed at different salinities (0, 10, 15, 20, and 30) via histological analysis. The results showed that at salinity 0, the gill filaments of *L. maculatus* juveniles were closely arranged, the top of the gills expanded into a rod shape, and the gill cells were plump with more chlorine-secreting cells; the breadth of the gill filaments decreased, and the intervals of the gill lamella became larger as the salinity increased ($P < 0.05$). At salinity 20, some gill lamellas decomposed and fell off, the number of chlorine-secreting cells on the gill filaments increased significantly. At salinity 30, the number and size of chloride cells increased as the salinity increased and some chloride cells expanded and dissolved. In freshwater, more blood cells and fewer lymphocytes were observed in the spleen, whereas in the hyposaline environment (salinity 10 and 15), the lymphocytes were enlarged and the number of melanin macrophages increased. At high salinity (30), the spleen cells and some lymphocytes showed swelling and vacuolation and were loosely arranged. At salinity 0, the muscle fibers of the juveniles were loosely arranged, polygonal or oblong, with larger major and minor diameters and smaller densities. With the increasing salinity, both the major and minor diameters of muscle fibers tended to decrease first and then increase again. At salinity 15, the short diameter of muscle fibers decreased and their densities increased, which were significantly different from that observed at salinity 0 and 10. At salinity 30, the long diameter of muscle fibers increased and their densities decreased. In summary, as the salinity increased, both the long and short diameters of muscle fibers tended to decrease first and then increase ($P < 0.05$). The results indicated that the histological structures of the gill, spleen, and muscle of *L. maculatus* juveniles were affected by the environment and salinity.

Key words Salinity; *Lateolabrax maculatus*; Gills; Spleen; Muscle; Histological structure

Ⓐ Corresponding author: OU Youjun, E-mail: ouyoujun@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181120002

http://www.yykxjz.cn/

康恺, 吴江, 苑麟勇, 刘丽欢, 陈永灵, 效梅, 安立龙. 尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系建立及优化. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 119-126

Kang K, Wu J, Yuan LY, Liu LH, Chen YL, Xiao M, An LL. Establishment and optimization of an isolation and culture system for Sertoli cells of Nile tilapia. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 119-126

尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养 体系建立及优化*



康 恺 吴 江 苑麟勇 刘丽欢 陈永灵 效 梅 安立龙^①

(广东海洋大学农学院 湛江 524088)

摘要 本研究分离培养尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)精巢支持细胞(Sertoli cells, SCs), 建立并优化尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系。无菌条件下, 取发育至第Ⅲ期的尼罗罗非鱼精巢, PBS清洗后, 剪碎精巢组织, 0.25%胰蛋白酶消化, 用含10%犊牛血清(Newborn bovine serum, NBS)的L-15培养液终止消化, 过滤、离心, 获得细胞。差速贴壁法获得SCs后, 在26℃、无CO₂饱和湿度恒温培养箱中培养。分别采用含10% NBS的L-15、M199、F12培养液, 含5%、10%、15% NBS的L-15培养液, 含1%罗非鱼血清的L-15+10% NBS培养液培养尼罗罗非鱼SCs。各组每2 d取细胞计数, 绘制SCs生长曲线; 甲基绿染色, 倒置显微镜下观察SCs的形态。尼罗罗非鱼SCs培养1~2 d, 细胞贴壁; 培养3~5 d, 细胞完全贴壁并迅速增殖。单个SCs呈不规则多边形, 其核位于胞质中央, 呈卵圆形, 胞质中可见吞噬颗粒和空泡, 空泡聚集于支持细胞胞质的两极或散布于核的四周。SCs在L-15培养液中贴壁生长, 在F12、M199培养基中较难贴壁。与F12、M199培养液相比, L-15培养液更有助于尼罗罗非鱼SCs生长增殖($P < 0.01$)。与添加5%和15% NBS相比, 在L-15培养基中添加10% NBS更有助于尼罗罗非鱼SCs生长增殖($P < 0.05$)。与未添加尼罗罗非鱼血清相比, 在10% NBS+L-15培养中添加1%尼罗罗非鱼血清, 能显著促进SCs生长增殖($P < 0.05$)。研究表明, 采用胰酶消化差速贴壁法获得尼罗罗非鱼精巢支持细胞, 10% NBS+1%罗非鱼血清+L-15培养液培养, 能显著促进尼罗罗非鱼精巢支持细胞生长增殖。

关键词 尼罗罗非鱼; 支持细胞; 分离培养; 体系优化

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0119-08

支持细胞作为睾丸中的一种重要组成细胞, 在研究有关雄性生殖系统疾病的发病机制以及外源性物质对雄性生殖系统的作用机理时, 不可避免地要涉及

到支持细胞(Edelsztein *et al*, 2018)。近年来对支持细胞的研究表明, 支持细胞合成分泌SCF、FGF、TGF和IGF等生长因子(Jiang *et al*, 2013), 对精原干细

* 广东海洋大学博士启动基金(R17027; R17021)和广东海洋大学大学生创新实验项目(CXXL2016012; qhjh2017zr12)共同资助 [This work was supported by Dr. Start-Up Fund of Guangdong Ocean University (R17027; R17021), and College Students' Innovative Experimental Project of Guangdong Ocean University (CXXL2016012; qhjh2017zr12)]. 康 恺, E-mail: kangkai610@126.com

^① 通讯作者: 安立龙, 教授, E-mail: anlilong@126.com

收稿日期: 2018-11-20, 收修改稿日期: 2018-12-24

增殖有促进作用,支持细胞与原始生殖细胞、精原干细胞等联合培养,可促进共培养细胞的生长增殖(Regueira *et al.*, 2014)。

支持细胞具有免疫抑制功能,可以用于在睾丸以外的部位为移植细胞提供免疫豁免的环境(Koji *et al.*, 2001; Luca *et al.*, 2018)。Willing 等(1999)将睾丸支持细胞和胚胎中脑细胞共同培养后移植入帕金森病动物模型脑中,7 d 后移植部位酪氨酸羟化酶阳性神经元数量显著增加,而且神经元胞体的大小和突起均有增加。而这些都是以支持细胞的体外培养为基础,有关支持细胞的体外分离、纯化及培养的研究,国内外均有报道(滕琰等, 2005; Sakai, 2002),分离纯度达到90%,并建立了一些支持细胞株,但大多都集中在哺乳动物,对鱼类支持细胞体外培养的研究极少(Ghaem Maghami *et al.*, 2018)。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)属于鲈形目丽鱼科,原产于坦噶尼喀湖,是罗非鱼中最大型的品种(党广成等, 2011; 赵丽慧等, 2014)。本研究以尼罗罗非鱼为对象,研究尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离、纯化和体外培养的生物学特性,建立并优化尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系,以期鱼类支持细胞体外培养建系提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性尼罗罗非鱼购自湛江国联水产开发股份有限公司吴川基地,自然生长且无生殖系统疾病,体长为(9.5±0.5) cm、精巢发育至第Ⅲ期。饲养于1.2 m×1.0 m的孵化桶,每隔3 d换水1次,每天早晚各饲喂1次。实验前,将罗非鱼在0.1%高锰酸钾中浸泡30 min。

1.2 支持细胞的分离培养

1.2.1 胰蛋白酶消化法 无菌条件下取罗非鱼两侧精巢,放入含有双抗的PBS中漂洗5~10 min,除去粘膜及杂质,最后用L-15培养液(Gibco)洗1遍。用手术剪将其剪成1 mm³左右的小块,用200目滤网过滤,除去大部分游离的精子细胞和其他细胞,用含有双抗的PBS清洗滤网上的组织块2次后,收集精巢组织块,加入4 ml 0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA的消化液,26℃消化5~10 min,倒置显微镜(OLYMPUS IX53)下见组织结构消失,细胞游离分散,立即加4 ml含10%犊牛血清(NBS,四季青生物工程材料有限公司)的培养液终止消化,用移液枪吹打,使细胞尽量游离。用200目滤网过滤未完全消化的组织块,过滤

细胞悬液经1000 r/min离心5 min,去除上清液,加入新鲜培养液重悬。取少许细胞悬液,台盼蓝染色,测定死细胞比率。

采用差速贴壁法(利用支持细胞可以牢固贴壁生长,而体外培养的生殖细胞往往贴壁能力弱,需要贴附于饲养层细胞生长的特点)将支持细胞和生殖细胞分离纯化,即将上步获得细胞悬液调整到1×10⁶个/ml后,种植到铺有明胶的培养瓶,置于26℃、无CO₂饱和湿度恒温培养箱(上海迅博)中培养24 h。然后,用移液枪轻轻吹洗贴壁细胞,使未贴壁的生殖细胞浮起,弃去培养液,更换新鲜培养液继续培养贴壁的细胞,每3天换液1次。

1.2.2 组织块贴壁法 无菌条件下取罗非鱼两侧精巢,放入含有双抗的PBS中漂洗5~10 min,除去粘膜及杂质,最后用培养液L-15清洗1遍。用手术剪将其剪成1 mm³左右的小块,组织块间以5 mm间距均匀摆放入培养瓶中,置于26℃、无CO₂饱和湿度恒温培养箱中培养。过12 h后加入新鲜培养液,置于26℃、无CO₂饱和湿度恒温培养箱中培养,培养1 d后换液,之后,每3 d换液1次。待细胞连接成片后,移去组织块。

1.3 支持细胞的继代培养

支持细胞1~5代传代采用原瓶传代,待贴壁细胞密度达70%以上时进行传代。用PBS清洗1~2次后,加消化液(0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA) 2 ml,消化2~5 min,培养基终止消化并吹打悬浮贴壁细胞。细胞悬液1000 r/min离心5 min,去除上清液,培养液重悬细胞,调整细胞密度至1×10⁶个/ml,接种到新的培养瓶中,置于26℃、无CO₂饱和湿度恒温培养箱中培养。3 d后换液,除去死细胞,此后,每24 h观察,每3 d换液2/3,长满单层后可继续传代培养。

1.4 支持细胞生长特性观察和鉴定

对贴壁的单层细胞用碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(南京建成生物工程研究所)染色,检测支持细胞纯度,观察有无混在其中的精原干细胞,然后甲基绿复染检测支持细胞。倒置显微镜观察细胞形态及染色情况。

1.5 不同基础培养液对支持细胞生长增殖的影响

用0.25%胰蛋白酶消化生长状态良好的第2~5代尼罗罗非鱼支持细胞,分装在3支不同的离心管中,1000 r/min离心5 min,除去上清液,分别使用L-15、F12(Gibco)、M199培养液(Gibco)重悬细胞(在此基础上添加10% NBS+1 mmol/L丙酮酸钠、2 mmol/L谷氨

酰胺、100 IU/ml青霉素、100 IU/ml链霉素、15 mmol/L HEPES, 均购置于碧云天生物公司), 取少许台盼蓝染色, 计算细胞存活率。

1.6 血清对支持细胞生长增殖的影响

方法同1.5。基础培养液: L-15+1 mmol/L丙酮酸钠+2 mmol/L谷氨酰胺+100 IU/ml青霉素+100 IU/ml链霉素+15 mmol/L HEPES。在此基础上, 分别添加5%、10%和15%的NBS; 探讨不同浓度NBS对尼罗罗非鱼支持细胞生长增殖的影响。在基础培养液+10% NBS的基础上添加1%罗非鱼血清, 研究罗非鱼血清对支持细胞生长增殖的影响。

1.7 生长曲线的绘制

采用细胞计数法绘制生长曲线。调整细胞悬液密度约为 10^5 个/ml, 少许台盼蓝染色, 计算细胞存活率。将其余细胞悬液接种于 96 孔板中, 置于 26°C 、无 CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养。每 2 d 取出 3 孔细胞消化计数, 用台盼蓝染色, 同时计算细胞存活率。共观察 12 d, 每 3 d 换液 1 次。以细胞培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线。

1.8 统计方法

所有数据采用随机分组设计原理, 采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 各组间采用 LSD 法进行多重比较, 以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, 数据表示为平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)。

2 结果

2.1 胰蛋白酶消化法与组织块培养法分离、培养支持细胞的生长特性

2.1.1 胰蛋白酶消化法分离、培养支持细胞的生长特性

用 0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA 消化分离, 得到尼罗罗非鱼精巢细胞, 在 26°C 、无 CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养。1 d 后, 支持细胞贴壁并极化, 胞体多呈长柱状, 两侧大多有突起, 折光性较强, 数量约占 90%。培养 3 d 后, 成簇的支持细胞开始生长, 支持细胞胞体增大, 呈膜状铺在培养瓶壁上, 形成细胞单层(图 1A)。培养 10 d 后, 细胞增殖速度减慢, 70%~80%细胞融合形成非常牢固的细胞间连接, 胞核清晰可见(图 1B)。

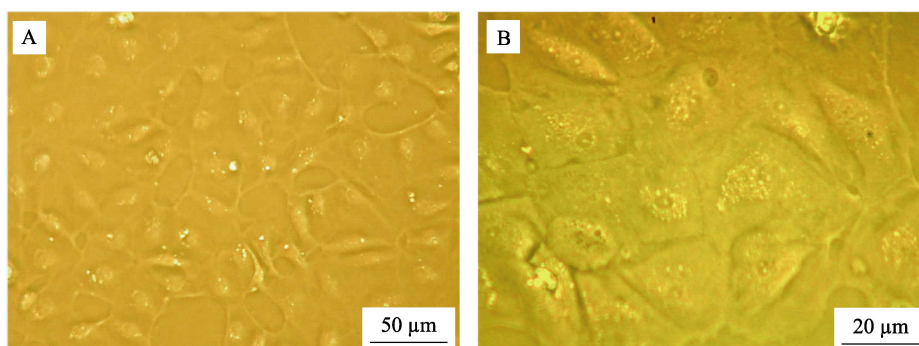


图 1 支持细胞的胰蛋白酶分离、纯化后的培养结果

Fig.1 The cultured Sertoli cells after separation and purification

A: 体外培养 3 d 的原代细胞; B: 体外培养 10 d 的原代细胞

A: Primary cells cultured for 3 days *in vitro*; B: Primary cells cultured for 10 days *in vitro*

2.1.2 组织块培养法培养精巢组织细胞的结果 采用组织块培养法培养第 2 天时, 可见从组织块周围游离出少量细胞, 细胞形态不一, 有呈圆形的细胞; 有呈梭形的细胞, 为成纤维细胞; 支持细胞呈不规则多边形的, 胞体较大, 胞体内可见吞噬的小颗粒状物质。第 3 天开始, 游离出的细胞生长增快, 组织块周围生成致密的细胞层(图 2A)。培养第 7 天, 部分组织块脱离培养瓶壁, 游离出的细胞已成簇生长。取出组织块后, 随着培养时间的增加, 成簇生长的细胞逐渐连接成片, 形成细胞单层。但混杂许多成纤维样细胞, 细

胞层上粘附有大量的生殖细胞(图 2B)。

2.2 支持细胞形态学特征及鉴定

支持细胞开始贴壁生长时呈长柱状或三角形, 当单独存在的支持细胞伸展铺开, 其胞质铺展得很大, 呈不规则的多边形, 可见胞质中吞噬的小颗粒状物质和空泡。体外培养支持细胞, 细胞的突起相互连接, 呈单层膜状。AKP 染色结果发现, 大部分细胞不着色, 为 AKP 阴性(图 3A); 甲基绿染色显示, 胞质中可见多量大小不一的未染色空泡状结构。这些空

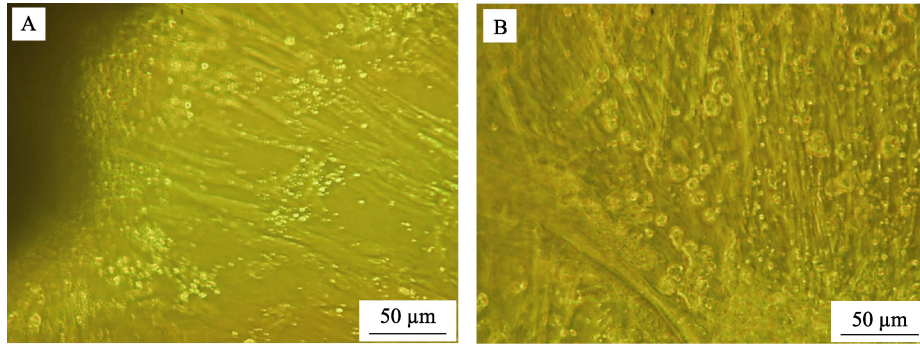


图 2 支持细胞的组织块培养
Fig.2 Sertoli cells cultured in tissue

A: 体外培养 3 d 的原代细胞; B: 体外培养 7 d 的原代细胞
A: Primary cells cultured for 3 days *in vitro*; B: Primary cells cultured for 7 days *in vitro*

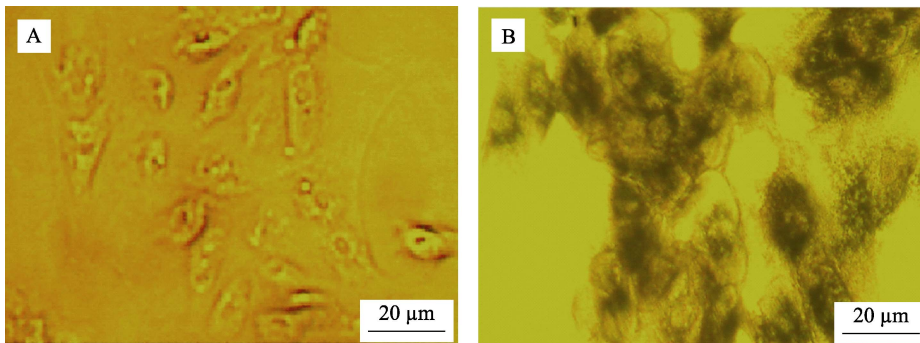


图 3 支持细胞形态学鉴定
Fig.3 Morphology identification of Sertoli cells

A: AKP 染色后的支持细胞; B: 甲基绿染色后的支持细胞
A: Sertoli cells after AKP staining; B: Sertoli cells after methyl green dyeing

泡状的结构是脂质小滴,大小不一,呈圆形或卵圆形,悬浮状存在,聚集于支持细胞胞质的两极或散布于核的四周(图 3B)。

2.3 基础培养液对支持细胞体外增殖的影响

用含 10% NBS 的 L-15、F12 和 M199 基础培养液,在 26℃、无 CO₂ 饱和湿度条件下培养尼罗罗非鱼支持细胞。用 F12 和 M199 培养的支持细胞不易贴壁,细胞未能铺满 50%皿底已停止生长,而用 L-15 培养液培养的支持细胞贴壁良好,活力较强,生长旺盛。培养 4 d 后细胞保持较快增殖速度,8~10 d 即可形成细胞单层。第 8 天后, F12 和 M199 培养液中的支持细胞停止生长,逐渐老化脱落,随换液而丢失。培养第 10 天后, F12 和 M199 培养液中已贴壁的支持细胞逐渐回缩,开始大量脱落; L-15 中的细胞此时已连接成片,但细胞生长增殖开始变慢。在整个培养过程中,用细胞计数法检测支持细胞在 L-15、F12 和 M199 培养液中的生长增殖情况,支持细胞在 3 种培

养液中的生长曲线见图 4。

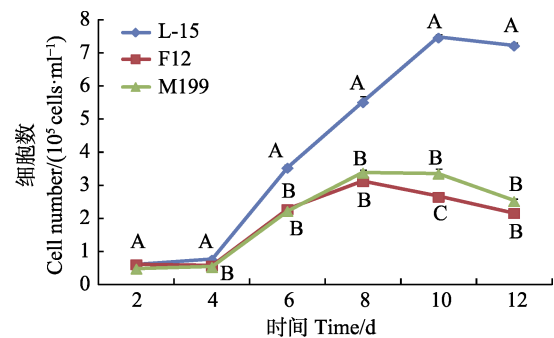


图 4 罗非鱼支持细胞在不同基础培养液中的生长曲线
Fig.4 Growth curve of tilapia Sertoli cells in different medium

同一时间标注不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。生物学重复 $n=3$, 下同
Different letters marked on the data at the same time mean the difference was highly significant ($P < 0.01$), the same letters mean no significant difference ($P > 0.05$). Biological repeats $n=3$, the same as below

如图 4 所示, L-15 培养液中的细胞增殖明显快于 F12 和 M199 组($P<0.01$)。L-15 组中, 第 4 天后支持细胞的数量明显多于 F12 和 M199 组($P<0.01$), 结果表明, L-15 培养基更有助于尼罗罗非鱼支持细胞的生长增殖。

2.4 犊牛血清对支持细胞体外增殖的影响

以 L-15 为基础培养液, 其中分别添加 5%、10% 和 15% NBS, 培养尼罗罗非鱼支持细胞, 各实验组贴壁都较好, 5% NBS 形成的细胞单层面积略小, 培养 5 d 后, 5% NBS 组细胞增殖相对变慢, 可见许多单个支持细胞胞体增大, 呈膜状铺在培养瓶壁上。而 10% 和 15% NBS 组, 细胞生长致密, 细胞之间的连接非常牢固。培养 5 d 后, 10% 和 15% NBS 组中一些细胞集落成簇生长。细胞计数法检测支持细胞的生长增殖状况, 生长曲线见图 5。

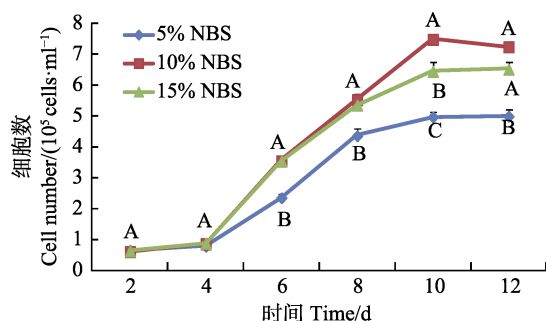


图 5 添加不同浓度犊牛血清时尼罗罗非鱼支持细胞的生长曲线

Fig.5 The cell growth curves of tilapia Sertoli cells cultured with medium containing different concentrations of NBS

如图 5 所示, 15% NBS 组细胞生长增殖显著快于 5% NBS 组($P<0.05$); 10% NBS 组细胞增殖极显著快于 5% NBS 组($P<0.01$)。在培养第 8 天时, 15% NBS 组中的细胞数量显著多于 5% NBS 组($P<0.05$); 在第 6 天、第 10 天和第 12 天, 15% NBS 组中的细胞数量极显著多于 5% NBS 组($P<0.01$); 培养第 6~12 天时, 10% NBS 组细胞数量极显著多于 5% NBS 组($P<0.01$); 培养第 8 天时, 10% NBS 组中的细胞数量显著多于 15% NBS 组($P<0.05$); 培养第 10 天时, 10% NBS 组中的细胞数量极显著多于 15% NBS 组($P<0.01$)。结果表明, 添加 10% NBS 更有利于支持细胞的生长增殖。

2.5 罗非鱼血清对支持细胞的影响

以 L-15+10% NBS 为基础培养液, 添加 1% 的罗

非鱼血清, 培养尼罗罗非鱼支持细胞。结果显示, 在培养前 8 天, 与对照组相比, 支持细胞生长增殖无明显差别, 支持细胞贴壁良好、成簇生长。第 8 天后, 添加罗非鱼血清组, 支持细胞连接紧密, 形成的细胞单层面积比对照组明显增大。在培养第 10 天, 1% 罗非鱼血清组细胞数量显著多于对照组($P<0.05$); 在第 8 天和第 12 天时, 添加 1% 罗非鱼血清组细胞数量极显著多于对照组($P<0.01$)。结果表明, 添加 1% 罗非鱼血清更有助于支持细胞的生长增殖。细胞计数法检测支持细胞的生长增殖状况, 生长曲线见图 6。

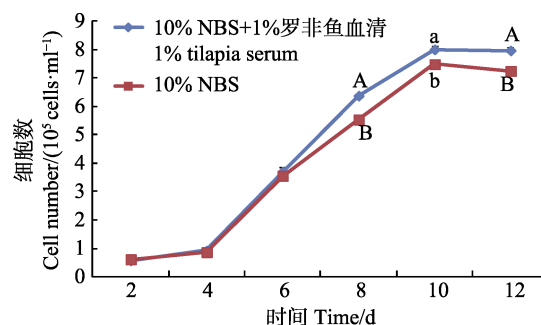


图 6 添加罗非鱼血清时支持细胞的生长曲线
Fig.6 Growth curve of Sertoli cells with addition of tilapia serum

同一时间标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 生物学重复 $n=3$
The different lowercase letters marked on the data at the same time mean difference was significant ($P<0.05$), different capital letters mean difference was highly significant ($P<0.01$). Biological repeats $n=3$

3 讨论

3.1 支持细胞的分离与纯化方法

罗非鱼的精巢为小叶型, 由结缔组织分隔形成小叶, 每个小叶周边由支持细胞与分隔的结缔组织构成, 支持细胞从小叶间获得营养供小叶内生精细胞生长分化, 保证精子发育。选用发育到 III 期的罗非鱼精巢以期分离原代支持细胞, 其精巢中主要为生殖细胞、支持细胞、精子以及少量的成纤维细胞和血细胞。原代细胞分离纯化的方法常用胰蛋白酶消化法和组织块法。本研究中, 胰蛋白酶消化法分离、培养得到的支持细胞纯度较高, 基本没有混杂的生殖细胞, 而组织块培养法培养精巢组织时, 组织块中游离出大量的生殖细胞, 粘附在组织块周围的细胞层上, 杂细胞较多, 不利于支持细胞的纯化。已报道的哺乳动物支持细胞分离纯化的文献, 也大多采用胰酶消化法和差速贴壁的方法来获得高纯度的支持细胞。采克俊等

(2008)在分离鸡睾丸支持细胞时,首先用 10 倍于组织块体积的 1 mg/ml 胶原酶消化,在 37℃作用 30 min,期间每隔 5 min 混匀 1 次,之后用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 5 min,300 目不锈钢网筛过滤,差速贴壁法去除大部分生殖细胞,支持细胞得到纯化。Syed 等(2001)采用 20 mmol/L Tris-HCl 对培养中的支持细胞进行低渗处理,可有效去除生殖细胞,而不会影响支持细胞的生长。采克俊等(2008)发现,鸡睾丸支持细胞和生殖细胞贴壁都较快,贴壁的时间差较小,要经低渗处理去除生殖细胞,才能获得较纯的支持细胞。

本研究所用方法与已报道的动物支持细胞分离、纯化方法有所不同。在本研究中,并未进行低渗处理,直接使用 0.25%胰蛋白酶消化尼罗罗非鱼精巢组织,分离的细胞可以达到 90%的存活率。将分离得到的细胞接种后,用倒置显微镜观察发现,支持细胞的游离期一般为 12~24 h,24 h 后部分支持细胞贴壁,胞质开始铺展、伸出突起。本研究在纯化支持细胞的过程中,当支持细胞贴壁有小部分胞质开始铺展、少量支持细胞伸出突起时,即用移液枪吸取培养液轻轻敲打培养瓶瓶壁,然后吸去瓶内含有的生殖细胞的培养液,PBS 清洗 2 遍后,换新鲜培养液,基本上无生殖细胞,从而使支持细胞得到纯化。本研究并未进行低渗处理,而是通过缩短贴壁时间和吹洗支持细胞的方法,这样操作虽然会使获得的支持细胞总数减少,但会降低低渗方法对细胞造成的伤害,并且同样保证了支持细胞的纯度。结果显示,这种方法对尼罗罗非鱼支持细胞的纯化简单有效,获得了 90%纯度的支持细胞。

3.2 支持细胞的鉴定

支持细胞的鉴定,一般有细胞形态学鉴定、细胞染色鉴定等方法(Ghaem Maghami *et al*, 2018; 胡晓鹏等, 2015; 于磊等, 2013)。支持细胞体外培养特性表现为贴壁生长的多边形上皮样细胞,本研究分离培养的细胞形态也主要是贴壁的多角形上皮样细胞,与已报道的其他物种的支持细胞形态一致。张学明等(2001)采用油红 O 染色法,镜检发现,支持细胞的细胞质中,在细胞两极有许多被染成红色或红褐色大小不一的圆形小泡,结果证实为 HE 染色中所观察到的空泡,其实质是支持细胞胞质中的微小脂滴。本研究中,培养细胞甲基绿染色后,可以明显看到支持细胞的细胞核着色,而许多胞质中未染色的空泡样结构,为支持细胞胞质中的脂滴。本研究根据前人对支持细胞形态学特征的研究报道,结合细胞染色,观察了尼罗罗非鱼支持细胞的一般形态特征,对其作了初步鉴定。差速贴壁法分离纯化的贴壁支持细胞纯度较高,但其中

依然会有生殖细胞混杂,而 AKP 活性染色是检测生殖细胞的一个重要指标。利用 AKP 染色可以检测在培养的支持细胞中是否有生殖细胞混杂。染色结果发现,大部分细胞不着色,为 AKP 阴性,只有少数不规则组织样的细胞团被染上黑色,为 AKP 阳性,未见生殖细胞,表明本研究所使用的纯化方法效果较好;而根据国内外的 AKP 鉴定结果发现,管周细胞能被 AKP 染色标记上,为 AKP 阳性,支持细胞不能被标记,为 AKP 阴性(Chapin *et al*, 1987),证明本研究采用的分离、纯化支持细胞的方法是有效的,获得了高纯度的支持细胞。

3.3 基础培养基的影响

基础培养液有 MEM、DMEM、F-12、M199 和 L-15 等(Sakai, 2002; 上官芳芳等, 2003)。周元陵等(2005)培养睾丸支持细胞采用的培养液是 DMEM/F-12,其中添加维生素 A 和维生素 E、胰岛素、卵泡刺激素、睾酮和抗生素等。Matsui 等(1991)用高糖 DMEM 作为基础培养液培养支持细胞,取得较为理想的结果。在以上的研究中,体外培养细胞都是生长在 5% CO₂ 的环境中。而鱼类体外细胞培养有些是在 5% CO₂ 的环境中培养,也有在大气环境中培养。因此,对于不同动物的不同细胞,应根据培养环境和需要,选择不同的基础培养液。

HEPES 作为缓冲剂可用来代替碳酸氢盐,以解除需要高浓度 CO₂ 培养环境的限制。本研究采用 HEPES 作为缓冲剂,保持培养液 pH 值稳定在 7.0~7.2 范围内,在大气环境中培养支持细胞。实验发现,即使用 HEPES 作为缓冲剂,M199 与 F12 培养液 pH 值变化也较大,长时间培养细胞,培养液 pH 值显著升高,而支持细胞在 pH 值较高的环境下,贴壁困难,不利于细胞的生长。Leiboviz's L-15 培养液可用来在大气环境中使神经细胞生长,该培养基采用了与众不同的 BSS 作基础,含有高浓度的氨基酸来提高缓冲能力,培养基中使用半乳糖作碳源,以阻止培养液中乳酸形成,少量溶解的 CO₂ 由丙酮酸代谢产生。L-15 培养基的优点明显,特别是在保持较高 CO₂ 浓度时,因此在大气环境下培养支持细胞,L-15 有其不可替代的优点。Sakai(2002)用 L-15 基础培养液在大气环境中成功培养了斑马鱼(*Danio rerio*)精原干细胞及支持细胞。研究表明,与 F12 和 M199 相比,用 L-15 基础培养液培养尼罗罗非鱼支持细胞,细胞贴壁良好,生长迅速,更有助于尼罗罗非鱼支持细胞的生长增殖,证实在大气环境中,L-15 培养液较适合培养支持细胞。

3.4 血清对支持细胞生长增殖的影响

支持细胞体外培养的研究中,常添加10%~15%的胎牛血清或10%~15%犊牛血清(NBS)作为对基础培养基的补充。在本研究中,分别用添加5%、10%和15% NBS的培养液培养尼罗罗非鱼支持细胞,探讨了NBS对尼罗罗非鱼支持细胞生长增殖的影响。并在添加10% NBS基础上再添加1%罗非鱼血清,探讨了罗非鱼血清对支持细胞生长增殖的影响。结果发现,15% NBS使支持细胞不易贴壁,但贴壁的细胞生长特性无明显变化;与添加5%和15% NBS相比,10% NBS极显著促进尼罗罗非鱼支持细胞生长增殖的影响($P<0.01$)。与对照组相比,在添加10% NBS基础上再添加1%罗非鱼血清能显著促进支持细胞的生长增殖($P<0.05$)。

参 考 文 献

- Cai KJ, Liu L, Ding HL, *et al.* Isolation, purification and characterization of sertoli cells from embryonic chickens. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2008, 30(6): 791–797 [采克俊, 刘莉, 丁海雷, 等. 鸡胚睾丸支持细胞的分离、纯化与鉴定. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(6): 791–797]
- Chapin RE, Phelps JL, Miller BE, *et al.* Alkaline phosphatase histochemistry discriminates peritubular cells in primary rat testicular cell culture. *Journal of Andrology*, 1987, 8(3): 155–161
- Dang GC, Liu YQ, Fu PS, *et al.* Effect of high temperature treatment on sex differentiation and growth in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(5): 32–37 [党广成, 刘羽清, 付佩胜, 等. 高温诱导对尼罗罗非鱼性别分化及生长的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(5): 32–37]
- Edelstein NY, Racine C, di Clemente N, *et al.* Androgens downregulate anti-Müllerian hormone promoter activity in the Sertoli cell through the androgen receptor and intact steroidogenic factor 1 sites. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(6): 1303–1312
- Ghaem Maghami R, Mirzapour T, Bayrami A. Differentiation of mesenchymal stem cells to germ-like cells under induction of Sertoli cell-conditioned medium and retinoic acid. *Andrologia*, 2018, 50(3): e12887
- Hu XP, Yang F, Lv ZX, *et al.* Investigations on the expression of protein markers in Sertoli cells. *Reproduction and Contraception*, 2015, 35(8): 509–516, 524 [胡晓鹏, 杨凡, 吕忠显. 小鼠睾丸支持细胞标志蛋白表达的研究. *生殖与避孕*, 2015, 35(8): 509–516, 524]
- Jiang J, Zhang N, Shiba H, *et al.* Spermatogenesis associated 4 promotes Sertoli cell proliferation modulated negatively by regulatory factor X1. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75933
- Koji T, Hishikawa Y, Ando H, *et al.* Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: Involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(3): 946–954
- Luca G, Baroni T, Arato I, *et al.* Role of Sertoli cell proteins in immunomodulation. *Protein and Peptide Letters*, 2018, 25(5): 440–445
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, *et al.* Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 1991, 353(6346): 750–752
- Regueira M, Riera MF, Galardo MN, *et al.* Activation of PPAR α and PPAR β/δ regulates Sertoli cell metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 382(1): 271–281
- Sakai N. Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development*, 2002, 129(14): 3359–3365
- Shangguan FF, Shi XL. The promotive effect of Sertoli cell on neurons *in vitro*. *Acta Anatomica Sinica*, 2003, 34(5): 510–513 [上官芳芳, 史小林. 睾丸支持细胞促进体外培养神经元生长的研究. *解剖学报*, 2003, 34(5): 510–513]
- Syed V, Hecht NB. Selective loss of Sertoli cell and germ cell function leads to a disruption in Sertoli cell-germ cell communication during aging in the brown Norway rat. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(1): 107–112
- Teng Y, Xue WJ, Feng XS, *et al.* The isolation and culture of Sertoli cells from adult testis and their immune privilege mechanism. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2005, 21(5): 643–645, 649 [滕琰, 薛武军, 冯新顺, 等. 成人睾丸支持细胞的分离培养及其免疫豁免机制. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 643–645, 649]
- Willing AE, Othberg AI, Saporta S, *et al.* Sertoli cells enhance the survival of co-transplanted dopamine neurons. *Brain Research*, 1999, 822(1–2): 246–250
- Yu L, Zheng P, Rong EG, *et al.* Culture and identification of testis Sertoli cells in calf *in vitro*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2013, 35(1): 63–66 [于磊, 郑鹏, 荣恩光, 等. 新生牛睾丸支持细胞的体外培养及鉴定分析. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(1): 63–66]
- Zhang XM, Li ZY, Lai LX, *et al.* Effects of several factors on mouse spermatogonial stem cells cultured *in vitro*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2001, 21(5): 497–500 [张学明, 李子义, 赖良学, 等. 几种因素对培养小鼠精原干细胞的影响. *中国兽医学报*, 2001, 21(5): 497–500]
- Zhao LH, Jia JH, Zhang YH, *et al.* The tolerance and growth of three strains of *Oreochromis niloticus* in salinity-alkalinity water. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 26–32 [赵丽慧, 笪金华, 张艳红, 等. 3种品系尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 盐碱耐受性和生长比较. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 26–32]
- Zhou YL, Zhong XJ, Wu X, *et al.* Establishment of dual-chamber model for rat Sertoli cells primary culture. *Journal of*

Environmental and Occupational Medicine, 2005, 22(3): 208–211 [周元陵, 钟先玖, 吴鑫, 等. 原代睾丸支持细胞

分离纯化及双室培养模型的建立. 环境与职业医学, 2005, 22(3): 208–211]

(编辑 马璀璨)

Establishment and Optimization of an Isolation and Culture System for Sertoli Cells of Nile Tilapia

KANG Kai, WU Jiang, YUAN Linyong, LIU Lihuan, CHEN Yongling, XIAO Mei, AN Lilong^①

(Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract The aim of this study to establish and optimize an isolation and culture system for Sertoli cells of Nile tilapia. Fresh testis tissues from Nile tilapia in development stage III were obtained and then rinsed with phosphate-buffered saline. The tissue was dissected into segments and digested with 0.5 mg/ml collagen for 30 min, followed by 0.25% trypsin–0.04% EDTA for 5 min, and the digestion was terminated with L-15 culture medium with 10% newborn bovine serum (NBS). Sertoli cells were selected using the characteristic that they adhered more quickly than germ cells to the culture vessels. Sertoli cells were cultured in 96-well plates in L-15, M199, or F12 culture medium, supplemented with 10% NBS, or L-15 culture medium supplemented with 5%, 10%, and 15% NBS, or L-15 culture medium supplemented with 10% NBS and 1% Nile tilapia serum. For each treatment group, Sertoli cells were collected from six culture wells every 2 days; the number of cells in each well was counted using a hemocytometer, and a growth curve was drawn for the Sertoli cells. Compared with F12 or M199 culture medium, more rapid growth of Sertoli cells occurred in the L-15 culture medium ($P<0.01$). Compared with supplementation with 5% or 15% NBS, the proliferation of Sertoli cells was accelerated ($P<0.05$) by supplementation with 10% NBS in the culture medium. Comparatively, the effect of the addition of 1% Nile tilapia serum was greater ($P<0.05$) than the absence of serum. The proliferation of Nile tilapia Sertoli cells can be improved by supplementation with 10% NBS and 1% Nile tilapia serum in L-15 cell culture medium.

Key words Nile tilapia; Sertoli cell; Isolated culture; System optimization

① Corresponding author: AN Lilong, E-mail: anlilong@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181229001

http://www.yykxjz.cn/

孙金秋, 徐莞媛, 马杭柯, 高威, 欧阳乐飞, 高焕, 阎斌伦. 脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及其表达特征分析. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 127-134

Sun JQ, Xu WY, Ma HK, Gao W, Ouyang LF, Gao H, Yan BL. Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 127-134

脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆 及其表达特征分析*



孙金秋¹ 徐莞媛¹ 马杭柯¹ 高威¹
欧阳乐飞¹ 高焕^{1,2,3,4} 阎斌伦^{1,2,3,4}①

- (1. 江苏省海洋大学 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台 南京 210014;
4. 江苏省海洋资源开发研究院(连云港) 连云港 222005)

摘要 本研究根据脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)转录组序列,采用cDNA末端快速扩增技术克隆获得了脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因(SHMT)。该基因cDNA全长为1855 bp,其中,开放阅读框为1407 bp,5'端非编码区为39 bp,3'端非编码区为409 bp,共编码468个氨基酸,预测蛋白质的分子质量为152.55 kDa,理论等电点为4.90。同源性分析显示,脊尾白虾SHMT基因与甲壳类动物真宽水蚤(*Eurytemora affinis*)同源性最高,为96%。荧光定量分析结果显示,SHMT基因在脊尾白虾眼柄、胃、肝胰腺、心脏、鳃、肠、肌肉、腹索神经、皮下脂肪以及卵巢中均有表达,其中,卵巢表达量最高,心脏次之。不同浓度Cd²⁺胁迫结果显示,其在低浓度(0.0100、0.0175和0.021 mmol/L)Cd²⁺胁迫中的表达模式基本一致,呈先升高后下降再升高再下降的趋势;而在高浓度(0.0278 mmol/L)Cd²⁺胁迫中,该基因表达量很低,甚至不表达,说明高浓度Cd²⁺胁迫可以抑制该基因的表达,具体机制有待进一步研究。

关键词 脊尾白虾; 丝氨酸羟甲基转移酶基因; 基因克隆; 组织表达; Cd²⁺胁迫

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0127-08

丝氨酸羟甲基转移酶(Serine hydroxyl methyltransferase, SHMT)是一类广泛存在于原核生物和真核生物中含有磷酸吡哆醛(PLP)四聚体的蛋白质(Schirch *et al*, 2005),其主要功能是在亚甲基四氢叶酸存在时,催化甘氨酸-丝氨酸相互转化为许多生物

合成反应提供一碳单元,一碳单位代谢是所有生物尤其是植物体内重要的初级代谢反应,将氨基酸代谢与核苷酸及一些重要物质的生物合成关联起来(Bauwe *et al*, 2003),线粒体为单碳供体如丝氨酸、甘氨酸、肌氨酸和二甲基甘氨酸提供氧化的场所(Tibbetts *et al*,

* 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(17KJA240001)、江苏省“六大人才高峰”创新人才团队项目(2016-HYGC-CXTD-004)和淮海工学院研究生创新项目(XKYCXX2017-21)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions of China (17KJA240001), “Six Talent Summit” Innovative Talent Team of Jiangsu (2016-HYGC-CXTD-004), and Huaihai Institute of Technology Graduate Innovation Project (XKYCXX2017-21)].
孙金秋, E-mail: 1171840685@qq.com

① 通讯作者: 阎斌伦, 教授, E-mail: yanbinlun1962@163.com

收稿日期: 2018-12-29, 收修改稿日期: 2019-01-22

2010)。目前,关于 SHMT 的研究在微生物、植物和动物中均有报道(McClung *et al*, 2000; Garrow *et al*, 1993; Bauwe *et al*, 2003; 林颖辉等, 2018)。仅在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中就发现 SHMT 基因的 7 种亚型: SHMT1、SHMT2、SHMT3、SHMT4、SHMT5、SHMT6 和 SHMT7, 其中, SHMT1 和 SHMT2 被认为可能为线粒体型, SHMT3 为胞质型, 但胞浆型(SHMT4 和 SHMT5)和细胞核(SHMT6 和 SHMT7)中的定位仍有待证实(Wei *et al*, 2013; McClung *et al*, 2000)。

关于 SHMT 酶活性质和性能等方面的研究多集中在微生物领域(冯炎, 2002; 孔庆胜等, 2010)。在细胞生理学上, SHMT 是叶酸代谢过程中的关键酶之一, 参与 DNA、RNA 合成、甲基供体及甲硫氨酸和辅酶等多种终端产物的合成。SHMT 也能够催化 5,10-亚甲基四氢叶酸水解生成 5-甲基四氢叶酸。5-甲基四氢叶酸的合成过程被认为是一碳单元和还原性叶酸在细胞中短暂保存的形式。SHMT 基因在植物中的研究多与生长、抗逆和抗病虫害有关(Weinstock, 1970; 朱晓岚, 2017; 孙洁等, 2016; Sonnewald, 2008)。除此在外, SHMT 还可通过影响机体的异常甲基化而引起致癌基因的激活和抑癌基因的失活, 促进肿瘤的发生, 因此, 其在人类中的研究多与肿瘤有关(王益民等, 2006)。已有研究证实, 在癌细胞增殖过程中, 线粒体型 SHMT2 的表达显著升高, 胞质型 SHMT1 的表达没有明显变化(Deberardinis, 2011; Koppenol *et al*, 2011)。但该基因在甲壳生物中还未见报道, 其生物学功能尚不清楚。在前期获得的不同饥饿胁迫条件下的脊尾白虾转录组序列中发现了该基因, 本研究旨在通过克隆该基因并进一步阐释其在脊尾白虾中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用脊尾白虾取自实验室同一个母本繁育而来的家系成体, 选取正常条件下体格健壮、大小均匀的脊尾白虾 3 只, 分别取其眼柄、胃、肝胰腺、心脏、鳃、肠、肌肉、腹索神经、皮下脂肪以及卵巢 10 个组织用于 RNA 的提取。

1.2 Cd²⁺胁迫条件的设置

根据预实验结果, 采用单因子实验设计的方法, 设置对照组和 4 个不同浓度梯度的实验组: 实验组 1 (0.0100 mmol/L)、实验组 2 (0.0175 mmol/L)、实验组 3 (0.0210 mmol/L)和实验组 4 (0.0278 mmol/L), 各梯度

以 1 mol/L 的 CdCl₂ 原液进行调配。胁迫实验在室内独立养殖箱(长×高×宽为 80 cm×60 cm×60 cm)中进行, 实验前在该环境(室温 20~25℃, 盐度 25)下暂养 7 d, 期间每天换水 1 次, 早晚投喂饵料及吸污各 1 次。实验时, 每组选择大小均匀、健壮的脊尾白虾 70 尾, 期间为避免水环境中 Cd²⁺ 浓度变化幅度较大, 采取不投饵、不换水的方式。胁迫实验共进行 96 h, 分别在 0、3、6、12、24、48、72 和 96 h 共 8 个时间点取样, 每组每次共取 3 个平行样品。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

1.3.1 总 RNA 的提取 用滤纸吸干脊尾白虾表面的海水后, 分别选取脊尾白虾各组织样品用于 RNA 的提取。RNA 提取采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)], 为防止 RNA 污染以及降解, 提取过程需全程佩戴口罩, 勤换手套, 并采用 RNase Free 的实验器材。1% 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性, 微量分光光度计 UV-Vis 测定 RNA 纯度, RNA 于 -80℃ 保存。

1.3.2 cDNA 第一链的合成 以脊尾白虾各组织混合 RNA 为模板, 一部分直接反转录为 cDNA, 合成试剂盒选用 PrimerScriptTM RT Master Mix(TaKaRa)。另一部分利用 SMARTTM RACE cDNA amplification 试剂盒(TaKaR), 分别合成 5' 和 3' RACE-ready cDNA, 余下 RNA 于 -80℃ 保存。

1.4 引物及其序列

实验所用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 序列见表 1。

1.5 脊尾白虾 SHMT 基因的克隆

1.5.1 脊尾白虾 SHMT 基因 cDNA 核心片段的克隆

以脊尾白虾转录组序列为模板, 设计 SHMT 核心序列引物(表 1)。以脊尾白虾各组织混合 cDNA 为模板, PCR 扩增 SHMT 核心片段, 克隆产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶验证。切胶纯化回收目的产物, 胶回收试剂盒选自生工生物工程(上海)有限公司。回收纯化后产物经克隆转化后送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.5.2 脊尾白虾 SHMT 基因 cDNA 5' 和 3' 末端的快速扩增 根据获得的脊尾白虾 SHMT 基因的核心片段, 设计特异性引物 IS-DNMT-GSP-1-1 用于 5' 端的快速扩增, IS-DNMT-GSP2-1、IS-DNMT-GSP-2-2 和 IS-DNMT-GSP2-5 用于 3' 端的快速扩增(表 1)。25 μl 反应体系, PCR 反应程序按照 TaKaRa RACE 扩增试剂盒中的要求进行。反应完成后, 1.5% 琼脂糖凝胶电

表 1 实验所用引物
Tab.1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
IS-DNMT-F4	GCCACCTGACCCACGGCTTCTA	核心片段扩增
IS-DNMT-R4	TGATGACCTGCTGCTGATACTCC	Amplification of core fragment
IS-DNMT-GSP-1-1	AGCGTCTTGTGCGTCGTGGTGG	5'RACE
IS-DNMT-GSP2-1	AGCCAAGGATGATCATCGCAGGCG	
IS-DNMT-GSP-2-2	CCACCACGACGCACAAGACGCT	3'RACE
IS-DNMT-GSP2-5	AGGGAGGGCCGCACAACCATCAGAT	
IS-DNMT-296-514-F1	GGAATGGTTCGGTCAGAGGTATTAC	
IS-DNMT-296-514-R1	GTGGCCGCCGTCGGGGAG	
IS-DNMT-405-695-F2	TTAACGTGCAGCCTTATTCCG	
IS-DNMT-405-695-R2	GATGGCGGGGGTAACAGC	
IS-DNMT-686-893-F3	CCCCGCCATCTGGACTACGC	
IS-DNMT-686-893-R3	CCTTCTGACCTCTCCTGTAA	
IS-DNMT-836-1174-F4	CACAAGACGCTGAGGGGA	
IS-DNMT-836-1174-R4	GGAGAGACCGACAGATTTC	内含子验证
IS-DNMT-1048-1285-F5	TCAGCAGCAGGTCATCAA	Intron verification
IS-DNMT-1048-1285-R5	CGGTGTGCCTAGTCGAAT	
IS-DNMT-1138-1438-F6	CCTGGTCTGGGTCAACAT	
IS-DNMT-1138-1438-R6	CGTCTCAAACCTCCTCTTC	
IS-DNMT-1420-1667-F7	GGAAGAGGAGTTTGAGA	
IS-DNMT-1420-1667-R7	TGGACGGTTTATTTGTG	
IS-214-368-F1	AACAAGTACTCGGAGGGAATGG	qRT-PCR
IS-214-368-R1	GGAGAGCCGGAATAAGGCTG	
EC-18S-Q-F1	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	内参基因扩增
EC-18S-Q-R1	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	Amplification of internal reference gene

泳验证, 切取目的条带并回收, 克隆测序, 方法同上。测序结果在 DNAMAN v6 软件完成拼接, 拼接序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对, 获得完整的 cDNA 序列。

1.5.3 脊尾白虾 *SHMT* 基因 DNA 全序列的克隆

根据已获得的脊尾白虾 *SHMT* 基因 cDNA 序列设计覆盖全序列的 5 对内含子验证引物, 分别以脊尾白虾 cDNA、DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物以 1% 凝胶电泳验证不同 DNA 模板中同一引物扩增产物条带大小是否一致, 以此来判定 DNA 序列中是否存在内含子。

1.6 脊尾白虾 *SHMT* 基因的生物信息学分析

基因的生物信息学分析主要通过以下程序或软件进行: 利用 NCBI 对所获得基因序列进行检测和氨基酸序列比对; 利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件进行 *SHMT* 基因的开放阅读框预测以及其所编码氨基酸序列的分析; 利用在线软件 ExPASy Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>)

进行蛋白质理化性质分析; 利用 Compute pI/Mw 软件 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 进行理论等电点和分子量的计算; 利用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/index2.cgi>) 进行信号肽预测及蛋白结构域的预测分析; 通过在线软件 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 *SHMT* 基因进行亚细胞定位; 用 MEGA6.0 软件进行氨基酸序列的多重比对及 NJ 系统进化树的构建。

1.7 脊尾白虾 *SHMT* 基因组织表达水平分析

根据已获得的脊尾白虾 *SHMT* 基因 cDNA 全序列设计荧光定量引物, 并以脊尾白虾 18S rRNA 作为内参基因(表 1)进行组织表达分析(薛蓓等, 2017)。

qRT-PCR 分析所用试剂选自 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa), 每个反应设 3 个平行样, 反应体系 20 μ l: 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ l, dd H₂O 4 μ l, cDNA 模板 4 μ l, Rox Reference Dye I (50 \times) 0.4 μ l, 正反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ l, 反应程序按照试剂盒要求进行, qRT-PCR 扩增在 Step One Plus

仪器上进行。

1.8 数据分析

实验最终各定量结果采用 SPSS 18.0 和 Excel 软件进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示极显著差异。

2 结果

2.1 脊尾白虾 *SHMT* 基因序列全长及分析

脊尾白虾 *SHMT* cDNA 全长为 1855 bp (GenBank 登录号: MH013225), 开放阅读框为 1407 bp, 5'非编码区为 39 bp, 3'非编码区为 409 bp, 共编码 468 个氨基酸, 预测蛋白质的分子质量为 152.55 kDa, 理论等电点为 4.90。7 对内含子验证引物在脊尾白虾 cDNA 和 DNA 中的扩增结果一致, 表明该基因不含内含子。应用 SignalIP 软件对 *SHMT* 预测蛋白信号肽分析, 显示该蛋白不含信号肽序列。亚细胞定位软件

Cell-PLoc 2.0 预测脊尾白虾 *SHMT* 定位于线粒体中。

2.2 脊尾白虾 *SHMT* 基因同源性分析

为了解脊尾白虾 *SHMT* 基因与其他物种的同源性关系, 从 NCBI 的 GenBank 数据库中选取 15 条不同物种的 *SHMT* 氨基酸序列, 使用 MEGA 6.0 软件 (Neighbor-Joining 法)对脊尾白虾 *SHMT* 进行聚类分析, 构建进化树。如图 2 所示, 脊尾白虾 *SHMT* 与甲壳类动物真宽水蚤(*Eurytemora affinis*)聚为一类, 且同源性较高, 之后与昆虫类聚为一类。脊椎动物中智人(*Homo sapiens*)和猩猩(*Pongo abelii*)聚为一类, 随后与小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)聚为一类。最后, 牛的 *SHMT2* 和植物类、原生动植物单独聚为一类。该聚类结果符合传统分类学结果。

2.3 脊尾白虾 *SHMT* 的组织表达特征分析

为了解 *SHMT* 在脊尾白虾不同组织间的表达特征, 利用荧光定量 PCR 技术对脊尾白虾 10 个组织中 *SHMT* mRNA 水平进行检测。结果显示(图 3), *SHMT*

```

1  CAGAGTCGTAGTGTGAGTGTGACCTCCCGCTGGTAAAAATGATGAACGGAGACGCAAAATTATCCTCTGCGAGACCTCTCTCCCAAGATGACCC
1  M M N G D A N Y P L R D P L S Q D D P
97  GAGGTGTACGCCATCATCCGAGGAGAAGGACAGGCGAGTTCGAGGTCTGGAGATGATCGCCTCGGAGAACTACACGTCGCCGCGCGTCAACGAC
20  E V Y A I I R R E K D R Q F R G L E M I A S E N Y T S R A V N D
193  TGCCTCTCGTGCCTCACCAACAAGTACTCGGAGGAATGGTCGGTCAGAGGTATTACGGAGGCAACGAACACATCGAGAGATAGAGACCTC
52  C L S S C L T N K Y S E G M V G Q R Y Y G G N E H I D E I E T L
289  TGCAAGGAGCGTTGCTAAAAAGCCTTCGGACTGGACCCCGAGAAGTGGGGCGTTAACGTGCAGCCTTATTCGGCTCTCCGGCCAACTTCGTGTC
84  C K E R C L K A F G L D P E K W G V N V Q P Y S G S P A N F A V
385  TACACGGCGTGGTGAACACATGGACGTATCATGGGTCTGGACCTCCCGACGGCGCCACCTGACCCACGGCTTACACGGCCACGAAGAAG
116  Y T A L V E P H G R I M G L D L P D G H L T H G F Y I D E I E T L
481  GTCTCGGCCAGTCCATCTTCTCGAGTCGATGCCTTACAAGTCAACCTGTCGACCGAGCTCATAGATTATGACCAGCTTCAGGACAACGCTTGC
148  V S A T S I F F E S M P Y K I N L S T E L I D Y D Q L Q D N A C
577  TTGTTCAAGCCAAGGATGATCATCGCAGGCGTCACTGTTACCCCGCCATCTGGACTACGCCGCTTCGGCAGATCTGGCAGCAGAGAAGCGCTCC
180  L F K P R M I I A G V S C Y P R H L D Y A R F R Q I C D E N G S
673  CTGCTCATGGCGGACATGTCCAGCTCAGCGGCTGGTGGCCACGGGCTGACCAGCAACCCGTTTGAGCACTGCGAGCTGCTACCACCCAGCAG
212  L L M A D M S H V S G L V A T G L T S N P F E H C D V V T T T T
769  CACAAGACGCTGAGGGACCTCGGAGTGGCTCATATTTACAGGAGGTCAGAGGGAGTCGACAAGACCGGACATCATGTACGATTAC
244  H K T L R G P R S G V I F Y R R G Q K G V D K T G Q P I M Y D Y
865  GAGGACAAGTCAACAGGCGCTTCCCGGCTCCAGGAGGGCCGACAAACCATCAGATCGCTGGGGTGGCCGTGGCCATCGGCAAGCGGCC
276  E D K C I N Q A V F P G L Q G G P H N H Q I A G V A V A M R G Q A A
961  GATCCTCTTCAAGGAGTATCAGCAGCAGGTCATCAAAAACGCCAGCCCGCTTCCAGCGGCTCAAGGAAGCCGCTACAGGATCGTACGGGA
308  D P S F K E Y Q Q Q V I K N A Q A L A S G L K E A G Y R I V T G
1057  GGTACCGACAACACCTGGTCTGGTCAACATGAAATCTGTGGTCTCTCCGAGGCAAGGCCGAGAAGATCTTGAAGAGCTTTCGATCGCCTGC
340  G T D N H L V W V N M K S V G L S G G K A E K I L E D V S I A C
1153  AACAAAAACACAGTCTCGGCACAAGTCCGCCCTGAACCCCTAGTGGCATTGCACTAGGCACACCGGCCCTGACCACCGAAGCATGAAGGAGAAC
372  N K N T V P G D K S A L N P S G I R L G T P A L T T R N M K E N
1249  GATATTGACCGCGTCTTAAGTTTATCGATGAAGCGTTCAAGATCGCCATCGAGTACAGACCAAGTCCGGTCCCAAACCTGGTCCGATTTCAAGAAG
404  D I A A V V K F I D E A F K I A I D V Q T K S G P K L V D F K K
1345  GTGCTAAGGAAGAGGAGTTTGAAGCGGAGTCTCCCTCAGAACAGGTGAGGCCTTCGCCAGGAAGTTCCAAATCCCGGACTGGACGAG
436  V L K E E E F E T R V V S L R N Q V E A F A R K F P I P G L D E
1441  CTCTGAGGAACGAGCTGCTGTTACGCTAGTCTAACGGCTCCATCAGCAATGCGTTATTCTAGAGTGCCATATTTTACGAGGAAGCTTATCT
468  L *
1537  TACTATATAGGAATTAATAATGGTTCTGCATGTCTAAGGCCGTGACGCACAAATAAACCGTCCAAGAAACGAACAGAGTTGGAGACGTTGGCGG
1633  ATCAACAATAATTAGAGGCGCATTAACCCGCTCATATTTTCAACTTCGTAATCAAAATGTTTATTAGTATTGGGTAAGTGGCATATTATAAT
1729  ATTGCTCAATAGAAGATACGACATATTGCATGTATCGCAATTTAGTTTGGTAACGATTTACTTTTGTAACTTTGTAATCTGTCAAATATATTTATTATGAA
1825  TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 脊尾白虾 *SHMT* 基因的 DNA 全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence of *Exopalaemon carinicauda SHMT* gene and its deduced amino acid sequence

加粗部位为起始密码(ATG)和终止密码(TGA), 方框内为甘氨酸富集区域(GLQGGP), 下划线部位为加尾信号(AATAA)

The bold sections were the start codon (ATG) and the stop codon (TGA), the letters in box indicated conserved glycine rich region, and the underlined sections were the tailing signal (AATAA)

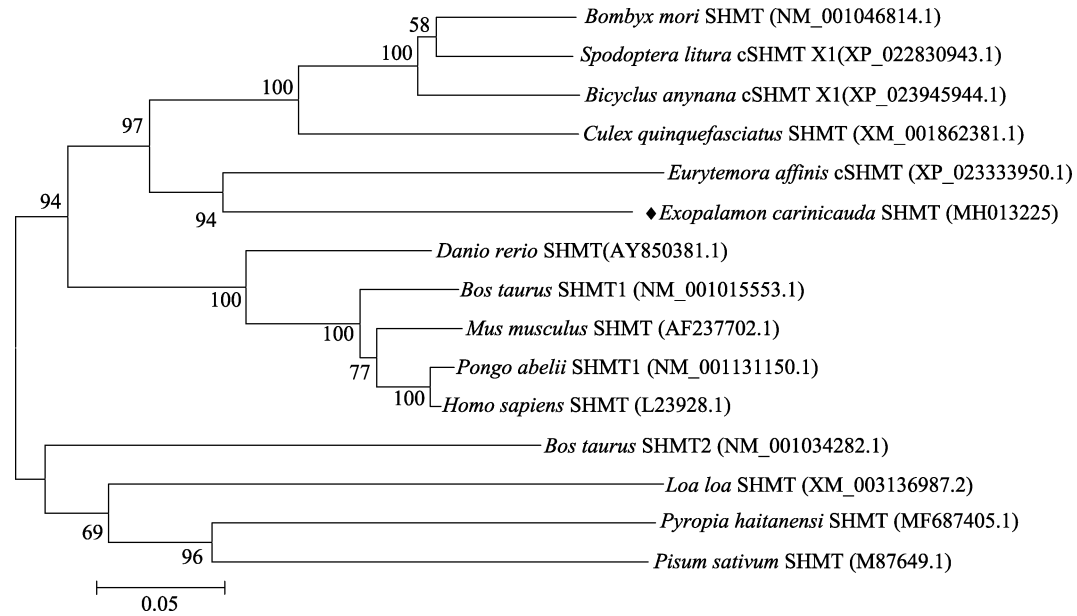


图 2 脊尾白虾 SHMT 系统进化树分析

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on SHMT amino acid sequences of *Exopalaemon carinicauda* and other species

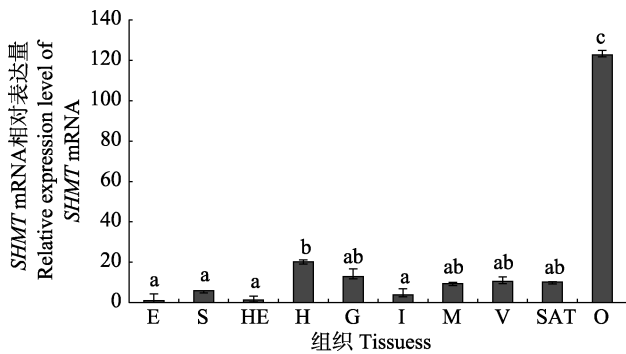


图 3 脊尾白虾 SHMT 在不同组织中的表达特征

Fig.3 Relative expression of SHMT in various tissues of *Exopalaemon carinicauda*

E: 眼柄; S: 胃; HE: 肝胰腺; H: 心脏; G: 鳃; I: 肠; M: 肌肉; V: 腹索神经; SAT: 皮下脂肪组织; O: 性腺
 不同字母表示不同组织 SHMT 的表达量差异显著 ($P < 0.05$)
 E: Eyestalk; S: Stomach; HE: Hepatopancreas; H: Heart; G: Gill; I: Intestines; M: Muscle; V: Ventricular nerve; SAT: Subcutaneous fat tissue; O: Ovary
 bar of each column with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$)

在 10 个组织中均有表达, 但不同组织间差异显著, 其中, 在卵巢中表达量最高, 显著高于其他各组织 ($P < 0.01$), 心脏次之。

2.4 不同浓度 Cd²⁺胁迫下脊尾白虾 SHMT 的表达特征

不同浓度的 Cd²⁺胁迫下, 脊尾白虾 SHMT 的 qRT-PCR 结果见图 4。脊尾白虾 SHMT 含量在对照组中显示出相对平稳的趋势, 实验组 1 (0.0100 mmol/L) 和实验组 2 (0.0175 mmol/L) 均表现出自 3 h 开始升高后下

降再升高的趋势, 不同的是, 实验组 1 (0.0100 mmol/L) 经下降后, 相对于对照组, 在 96 h 极显著升高 ($P < 0.01$), 实验组 2 (0.0175 mmol/L) 经下降后在 24 h 表现出相对于对照组极显著升高 ($P < 0.01$); 实验组 3 (0.0210 mmol/L) 在 6 h 开始有相对于对照组的极显著升高 ($P < 0.01$), 随后下降再升高; 实验组 4 (0.0278 mmol/L) 表现出相对于对照组的极显著降低 ($P < 0.01$), 几乎不表达。

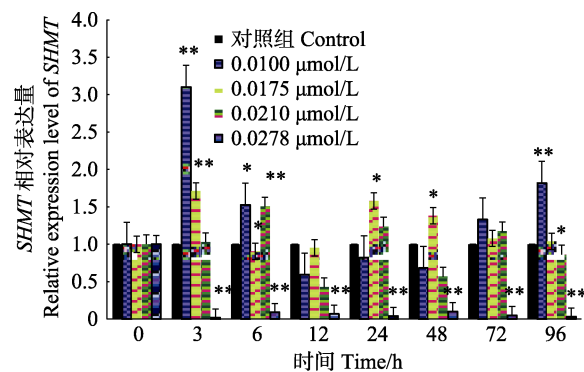


图 4 不同浓度 Cd²⁺胁迫下脊尾白虾体内 SHMT 基因的表达量随时间的变化

Fig.4 Expression of SHMT gene in *Exopalaemon carinicauda* after being exposed to different concentrations of cadmium

*表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),
 **表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)
 *and ** represent significant difference ($P < 0.05$) and highly significant difference ($P < 0.01$) between test and control, respectively

3 讨论

SHMT 通过将丝氨酸和四氢叶酸转化为甘氨酸和 N5,N10 亚甲基四氢叶酸, 为核苷酸、蛋白质和甲基的生物合成过程提供活化的一碳单元。研究表明, 丝氨酸羟甲基转移酶中均含有一个保守的甘氨酸富集区域 GLQGGP, 可能在与 5'-磷酸吡哆醛结合过程中发挥重要作用, 说明 *SHMT* 是以磷酸吡哆醛为辅酶进行反应的(Usha *et al.*, 1994)。进化树分析发现, 其与甲壳动物真宽水蚤胞质型 *SHMT* 聚为一类, 而亚细胞定位软件预测脊尾白虾 *SHMT* 定位于线粒体, 因此, 还需要进一步的研究进行验证。

在研究脊尾白虾 *SHMT* 组织表达特异性中发现, 其在卵巢中表达量极显著高于其他各组织, 该表达模式与 *SHMT* 在斑马鱼中的表达模式相似, 同时, 支持了 *SHMT* 可能是母系必需基因的观点(Chang *et al.*, 2007; Vatcher *et al.*, 1998)。除此之外, 有研究发现, *SHMT* 在家蚕(*Bombyx mori*)的脂肪体和表皮中表达量最高, 可能在丝素合成过程中有重要作用(李俊龙, 2014)。据此, 推测脊尾白虾卵巢中 *SHMT* 的高表达可能也与其发育有关。

重金属镉(Cd)是目前近海主要污染物之一, 在水中不易降解, 水生物通过食物链的富集可达到数千乃至万倍, 且不易排出体外(张瑞等, 2013; 洗健安等, 2012; van Hattum *et al.*, 1989)。脊尾白虾养殖和繁育近海海域区域受到重金属镉污染的问题越来越受到关注(李先超, 2011)。研究表明, 镉可对甲壳动物产生的不利影响是多方面的, 主要表现在体内主要抗氧化酶活、代谢酶活、细胞结构的损伤以及抑制卵巢发育(Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014; 李文艳等, 2008)。除此之外, 还会影响多种生物出现异常甲基化以及某些功能基因的表达(王子成等, 2009; 王丙莲等, 2006; Zhang *et al.*, 2015), 因此, 希望通过脊尾白虾体内 *SHMT* 在应对 Cd²⁺胁迫的表达特征, 来分析其可能具备的生物学功能。本研究发现, 在低浓度实验组(实验组 1、实验组 2 和实验组 3)中均表现出波动状态; 但在高浓度实验组(实验组 4), 其表达量明显下降, 这说明长时间低浓度 Cd²⁺的胁迫可能导致机体的适应, 这与李文艳等(2008)的研究结果一致。但高浓度的 Cd²⁺胁迫可能对机体损伤较大, 使其代谢机制出现异常, 直接表现为氨氮排泄量增加, 耗氧量(O/N)降低(Zhang *et al.*, 2014), *SHMT* 的表达相应受到抑制。其内在的作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Bauwe H, Kolukisaoglu U. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(387): 1523–1535
- Chang WN, Tsai JN, Chen BH, *et al.* Serine hydroxymethyltransferase isoforms are differentially inhibited by leucovorin: Characterization and comparison of recombinant zebrafish serine hydroxymethyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 2007, 35(11): 2127
- Deberardinis R. Serine metabolism: Some tumors take the road less traveled. *Cell Metabolism*, 2011, 14(3): 285–286
- Feng Y. Expression and cloning of the glyA gene encoding the serine hydroxymethyltransferase. Master's Thesis of Nanjing Tech University, 2002 [冯炎. 丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆与表达. 南京工业大学硕士研究生学位论文, 2002]
- Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, *et al.* Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(16): 11910
- Kong QS, Zhang XY, Han XL, *et al.* Molecular cloning and expression of a glyA gene from *Methylobacterium. sp* SDM11. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 141–144 [孔庆胜, 张向阳, 韩晓琳, 等. 甲醇利用菌 SDM11 中 glyA 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *生物技术通报*, 2010(5): 141–144]
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 325–337
- Li JL. Identification and enzymatic properties of Serine hydroxymethyltransferase from the silkworm, *Bombyx mori*. Master's Thesis of Southwest University, 2014 [李俊龙. 家蚕丝氨酸羟甲基转移酶 BmSHMT 的鉴定及酶活性质研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Li WY, Kang XJ, Mu SM, *et al.* Research advance of toxicological effects of cadmium on shrimps and crabs. *Fisheries Science*, 2008, 27(1): 47–50 [李文艳, 康现江, 穆淑梅, 等. 镉对虾蟹毒性效应的研究进展. *水产科学*, 2008, 27(1): 47–50]
- Li XC. The study on the current ecological environment situation and its developmental feather in off-shore area of Shandong Province (focus on Yellow Sea). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [李先超. 山东近岸海域(黄海部分)生态环境现状及演变特征研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- Lin YH, Wang WL, Xu Y, *et al.* Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Pyropia haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018,

- 39(5): 122–129 [林颖辉, 王文磊, 徐燕, 等. 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及表达特征. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 122–129]
- McClung CR, Hsu M, Painter JE, *et al.* Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiology*, 2000, 123(1): 381–392
- Schirch V, Szebenyi DM. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(5): 482–487
- Sonnenwald U. Serine hydroxymethyltransferase as target for herbicides. BASF Aktiengesellschaft, 2008
- Sun J, Pang SZ, Xuan WY, *et al.* Proteomics analysis of banana seedlings under drought stress. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(12): 2020–2026 [孙洁, 庞昇泽, 襍维言, 等. 干旱胁迫下香蕉幼苗蛋白质组学分析. 南方农业学报, 2016, 47(12): 2020–2026]
- Tibbetts AS, Appling DR. Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 2010, 30(1): 57–81
- Usha R, Savithri HS, Rao AN. The primary structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase and an analysis of the evolutionary relationships among serine hydroxymethyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1994, 1204(1): 75–83
- van Hattum B, de Voot P, van der Bosch L, *et al.* Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. *Environmental Pollution*, 1989, 62(2): 129–151
- Vatcher GP, Thacker CM, Kaletta T, *et al.* Serine hydroxymethyltransferase is maternally essential in *Caenorhabditis elegans*. *Biological Chemistry*, 1998, 273: 6066–6073
- Wang BL, Zhang YM, Tan YF, *et al.* Influence of cadmium and lead on the DNA methylation level of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Toxicology*, 2006, 20(2): 78–80 [王丙莲, 张迎梅, 谭玉凤, 等. 镉铅对泥鳅 DNA 甲基化水平的影响. 毒理学杂志, 2006, 20(2): 78–80]
- Wang YM, Guo W, Zhang XF, *et al.* Correlations between serine hydroxymethyltransferase1 C1420T polymorphisms and susceptibilities to esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. *Chinese Journal of Cancer*, 2006, 25(3): 281–286 [王益民, 郭炜, 张秀凤, 等. 丝氨酸羟甲基转移酶基因 C1420T 多态性与食管鳞癌、贲门腺癌易感性的关系. 癌症, 2006, 25(3): 281–286]
- Wang ZC, Ma HX, He YX. Effects of cadmium on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation. *Plant Physiology Communications*, 2009, 45(2): 115–118 [王子成, 马洪霞, 何艳霞. 重金属镉对拟南芥 DNA 甲基化的影响. 植物生理学报, 2009, 45(2): 115–118]
- Wei Z, Sun K, Sandoval FJ, *et al.* Folate polyglutamylation eliminates dependence of activity on enzyme concentration in mitochondrial serine hydroxymethyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 536(1): 87–96
- Weinstock J. The biochemistry of folic acid and related pteridines. *American Scientist*, 1970, 72(4): 431
- Wu JP, Chen HC. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*, 2004, 57(11): 1591–1598
- Xian JA, Wang AL, Miao YT, *et al.* Toxic effects of cadmium on haemocytes of *Litopenaeus vannamei* *in vitro*. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(1): 112–115 [洗健安, 王安利, 苗玉涛, 等. 镉对凡纳滨对虾离体血细胞的毒性影响. 水生生态学杂志, 2012, 33(1): 112–115]
- Xue B, Zhang P, Li ZH, *et al.* Cloning, expression and stability analysis of the reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1003–1012 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾 GAPDH 基因的克隆及其内参基因稳定性分析. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1003–1012]
- Zhang C, Li F, Xiang J. Acute effects of cadmium and copper on survival, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in juvenile *Exopalaemon carinicauda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104: 209–214
- Zhang JQ, Gui TS, Wang J, *et al.* The ferritin gene in ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*: Cloning, expression and function. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72: 320–325
- Zhang R, Zhang F, Liu FC, *et al.* History of heavy metal pollution from tidal flat in Haizhou Bay. *Environmental Science*, 2013, 34(3): 1044–1054 [张瑞, 张帆, 刘付程, 等. 海州湾潮滩重金属污染的历史记录. 环境科学, 2013, 34(3): 1044–1054]
- Zhu XL. Sequence diversity and functional analysis of SHMT gene of small black soybean cyst nematode. Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 [朱晓岚. 小黑豆抗胞囊线虫 SHMT 基因序列多样性及功能分析. 沈阳农业大学硕士研究生学位论文, 2017]

Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (*SHMT*) Genes from *Exopalaemon carinicauda*

SUN Jinqiu¹, XU Wanyuan¹, MA Hangke¹, GAO Wei¹,
OUYANG Lefei¹, GAO Huan^{1,2,3,4}, YAN Binlun^{1,2,3,4}①

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222005; 3. Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014; 4. Marine Resource Development institute of Jiangsu (Lianyungang), Lianyungang 222005)

Abstract In this study, based on the transcriptome of *Exopalaemon carinicauda* under hunger stress, *SHMT* genes were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) (GenBank accession No: MH013225). The full-length cDNA of the *SHMT* gene was 1855 nucleotides and contained an open reading frame (ORF) of 1407 bp, encoding a protein of 468 amino acid residues, with the predicted molecular weight of 152.55 kDa, and theoretical isoelectric point of 4.90. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that *E. carinicauda SHMT* gene is most homologous (96%) with that of *Eurytemora affinis*. The expression pattern of *SHMT* gene in different tissues was analyzed by qRT-PCR. The results showed that *SHMT* gene was expressed in all tissues of *E. carinicauda*. Transcript levels were high in the heart and ovary and were significantly higher in the ovary than in the other tissues. The results of different concentrations of Cd²⁺ stress showed that the expression patterns of lower cadmium stress were basically the same, showing a trend of alternately first increasing and then decreasing. Under high concentration of Cd²⁺ stress, the expression level was extremely low; and not even detected in these tissues. This suggests that high concentration of Cd²⁺ stress can inhibit the expression of the *SHMT* gene. The specific mechanism needs further study.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Serine hydroxyl methyltransferase; Gene cloning; Tissue expression; Cd²⁺ stress

① Corresponding author: YAN Binlun, E-mail: yanbinlun1962@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181104002

http://www.yykxjz.cn/

张艳楠, 王印庚, 刘福利, 廖梅杰, 李彬, 张正, 梁洲瑞, 于永翔, 荣小军. 养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 135-144

Zhang YN, Wang YG, Liu FL, Liao MJ, Li B, Zhang Z, Liang ZR, Yu YX, Rong XJ. Etiology of black-brown disease in cultured *Caulerpa lentillifera*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 135-144

养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究*



张艳楠^{1,2} 王印庚² 刘福利² 廖梅杰² 李彬²
张正² 梁洲瑞² 于永翔² 荣小军^{2①}

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

摘要 本研究从大连某养殖场发生黑褐病的长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*)分离得到 1 株优势菌株 CL2017070801002。采用该菌株浓度为 $10^3 \sim 10^8$ CFU/ml 的菌液浸泡感染长茎葡萄蕨藻, 在 7 d 内, 每个感染实验组的藻体都出现了不同程度的黑褐色典型发病症状, 人工感染实验结果表明, CL2017070801002 对长茎葡萄蕨藻有致病性。扫描电镜观察发现, 藻体细胞壁表面聚集大量细菌, 随着侵染时间加长, 细胞组织破裂死亡。研究表明, CL2017070801002 为本次发现的长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原。结合革兰氏染色、生理生化特征和 16S rDNA 序列进化树分析结果, 将该菌株鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。药敏实验结果显示, 该菌株对氯霉素、四环素、氟罗沙星、强力霉素和氟苯尼考等药物高度敏感, 对庆大霉素、克拉霉素等药物中度敏感, 对青霉素、头孢氨苄、头孢拉定等药物不敏感。本研究为长茎葡萄蕨藻的细菌性病害防治提供了有益参考。

关键词 长茎葡萄蕨藻; 黑褐病; 溶藻弧菌

中图分类号 S946.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0135-10

长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*), 又名凸镜状蕨藻, 属于绿藻门(Chlorophyta)、羽藻纲(Bryopsodophyceae)、羽藻目(Bryopsodales)、蕨藻科(Caulerpacae)、蕨藻属(*Caulerpa*)。长茎葡萄蕨藻的外观为浑圆饱满的绿色球状小枝, 犹如串串葡萄, 俗称“海葡萄”(郭辉, 2014)。长茎葡萄蕨藻主要分布于太平洋的热带和亚热带(30°N~30°S)的潮间带海区, 多生长在水流较缓的沙地或礁石区域(Titlyanov *et al*, 2012)。

长茎葡萄蕨藻具有极高的营养与保健价值: 富含人体所需的多种氨基酸与维生素(Saito *et al*, 2010), 蛋白质含量为 10.41%, 总脂肪含量为 1.6%~3.7%

(Matanjun *et al*, 2009), 还含有 ω -6 多不饱和脂肪酸(Niwano *et al*, 2009), 其食用口感类似鲑鱼卵, 却没有鱼腥味, 被誉为“绿色鱼子酱”。目前, 长茎葡萄蕨藻的市场售价约为 200~250 元/kg, 养殖及相关产品的加工利用利润较高(张颖等, 2016)。在日本、越南和菲律宾等国家, 长茎葡萄蕨藻的养殖技术较为成熟(梁洲瑞等, 2016)。近年来, 我国的福建、海南、辽宁和山东等地开启了该藻的养殖热潮。海南地区可整年进行长茎葡萄蕨藻的养殖, 福建沿海每年的长茎葡萄蕨藻养殖周期一般为 9~10 个月, 而辽宁和山东等北方海区一般可在 5~9 月时开展长茎葡萄蕨藻室

* 现代农业产业技术体系(CARS-50)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50)].
张艳楠, E-mail: 1519056881@qq.com

① 通讯作者: 荣小军, 研究员, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-11-04, 收修改稿日期: 2018-12-10

内养殖, 养殖周期较短。虽然北方海区养殖周期短, 但可以利用高温期时闲置的养殖车间, 从而提高车间使用率。如海参行业下滑, 大连沿海有大量闲置的海参育苗车间, 对这些闲置车间进行屋顶改造(改为可透光的), 开展长茎葡萄蕨藻等名贵藻类的室内养殖是一个可提高渔民收入的有效途径。随着我国长茎葡萄蕨藻养殖业的快速发展, 病害问题日益突出, 成为制约其健康可持续发展的重要因素之一, 如大连地区近 2 年进行的小规模长茎葡萄蕨藻养殖过程均受困于病害问题, 产量及质量均受到严重的影响, 导致该地区的长茎葡萄蕨藻养殖产业停滞不前。

目前, 国内外大部分学者对长茎葡萄蕨藻的研究集中在其生物学特性和人工养殖技术方面, 例如, 在解析适宜的水温、光强、营养盐浓度及盐度等环境因子对长茎葡萄蕨藻生长的影响, 确定长茎葡萄蕨藻养殖的适宜密度, 比较不同类型附着基的养殖效果等方面取得了一定的进展(黄建辉, 2012)。然而, 有关该藻的病害防治技术鲜有报道, 仅 Kudaka 等(2008)关于副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引起长茎葡萄蕨藻腐败变质的病例分析, 并提出了可以在藻类培养过程中通过紫外杀菌来预防该病的方法。

我国是海藻养殖第一大国, 但在藻类病害的研究方面相对薄弱, 关于藻类病原菌的微观形态描述和致病机理研究较少。

本文对大连某养殖场 2017 年 7 月暴发的一种长茎葡萄蕨藻病害(病症为藻体表面由翠绿色变成黑褐色)进行了较为系统的研究。从发病率高达 30%的长茎葡萄蕨藻发病藻体黑褐色病灶部位分离到一株优势菌, 采用柯赫氏法则(Evans, 1976)对该菌进行了鉴定, 并通过回接感染实验确定该菌为病原菌。同时, 对处于不同感染阶段的病藻藻体进行了扫描电镜观察, 解析在病原感染藻体过程中的微观病理特征。本研究结果为长茎葡萄蕨藻的健康养殖以及细菌性病害防控提供了有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 患病长茎葡萄蕨藻 患病长茎葡萄蕨藻于 2017 年 7 月, 采自大连某海藻养殖场, 养殖场水温为 26℃~27℃, 常温保存运回实验室, 在 24 h 内进行分析。

1.1.2 健康长茎葡萄蕨藻 健康长茎葡萄蕨藻采自大连室内养殖水池, 在实验室条件下进行培养, 培养温度为 28℃, 盐度为 30, 光照为 3000~5000 lx, 光暗

周期为 L : D=12 : 12, 充气培养, 每隔 3 d 更换 1 次过滤海水, 选取生长状态良好的长茎葡萄蕨藻用于实验。

1.1.3 长茎葡萄蕨藻培养液成分 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度为 15 mg/kg, $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度为 4 mg/kg。

1.1.4 试剂及固定液配方 实验所用细菌 TSA 平板、TCBS 琼脂平板和细菌生化反应微量鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司; 革兰氏染色液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。电镜固定液为 2.5%戊二醛(体积比为 25%的戊二醛溶液 : 20×PBS 缓冲液 : ddH₂O=1 : 5 : 4)。

1.1.5 仪器设备 YXQ-LS-SII 电热压力蒸汽灭菌锅, SPX-250B-Z 型生化培养箱, Centrifuge 5804R 低温冷冻离心机, NanoDrop 1000 紫外分光光度计, Nikon E800 光学显微镜, JEM-1200EX 型透射电子显微镜, VEGA3 TESCAN 扫描电镜。

1.2 病原菌的分离和纯化

选取患病症状明显的长茎葡萄蕨藻, 现场剪切匍匐茎、直立枝组织, 用无菌海水漂洗 3 次后, 取患病藻体的典型病灶部位, 并以健康藻体的组织为对照同步取样, 进行常规水浸片, 在光学显微镜下观察。同时, 在无菌的条件下, 用剪刀把病灶处藻体组织剪下, 置于无菌的研钵中研磨匀浆, 匀浆液用灭菌海水梯度稀释, 每个稀释度吸取 100 μl 稀释液分别涂布于 TSA 平板和 TCBS 琼脂平板, 在 28℃生化培养箱中培养 12~36 h。观察菌落生长和形态, 挑取形态一致的优势菌落在新鲜培养基上重复划线纯化 3 次以上, 直至分离到单菌落, 分离纯化后的菌株置于-80℃保存。

1.3 人工回接感染实验

将从患病长茎葡萄蕨藻病灶处分离得到的优势菌用于人工回接感染实验。刮取培养皿中分离纯化的优势菌置于 500 ml TSB 培养液, 37℃培养 24 h 后, 培养液 6000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用灭菌海水洗涤细菌, 将菌株用灭菌海水配制成终浓度为 10⁸ CFU/ml 的菌悬液(采用酶标仪和平板计数法结合计算), 10 倍浓度梯度稀释后备用。设 6 个浓度组 A1~A6, 对应浓度分别为 10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 和 10⁸ CFU/ml, 每个浓度各设 3 个平行组。采用浸浴的方式进行回接感染: 500 ml 菌悬液分装至 1000 ml 锥形瓶中, 每个锥形瓶中放入 1.5 g 藻体。设置不加菌液的灭菌海水培养液为对照组, 每组实验设置 3 个重复(B1、B2 和 B3)。放置于光照培养箱中养殖(温度为 28℃, 光强为 3000~5000 lx, 光周期为 12 h/12 h; 培

养液中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度为 15 mg/kg, $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度为 4 mg/kg。实验期内, 每 2 d 更换 1 次菌悬液。每天观察并记录藻体健康情况, 发现实验组藻体出现黑褐色典型发病特征时, 切取病灶部位进行细菌分离和鉴定。

1.4 扫描电子显微镜切片的制备与观察

选取藻体出现颜色变化的感染部位, 剪取大小约为 1 mm^3 的组织块, 放入含 2.5%戊二醛的电镜固定液中固定, 用于扫描电子显微镜观察。

将用 2.5%戊二醛的电镜固定液固定的组织块在 4°C 条件下固定 24 h 后, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 1%的锇酸固定 1.5 h; 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 将固定好的材料用梯度浓度的乙醇脱水, 再用醋酸戊酯作为中间介质, 置换脱水剂, 然后在临界点干燥器中用固体 CO_2 等置换剂置换中间介质, 进行临界干燥; 将干燥的样品用导电性好的粘合剂或其他粘合剂粘在金属样品台上, 然后放在真空蒸发器中喷镀一层 50~300 Å 厚的金属膜, 样品用扫描电镜观察、拍照。

1.5 病原菌的形态学观察与生理生化特性测定

将分离菌株在 TSA 和 TCBS 琼脂平板上接种划线, 观察菌落形态、大小。挑取单一菌落, 采用革兰氏染色液试剂盒对细菌进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察。同时挑取新鲜菌落, 2.5%戊二醛固定, pH7.0 的 2%磷钨酸负染色液染色, 进行透射电镜观察。并在无菌条件下挑取单一菌落, 制备菌悬液, 依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)和《常见细菌系统鉴定手册》(Holt, 1994; 东秀珠等, 2001), 用生化鉴定管测定细菌生理生化指标。

1.6 细菌 16S rDNA 序列测定

1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备 用灭菌枪头挑取单菌落悬浮于 $50\ \mu\text{l}$ 无菌去离子水中, 100°C 水浴 10 min, 12000 r/min 离心 2 min, 取 $1\ \mu\text{l}$ 上清液作为 PCR 反应所用模板 DNA(范文辉等, 2005)。

1.6.2 PCR 扩增与测序 利用扩增 16S rDNA 序列通用引物, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGG-CCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTA-CCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系见表 1(许燕, 2017)。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 复性 40 s, 72°C 延伸 40 s, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 20 min, 4°C 保存。将扩增得到的 PCR 产物送至上海生工生物科技有限公司进行测序。根据测序结果, 在 GenBank 中使用 BLAST ([http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

[ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast))进行同源性比较, 在网站(<http://www.bacterio.net/vibrio.html>)搜集下载与该菌株同属且相似度较高的其他菌株序列信息, 采用 MEGA 6 软件进行序列同源性分析和系统发育树构建。

表 1 PCR 反应体系(许燕, 2017)

Tab.1 Reaction system of PCR amplification(Xu, 2017)

反应体系 Reaction system	体积 Volume (μl)
ddH ₂ O	18.5
10×Buffer	2.5
dNTP mixture	2
27F	0.5
1492R	0.5
Taq DNA 聚合酶 <i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase	0.2
DNA 模板 DNA replication	1

1.7 药敏实验

将菌株在 TSB 固体培养基平板上培养 24 h 后, 用 1.5%无菌生理盐水冲洗稀释, 制成 10^8 CFU/ml 的菌悬液, 取 $100\ \mu\text{l}$ 均匀涂布于 TSA 固体培养基平板, 将药敏纸片贴于该培养基上, 每个培养基上贴 5 片, 28°C 培养 16 h 后, 测定抑菌圈直径, 记录其大小, 根据美国临床实验室标准化协会 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)标准, 判定细菌对该抗生素是高度敏感(Susceptible, S)、耐药(Resistant, R)、中度敏感(Intermediate, I) (苗鹏飞等, 2018)。

2 结果与分析

2.1 患病藻体临床症状

患病长茎葡萄蕨藻病灶部位整体呈黑褐色, 触感软、粘, 严重感染的匍匐茎呈明显的深黑褐色, 顶端藻体出现溃烂(图 1A); 在光学显微镜下观察发现, 患病的长茎葡萄蕨藻表面黏附很多簇虫、线虫, 且有许多杂藻附着在长茎葡萄蕨藻藻体上(图 1B); 正常藻体透明翠绿、表面光滑(图 1C, 图 1D)。

2.2 病原菌株培养形态

从患病藻体的病灶组织分离到 1 种优势菌, 在 TSA 和 TCBS 琼脂平板上培养 18~24 h, 观察 TCBS 琼脂平板, 形成规则圆形、中间隆起、表面光滑且呈黄色的菌落(图 2A)。在 TSB 培养液上培养 16 h 后, 菌液呈浑浊的淡黄色。经革兰氏染色后, 光学显微镜下观察发现, 细菌被染为红色, 两端钝圆、菌体直或少弯曲、短杆状(图 2B), 确定为革兰氏阴性菌。透射电镜下可见该菌有一根细长的端生鞭毛, 无荚

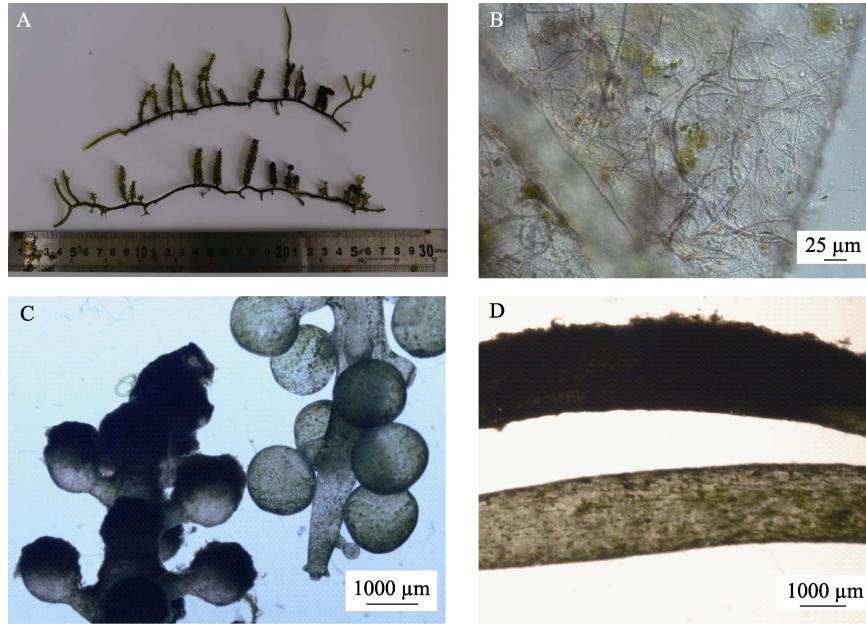


图1 患病的长茎葡萄蕨藻

Fig.1 The syndrome of infected *C. lentillifera*

- A: 感染黑褐病的长茎葡萄蕨藻外观; B: 簇虫、线虫和杂藻附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面;
C和D: 对照组颜色翠绿, 病烂组出现黑褐色病变(体式显微镜)
A: Syndrome of *C. lentillifera* infected black-brown disease; B: Gregarina, Nematode and miscellaneous algae attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; C and D: The color of the control group was green, and the infected group showed dark brown lesions (stereo microscope)

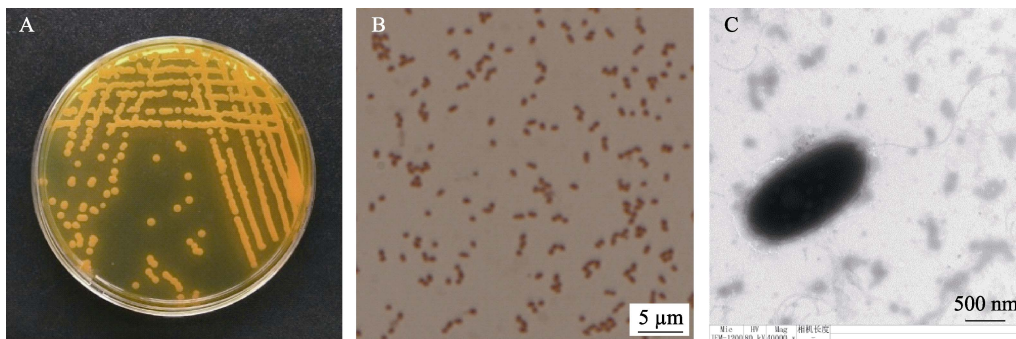


图2 患病长茎葡萄蕨藻分离出的优势菌 CL2017070801002 的形态

Fig.2 Morphological features of strain CL2017070801002 isolated from infected *C. lentillifera*

- A: TCBS 琼脂平板上的菌落; B: 革兰氏染色; C: 透射电镜图
A: Colony on TCBS medium; B: Gram stain; C: Transmission electron microscope figure

膜, 无芽孢(图2C)。将分离到的菌株编号为 CL2017070801002。

2.3 人工感染实验结果

用不同浓度的 CL2017070801002 菌悬液感染健康的长茎葡萄蕨藻, 除对照组外, 每个感染实验组都出现不同程度的感染症状, 其中, 10^8 CFU/ml 组 2 d 出现黑褐色典型症状, $\leq 10^5$ CFU/ml 的实验组 7 d 后出现感染。另外, 感染用的菌液浓度越高, 患病藻体的感染面积越大(图3)。

以浓度为 10^8 CFU/ml 的 CL2017070801002 菌悬液感染长茎葡萄蕨藻, 感染后的第 2~3 天, 可肉眼观察到藻体顶端呈黄色; 从第 4 天开始, 养殖水体浊度明显增加, 藻体颜色加深, 由黄色逐渐变为红褐色, 最后, 整个藻体病变直至溃烂。实验期间, 对照组没有出现病变, 感染组出现明显的红褐色病变。从患病藻体分离得到的菌株编号为 CL2017070801002A。CL2017070801002A 的菌落形态与 CL2017070801002 相同, 通过 16S rRNA 分析, 与 CL2017070801002 为同一种细菌。

2.4 感染藻体扫描电镜观察

图4所示, 对照组的直立枝球状体部分形态正常, 表面光滑且无其他生物附着, 结构完整(图4A); 感染组在接种菌株CL2017070801002的前期, 创伤处明显可见少量丝状物粘附, 且附着少量细菌(图4B);

感染后期, 患病藻体的直立枝球状体表面有大量细菌, 表面形态变得极不规则, 组织结构被破坏(图 4C); 患病藻体中粘附大量丝状物, 充斥整个藻体(图 4D); 同时, 在患病藻体表面还发现许多异物附着(图 4E); 藻体感染后直至溃烂的过程中, 均有大量的丝状物等

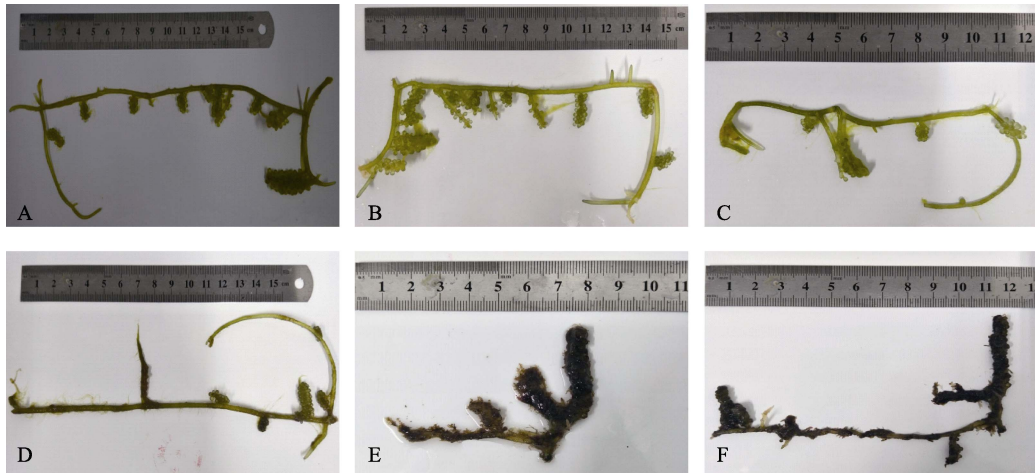


图 3 感染菌株 CL2017070801002 后的长茎葡萄蕨藻发病症状(感染第 7 天后)

Fig.3 Symptoms of the *C. lentillifera* infected with different dose of CL2017070801002 (infection group on 7th day)

A. 10^3 CFU/ml; B. 10^4 CFU/ml; C. 10^5 CFU/ml; D. 10^6 CFU/ml; E. 10^7 CFU/ml; F. 10^8 CFU/ml

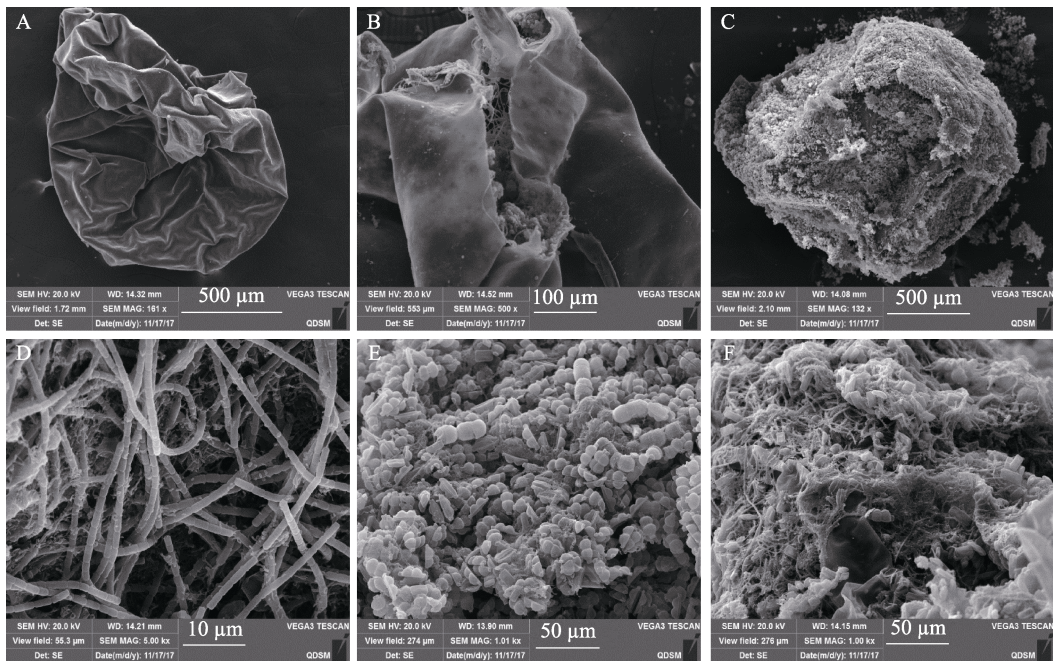


图 4 病烂长茎葡萄蕨藻扫描电子显微镜观察

Fig.4 Observation of diseased *C. lentillifera* by scanning electron microscopy

- A: 健康的长茎葡萄蕨藻; B: 接种病原菌后, 感染前期, 少量的细菌附着在长茎葡萄蕨藻创伤口处; C: 感染后期, 患病藻体表面聚集大量菌, 组织结构被破坏; D: 丝状物附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面; E: 未知物附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面; F: 感染后溃烂的长茎葡萄蕨藻(包含众多丝状物和未知物)
- A: Healthy *C. lentillifera*; B: After inoculation, early infection, a small amount of bacteria attached to the *C. lentillifera* wound; C: Late infection, a large number of bacteria got around, and the tissue structure is destroyed; D: Filaments attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; E: Unknown attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; F: Late infection, fester *C. lentillifera* (Contains many filaments and unknowns)

附着(图 4F)。

2.5 病原菌生理生化特性

对分离菌株 CL2017070801002 进行革兰氏染色, 光学显微镜观察显示, 菌株为革兰氏阴性短杆菌。生理生化特征分析结果显示: 氧化酶反应阳性, 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶反应阳性, 精氨酸双水解酶和 MR-VP 反应阴性, 能利用蔗糖、甘露醇, 不能利用乳糖、山梨醇、肌醇、鼠李糖等, 其余特征见表 2。

2.6 16S rDNA 扩增结果及系统发育分析

PCR 扩增病原菌 CL2017070801002 的 16S rDNA,

经琼脂糖电泳检测表明片段大小为 1400 bp 左右, 将该序列在 GenBank 数据库进行 BLAST 同源比对分析, 发现与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的同源性最高, 相似度为 99%, 从 NCBI 数据库中下载与该菌株序列相似度较高的 16S rDNA 基因序列, 利用 MEGA6 软件构建系统发育树(图 5), 结果显示, 该菌与溶藻弧菌聚为一簇, 确认菌株 CL2017070801002 为溶藻弧菌。

2.7 药敏实验

在实验的 36 种药物中, 该菌对氯霉素、四环素、氟罗沙星、强力霉素和氟苯尼考等药物高度敏感, 对庆大霉素、克拉霉素等药物中度敏感, 对青霉素、头孢氨苄、头孢拉定等药物不敏感(表 3)。

表 2 病原菌 CL2017070801002 和 CL2017070801002A 形态特性及生理生化特征
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of strain CL2017070801002 and CL2017070801002A

项目 Items	CL2017070801002	CL2017070801002A
革兰氏染色 Gram staining	-	-
无盐胰胨水 No salt tryptone water	-	-
3% NaCl 胰胨水 3% Tryptone water	+	+
6% NaCl 胰胨水 6% Tryptone water	+	+
10% NaCl 胰胨水 10% Tryptone water	+	+
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl glucose	-	-
3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose	-	-
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl mannitol	+	+
3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl arabinose	-	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-
苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
肌醇 Inositol	-	-
氧化酶反应 Oxidase	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-
3% NaCl 尿素酶 3% NaCl urease	+	+
木糖 Xylose	-	-
3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine decarboxylase	+	+
3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase	+	+
3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl arginine dihydrolase	-	-
3% NaCl MR-VP	-	-
3% NaCl 明胶 3% NaCl gelatine	+	+
西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	+	+
3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl hydrothion produce	-	-
半固体琼脂 Semi-solid agar	-	-

注: “-”: 阴性; “+”: 阳性

Note: ‘-’: Negative; ‘+’: Positive

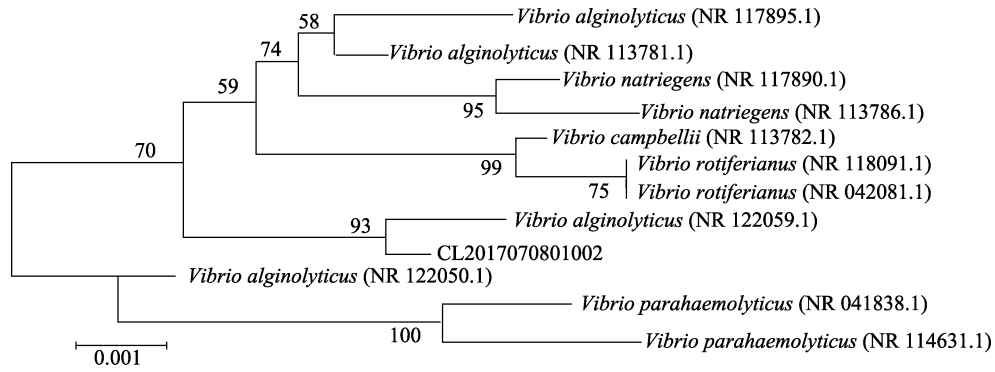


图 5 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 CL2017070801002 的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of CL2017070801002 and *V. alginolyticus* based on 16S rDNA sequence

表 3 菌株 CL2017070801002 对抗菌药物的敏感性

Tab.3 Sensitivity of the strain CL2017070801002 to antibacterial drugs

药物 Drug	剂量 Contents per piece (μg)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感度 sensitivity	药物 Drug	剂量 Contents per piece (μg)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感度 sensitivity
青霉素 Penicillin	10	0	R	氟罗沙星 Fleroxacin	5	27	S
氯霉素 Chloramphenicol	30	22	S	克拉霉素 Clarithromycin	15	15	I
菌必治 Ceftriaxone	30	22	S	阿米卡星 Amikacin	30	12	R
利福平 Rifampicin	15	22	S	庆大霉素 Gentamycin	10	14	I
红霉素 Erythrocin	15	16	I	阿奇霉素 Azithromycin	15	20	S
新霉素 Neomycin	30	12	R	新生霉素 Novobiocin	30	24	S
链霉素 Streptomycin	10	8	R	卡那霉素 Kanamycin	30	12	R
吡哌酸 Pipemidic	30	17	R	二甲胺四环 Minocycline	30	27	S
萘啶酸 Nalidixic acid	30	24	S	强力霉素 Doxycycline	30	21	S
四环素 Tetracycline	30	22	S	苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	24	S	氨苄青霉素 Ampicillin	10	0	R
头孢他啶 Ceftazidime	30	20	S	多粘菌素 B Polymyxin B	300U	0	R
氟哌酸 Norfloxacin	10	24	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	18	R
头孢氨苄 Cefalexin	30	0	R	头孢氨噻 Cefotaxime	30	21	S
头孢唑林 Cefazolin	30	14	R	罗美沙星 Lomefloxacin	18	24	S
头孢唑肟 Ceftizoxime	30	22	S	恩诺沙星 Enrofloxacin	10	23	R
头孢拉定 Cefradine	30	0	R	氟苯尼考 Florfenicol	30	23	S

注：“R”：耐药；“M”：中度敏感；“S”：高度敏感

Note: ‘R’: Resistance; ‘M’: Intermediate; ‘S’: Sensitivity

3 讨论

本研究从患黑褐病长茎葡萄蕨藻中分离得到 1 株优势菌 CL2017070801002, 在 TCBS 琼脂平板上为黄色, 边缘透明, 中间隆起, 有黏性, 革兰氏染色为阴性; 经电镜负染, 观察到菌株呈短杆状, 端生单鞭毛; 氧化酶反应阳性。经人工回接感染, 藻体出现与自然患病相同的症状, 证实该菌对长茎葡萄蕨藻具有较强的致病力。综合生理生化特征分析, 16S rDNA 基因序列比对分析等方法将该菌株鉴定为溶藻弧菌。

由弧菌引起的海洋生物疾病, 流行面积广, 发病率高, 给养殖业造成了巨大危害, 长期以来是水产领域研究的一大热点(杨少丽等, 2005)。溶藻弧菌具有较强的致病力, 林业杰等(1998)报道了溶藻弧菌含有多种致病因子, 近年来, 在养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鱼类和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中发现有溶藻弧菌感染的病例(金珊等, 2003; 姜燕等, 2016; 苗鹏飞, 2018), 本研究首次报道了在长茎葡萄蕨藻养殖过程中溶藻弧菌作为潜在的致病菌感染藻体的案例, 溶藻弧菌感染范围正不断扩大, 应当引起重视。细菌粘附于宿主细胞表面是机体感染致病的先决条件(戴卓捷等, 2001)。利用扫描电镜观察溶藻弧菌对长茎葡萄蕨藻的侵染过程, 发现感染初期, 藻体的细胞壁表面出现少量的细菌; 随着感染加重, 藻体细胞壁表面聚集大量细菌, 细胞壁逐渐被破坏, 同时给线虫、簇虫和杂藻等附着物提供有利环境, 使其快速生长繁殖, 导致藻体细胞组织逐渐破裂, 直至死亡。

细胞壁是抵抗病原菌入侵的第一道屏障, 在养殖环境中, 线虫、簇虫和杂藻等附着物对藻体造成的机械损伤可能是该菌株侵染的先决条件。韩宝芹等(1997)报道海带配子体的细胞壁中含有大量的褐藻胶及各种多糖类物质, 褐藻酸降解菌会产生褐藻酸酶, 可以分解利用作为细胞壁填充物质的褐藻胶, 使细胞间质变得松弛, 并导致藻体软化。彭艳婷(2012)研究发现, 细菌首先侵染海带配子体细胞的细胞壁, 破坏细胞壁后侵入原生质体, 并利用其中的营养物质进行生长和繁殖, 当配子体细胞内的营养物质不足以维持其生长繁殖时, 便从细胞壁中涌出, 寻找新的营养物质, 最后导致配子体细胞的破碎、死亡。

Zanetti 等(2000)研究发现, 溶藻弧菌可粘附在上皮细胞(Hep-2 和 Caco-2)上。Baffone 等(2001)研究了 20 株溶藻弧菌对 Hep-2 细胞的粘附情况, 其中, 有 11 株菌对其有较强的粘附作用。大多数革兰氏阴性菌在宿主细胞上的粘附受体是糖蛋白或糖脂, 其受体

特异性部位往往是其中的糖类残基(陈强等, 2006), 而长茎葡萄蕨藻中多糖含量较为丰富(姜芳燕等, 2014), 与其容易受到溶藻弧菌的感染密切相关。本研究结果证实, 藻体受到创伤后, 创伤部位先出现大量病原菌粘附和繁殖, 进而造成藻体组织严重损害, 最终导致整个藻体死亡溃烂。由此推断, 藻体细胞壁的多糖含量较为丰富, 容易遭受细菌粘附, 随着感染时间的加长, 细菌首先侵染藻体细胞壁, 抵抗病原菌入侵的第一道屏障被破坏, 细菌会继续寻找藻体中新的营养物质进行生长繁殖, 最后导致藻体细胞的破碎、死亡。

综上所述, 对于溶藻弧菌引起的长茎葡萄蕨藻黑褐病防控要重点从控制养殖系统中的病原菌数量入手。在实验室条件下, 10^5 CFU/ml 浓度溶藻弧菌感染长茎葡萄蕨藻, 第 10 天即可导致出现明显病变, 浓度越高, 发病时间越短, 发病程度越大。因此, 可在长茎葡萄蕨藻养殖生产中监控溶藻弧菌等病原的数量在 10^4 CFU/ml 以下, 如果监测到其病原的数量在 10^4 CFU/ml 以上, 可采取紫外处理水体、使用一些安全的消毒剂等手段(刘志轩等, 2006)及时预防黑褐病的发生。对于藻体病害, 正确选择和使用消毒剂尚待深入研究, 以期得到最佳消毒效果。

参 考 文 献

- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, *et al.* Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001, 18(5): 479–488
- Chen Q, Yan QP, Ma S. Progress on pathogenicity research of *Vibrio alginolyticus*. *Marine Sciences*, 2006, 30(8): 83–89 [陈强, 鄢庆彬, 马胜. 溶藻弧菌致病性研究进展. *海洋科学*, 2006, 30(8): 83–89]
- Dai ZJ, Yang GM, Wang ZQ. Molecular structure and assembly mechanism of bacterial adhesins. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2001, 29(3): 55–59 [戴卓捷, 杨光明, 汪正清. 细菌粘附素的分子结构和装配机制. *微生物学免疫学进展*, 2001, 29(3): 55–59]
- Dong XZ, Cai MY. *Common bacterial system identification manual*. Beijing: Sciences Press, 2001, 107–116 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 107–116]
- Evans AS. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 1976, 49(2): 175–195
- Fan WH, Huang J, Wang XH, *et al.* Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 665–670 [范文辉, 黄

- 健, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2005, 45(5): 665–670]
- Guo H. Effect of temperature, irradiance on the growth of the green alga *Caulerpa lentillifera*, (Bryopsidophyceae, Chlorophyta). Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences University, 2014 [郭辉. 海葡萄(*Caulerpa lentillifera*) 切断组织再生培养及发育条件研究. 中国科学院大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Han BQ, Liu WS, Dai JX, *et al.* Culture conditions of alginate-degrading bacteria and the separation of cells of brown algae by alginase. Marine Sciences, 1997, 21(2): 39–43 [韩宝芹, 刘万顺, 戴继勋, 等. 褐藻酸降解菌的发酵培养及褐藻酸酶对褐藻细胞的解离作用. 海洋科学, 1997, 21(2): 39–43]
- Hang JH. Effects of concentrations of nitrogen and phosphorus and different culture methods on the growth of *Caulerpa lentillifera*. Journal of Fujian Fisheries, 2012, 34(5): 416–419 [黄建辉. 氮磷浓度及培养方式对长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*)生长的影响. 福建水产, 2012, 34(5): 416–419]
- Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition. US: Lippincott Williams and Wilkins, 1994, 482–484
- Jiang FY, Song WM, Yang N, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient content of *Caulerpa lentillifera*. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(24): 356–359 [姜芳燕, 宋文明, 杨宁, 等. 海南长茎葡萄蕨藻的营养成分分析及评价. 食品工业科技, 2014, 35(24): 356–359]
- Jiang Y, Cui XC, Zhang Z, *et al.* Epizootic and aetiological study on the enteritis disease in cultured *Scophthalmus maximus*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(17): 123–126 [姜燕, 崔晓翠, 张正, 等. 养殖大菱鲆肠炎病的流行病学和病原学研究. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 123–126]
- Jin S, Cai WQ, Yu H, *et al.* Studies on cell pathology of *Vibrio alginolyticus* disease to large yellow croakers. Marine Sciences, 2003, 27(2): 59–62 [金珊, 蔡完其, 於宏, 等. 大黄鱼溶藻弧菌细胞病理变化的初步研究. 海洋科学, 2003, 27(2): 59–62]
- Kudaka J, Itokazu K, Taira K, *et al.* Investigation and culture of microbial contaminants of *Caulerpa lentillifera* (Sea grape). Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2008, 49(1): 11–15
- Liang ZR, Wang X, Wang FJ, *et al.* The key technology of factory culture of *Caulerpa lentillifera*. Scientific Fish Farming, 2016(2): 42–43 [梁洲瑞, 王欣, 王飞久, 等. 长茎葡萄蕨藻的工厂化养殖关键技术. 科学养鱼, 2016(2): 42–43]
- Lin YJ, Dong XP, Ou JM, *et al.* Study on pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*. Strait Journal of Preventive Medicine, 1998(4): 1–2 [林业杰, 董新平, 欧剑鸣, 等. 溶藻弧菌的致病性研究. 海峡预防医学杂志, 1998(4): 1–2]
- Liu ZX, Wang YG, Zhang Z, *et al.* Germicidal effect of several disinfectants on the pathogenic bacteria of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 112–119 [刘志轩, 王印庚, 张正, 等. 几种消毒剂对凡纳滨对虾致病性弧菌的杀灭作用. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 112–119]
- Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, *et al.* Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euclima cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(1): 75–80
- Miao PF, Yang Y, Tan SW, *et al.* Identification and antibiotic susceptibility of pathogenic bacterium *Vibrio alginolyticus* from diseased giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries Science, 2018, 37(3): 384–388 [苗鹏飞, 杨映, 谭淑雯, 等. 罗氏沼虾致病性溶藻弧菌的鉴定及药敏分析. 水产科学, 2018, 37(3): 384–388]
- Niwano Y, Beppu F, Shimada T, *et al.* Extensive screening for plant foodstuffs in Okinawa, Japan with anti-obese activity on adipocytes *in vitro*. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64(1): 6–10
- Peng YT. Bacterial pathogen infecting gametophytes of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [彭艳婷. 一种海带配子体新病害的病原性质及侵染规律的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Saito H, Xue CH, Yamashiro R, *et al.* High polyunsaturated fatty acid levels in two subtropical macroalgae, *Cladosiphon okamuranus* and *Caulerpa lentillifera*. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 665–673
- Titlyanov EA, Titlyanova TV, Pham VH. Stocks and the use of economic marine macrophytes of Vietnam. Russian Journal of Marine Biology, 2012, 38(4): 285–298
- Xu Y. Study on etiology, histopathology of dark-body diseases in cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) and variance of microbial community structure under antibiotic intervention. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [许燕. 养殖斑石鲷黑身病的病原病理学及药物干预下肠道菌群结构分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Yang SL, Wang YG, Dong SG. Progress of research on vibriosis in marine cultured fish. Marine Fisheries Research, 2005, 26(4): 75–83 [杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75–83]
- Zanetti S, Deriu A, Volterra L, *et al.* Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità, 2000, 12(6): 487–491
- Zhang Y, Lin B. "Green caviar" industry prospects. New Rural Technology, 2016(10): 41–42 [张颖, 林冰. “绿色鱼子酱”产业前景看好. 农村新技术, 2016(10): 41–42]

Etiology of Black-Brown Disease in Cultured *Caulerpa lentillifera*

ZHANG Yannan^{1,2}, WANG Yingeng², LIU Fuli², LIAO Meijie², LI Bin², ZHANG Zheng²,
LIANG Zhourui², YU Yongxiang², RONG Xiaojun^{2①}

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

Abstract *Caulerpa lentillifera* is a seaweed species with increasing large-scale economic value due to its nutritional and health benefits. With the expansion of farming scale, problems associated with various diseases are becoming more common and severe. However, few research focusing on this topic have been published. In this study, the strain CL2017070801002 was isolated from *C. lentillifera*, which was diagnosed with black-brown disease in Dalian's breeding farm. Following infection of healthy *C. lentillifera* with this strain at a concentration of $10^3\sim 10^8$ CFU/ml, each experimental group developed different black-brown lesions within 7 days. Under scanning electron microscopy, a large number of bacteria were accumulated on the cell surface of the alga, and the cells ruptured and died over time. These results indicated that CL2017070801002 was the causative pathogen of black-brown disease of *C. lentillifera*. Using gram staining as well as physiological and biochemical characteristics based on a 16S rDNA phylogenetic tree, the strain was identified as *Vibrio alginolyticus*. CL2017070801002 was highly sensitive to chloramphenicol, tetracycline, fleroxacin, doxycycline, and florfenicol; moderately sensitive to gentamicin and clarithromycin; and not sensitive to penicillin and cephalosporin. These results will provide useful information for the prevention and control of bacterial diseases of *C. lentillifera*.

Key words *Caulerpa lentillifera*; Black-brown disease; *Vibrio alginolyticus*

① Corresponding author: RONG Xiaojun, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181019001

http://www.ykxjz.cn/

曹林泉, 秦政, 姜玉声, 刘鑫, 李晓东, 林源, 黄楷涛, 刘胥. 日本米虾胚胎发育及离体孵化. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 145–152

Cao LQ, Qin Z, Jiang YS, Liu X, Li XD, Lin Y, Huang KT, Liu X. Embryonic development of *Caridina japonica* and *in vitro* incubation of its fertilized eggs. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 145–152

日本米虾胚胎发育及离体孵化*



曹林泉¹ 秦 政¹ 姜玉声^{1①} 刘 鑫¹
李晓东² 林 源³ 黄楷涛¹ 刘 胥²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 盘锦光合蟹业有限公司研发中心 盘锦 124200;
3. 辽宁省水产苗种管理局 大连 116015)

摘要 本研究采用自制离体孵化装置,对日本米虾(*Caridina japonica*)不同发育期胚胎进行离体孵化研究,结果显示,水温为 25.5℃时,日本米虾受精卵孵化大约需要 25 d,发育积温为 637.5℃。胚胎发育历经受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、前无节幼体期、后无幼体期、前蚤状幼体期和膜内蚤状幼体期 8 个时期。各期离体胚胎均能孵化出幼体,膜内蚤状幼体期离体胚胎孵化率最高,为(80.7±2.4)%,非离体孵化的对照组为(79.1±4.9)%,二者差异不显著;卵裂期离体胚胎孵化率最低,为(28.2±2.6)%,与对照组差异显著。各组离体胚胎所孵化出的 I 期(Z I)和 II 期蚤状幼体(Z II)的变态率无显著差异。温度对日本米虾前蚤状幼体期胚胎离体孵化影响显著,在 15.0℃~32.5℃范围内,随水温升高孵化时间逐渐缩短,15.0℃时,前蚤状幼体离体孵化时间为(436.8±124.8) h,32.5℃时缩短至(228.0±88.8) h,但温度高于 29.0℃时,孵化出的幼体变态率开始下降。本研究可为日本米虾繁殖生物学及甲壳动物胚胎离体孵化技术研究提供参考。

关键词 日本米虾; 胚胎发育; 离体孵化; 温度

中图分类号 S966.12 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0145-08

日本米虾(*Caridina japonica*),又称大和藻虾、珍珠虾,隶属于软甲纲(Malacostraca),十足目(Decapoda),匙指虾科(Atyidae),米虾属(*Caridina*)。其习性温和,体色透明,喜食藻类和有机碎屑,具有洄游习性,对盐度适应性强,易于饲养,常作为水族箱中的“清道夫”以及生态学与环境学研究的实验材料(Tlusty, 2002; 赵朝阳等, 2012; 高淑娇, 2012; 蔡生力等, 2006; 李帆, 2007)。近年来,日本米虾的市场需求量日益增加,价格逐年攀升,然而对其生物学

的研究甚少。日本学者对此虾的洄游等生物学习性进行了初步的研究,发现盐度 16.9,温度 25℃为胚胎发育的适宜条件,其幼体经过 9 个时期发育成为仔虾(Hamano, 1992; Hayashi *et al*, 1984)。国内鲜有此虾的相关报道,而对于没有洄游习性、在淡水中繁殖的中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata sinensis*)生物学相关研究较多(薛俊增等, 1995; 孙世杰等, 2007)。这 2 种米虾胚胎发育等繁殖特性的差异有待进一步研究。

腹胚亚目的虾蟹类有抱卵习性,但在环境不适或

* 辽宁省高等学校海洋产业技术研究院项目、辽宁省海洋与渔业厅计划项目(2015013)、大连市杰出青年科技人才项目(2017RJ10)和大连海洋大学蔚蓝英才工程资助项目共同资助[This work was supported by Liaoning Provincial Institute of Marine Industry Technology Research Project, Liaoning Provincial Ministry of Oceans and Fisheries Plan Project (2015013), Dalian Outstanding Youth Science and Technology Talent Project (2017RJ10), and Blue Ocean Talent Project of Dalian Ocean University]. 曹林泉, E-mail: lqcao0225@163.com

① 通讯作者: 姜玉声, 副教授, E-mail: jys@dlou.edu.cn

收稿日期: 2018-10-19, 收修改稿日期: 2018-11-20

受惊扰时会发生弃卵现象。一些人工繁殖的种类其亲体在抱卵过程中会发生死亡,造成一定的经济损失,因此,虾蟹类胚胎离体孵化技术研究具有重要的应用价值。阎斌伦(2002)的研究表明,虾蟹受精卵与亲体仅以刚毛连接,腹肢摆动保证发育过程中氧气充足,但没有营养上的联系。因此,在进行虾蟹类胚胎离体孵化时,研究者通常关注于水中的溶解氧,多采用充气的方法。迄今,已有关于日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等离体孵化的研究报道,但离体孵化的效果往往与胚胎离体的时间呈负相关(王吉桥等, 2006; 康现江等, 1996; 顾功超等, 1995)。也有研究者认为,水中微生物及死卵滋生的原生动机会影响离体胚胎的孵化率,尝试使用化学药物对胚胎及水体进行消毒处理,但这一方法有可能会对胚胎产生潜在的毒性,同时也会造成环境的污染(廖永岩等, 2001; 鲍鹰等, 1999)。如何能提高较早离体胚胎的孵化效果具有一定理论与应用意义。

日本米虾抱卵亲体在胚胎临近孵化的后期常出现弃卵现象,推测原因为胚胎发育不同步,部分幼体先孵出后刺激亲体去除剩卵。现阶段尚缺乏对日本米虾胚胎发育的系统报道,限制了对弃卵机理的深入研究,而弃卵如何再利用也是需要解决的问题。本研究用自制水产动物胚胎孵化装置对不同时期胚胎进行离体孵化,研究了日本米虾的胚胎发育特征及温度对其离体孵化效果的影响,以期为此种类繁殖生物学研究及甲壳动物胚胎离体孵化技术的优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究于2017年2~4月在大连海洋大学实验室进行。日本米虾购于广州花地湾花鸟鱼虫批发市场,平均体长为(3.5±0.8) cm,平均体重为(4.9±0.9) g,经促熟培育至产卵。养殖容器为9.0 L玻璃鱼缸,配有温度计、50 W加热棒(闽江HK-50)、5 W水泵(森森JP-032)和气石等辅助装置。自制离体孵化装置见图1。

1.2 方法

1.2.1 胚胎形态学观察 将抱卵亲虾挑出单独饲养。抱卵后,前3 d每隔6 h取卵1次,以后每24 h取卵1次,取卵时将抱卵亲虾置于表面皿中,用解剖针轻轻将胚胎从附肢上剥离,再将粘连的胚胎分开,并及时放入已经消毒的水中备用。每次随机取胚胎4~5个,4组平行。使用Nikon E100显微镜观察胚胎发育特征,测量胚径,并拍照,最后计算发育积温。

发育积温计算公式(周洲等, 2015)为:

$$\text{发育积温} = \text{胚胎发育天数} \times \text{平均水温}$$

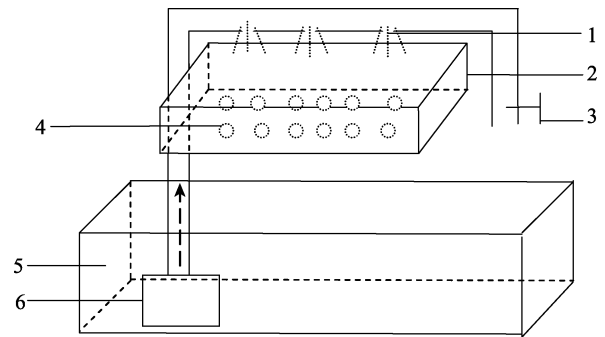


图1 离体孵化装置

Fig.1 *In vitro* incubator for the shrimp eggs

- 1: 滴水孔; 2: 孵化槽; 3: 调节阀; 4: 离体胚胎;
5: 水族缸; 6: 水泵
1: Drip water hole; 2: Incubator; 3: Regulating valve;
4: Embryo; 5: Aquarium; 6: Pump

1.2.2 胚胎离体孵化 离体孵化装置中的水泵将水抽入管道,管道上有小孔,水从小孔喷洒到孵化槽中的滤棉上,其上放置离体胚胎(图1)。将卵裂期、囊胚期、原肠胚、前无节幼体期、后无节幼体期、前溞状幼体期和膜内溞状幼体期的胚胎分别置于离体孵化装置,每组置有100个胚胎,同时在孵化装置的玻璃缸中放入胚胎发育至相应时期的抱卵亲虾。孵化期间盐度为 17.0 ± 1.0 ,温度为 $(25.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$,每组重复5次。

1.2.3 温度对胚胎离体孵化的影响 设置 15.0°C 、 18.5°C 、 22.0°C 、 25.5°C 、 29.0°C 和 32.5°C 共6个温度组,盐度为17.0。每个温度组在实验时,于离体孵化装置中放入处于前溞状幼体期的胚胎100个,每组实验重复5次。

1.3 数据分析

实验数据使用SPSS 20进行单因素方差分析和Turkey多重比较计算各数据间的差异显著性,以 $P < 0.05$ 作为显著差异判定条件。

2 结果

2.1 胚胎发育分期与形态特征

日本米虾产卵后由卵柄将卵粘在一起,抱于腹部。根据胚胎发育过程中形态学特征的变化,将胚胎发育过程分为受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠期、前无节幼体期、后无节幼体期、前溞状幼体期和膜内溞状幼体期8个时期,各个发育期主要形态特征见表1。

表 1 日本米虾胚胎发育各时期特征
Tab.1 Characteristics of each embryonic developmental stage of *C. japonica*

胚胎发育时期 Developmental stage	发育时间 Developmental time (h)	胚径 Size (mm)	特征 Characteristics	发育积温 Developmental accumulated temperature (°C)	图 Figure
受精卵 Fertilized eggs	0	(0.48±0.03)×(0.28±0.01)	椭圆形, 充满卵黄	0.0	Fig.2A
卵裂期 Cleavage stage	6	(0.48±0.03)×(0.30±0.02)	出现卵裂沟, 细胞开始分裂	6.4	Fig.2B Fig.2C
囊胚期 Blastula stage	42	(0.48±0.02)×(0.31±0.02)	表面细胞呈多边形且排列紧密, 形状如同桑葚, 边缘颜色开始变浅	44.6	Fig.2D
原肠期 Gastrula stage	96	(0.52±0.03)×(0.33±0.01)	出现透明区域, 并逐渐扩大, 呈浅灰色	102.0	Fig.2E
前无节幼体期 Pre-nauplii stage	192	(0.55±0.01)×(0.35±0.01)	出现分节现象, 复眼色素开始积累	204.0	Fig.2F
后无节幼体期 Metanauplius stage	216	(0.55±0.01)×(0.35±0.01)	出现黑色复眼和附肢, 胚胎颜色继续变浅	229.5	Fig.2G
前溞状幼体期 Before-zoea stage	288	(0.55±0.01)×(0.35±0.03)	出现心跳, 有心跳间隔	306.0	Fig.2H
膜内溞状幼体期 Membrane-zoea stage	408	(0.63±0.03)×(0.39±0.02)	胚胎透明度继续加强, 出现肠道蠕动, 无心跳间隔, 心跳次数逐渐增加	433.5	Fig.2I
溞状幼体 I 期 Zoea I	600	-	幼体破膜而出, 游泳能力弱, 头部垂直向下	637.5	Fig.2J

受精卵(图 2A): 不规则椭圆形, 呈深灰色, 卵径为(0.48±0.03) mm×(0.28±0.01) mm, 4~6 h 后进入卵裂期。

卵裂期(图 2B、图 2C): 胚胎发育至卵裂期, 呈深灰色, 不透明。分裂过程中明显可见卵裂沟。新分裂的 2 个细胞中央颜色较深, 充满整个胚胎内。卵裂期阶段持续约 36 h。

囊胚期(图 2D): 产卵后 42 h, 胚胎发育进入囊胚期, 此期胚胎边缘颜色变浅, 中央颜色加深。胚径与受精卵相当。囊胚期胚胎内分化出大量小细胞, 胚胎表面细胞呈多边形且排列紧密, 形状如同桑葚。由于分裂的细胞较小, 无法区分植物极、动物极与囊胚腔。

原肠期(图 2E): 产卵后 96 h, 胚胎发育进入原肠期, 此时阴影区域外圈颜色变浅至半透明, 中央颜色也略变浅, 呈浅灰色。随着胚胎发育, 透明区域扩大到整个胚胎的 1/4 后开始发育形成腹板。胚径明显增大, 为(0.52±0.03) mm×(0.33±0.01) mm。胚体不断吸收利用卵黄, 胚胎细胞继续分裂, 细胞数量更多更加微小。胚胎的一端出现月牙状透明区域, 为进入原肠期的重要标志。

前无节幼体期(图 2F): 产卵后 192 h, 胚胎发育进入前无节幼体期, 该期仅持续 24 h。此期胚胎一端

的透明区域约占整个受精卵的 1/3, 阴影区域与透明区域相连接的位置出现凹陷, 阴影区域颜色变浅, 仅中央部分呈深灰色, 其他部分均呈半透明。透明区域出现分节现象, 将发育为幼体的腹部。阴影区域开始积累复眼色素, 将发育为复眼。卵径略有增大, 为(0.55±0.01) mm×(0.35±0.01) mm。

后无节幼体期(图 2G): 产卵后 216 h 进入后无节幼体期, 此期胚胎卵黄继续缩小, 透明区域继续扩大, 约占胚胎的 1/2。卵径与前无节幼体期相当。本期胚胎中出现明显可见的黑色复眼, 为胚胎进入后无节幼体期的重要标志。胚胎腹部透明区域隐约出现 1 个棒状结构, 未来发育成肠道, 出现 5 对附肢, 但不分节。约 48 h 后, 头部及胸部出现分化, 腹部分节进一步明显, 附肢及肠道进一步分化, 附肢数目增加为 7 对。

前溞状幼体期(图 2H): 胚胎发育 288 h 进入前溞状幼体期, 由于卵黄持续减少, 胚胎颜色进一步变浅, 几乎为半透明状。卵径与前无节幼体期相当。此期隐约可见分节, 复眼增大, 头部及胸部进一步发育分化, 头部出现弯曲的条状结构, 将发育成额角, 胸部出现类似心脏的组织, 并不规律的跳动, 为胚胎进入前溞状幼体期的重要标志, 心跳 60~100 次/min, 有心跳间隔, 此时胚胎发育积温约达到 306.0°C。72.0 h

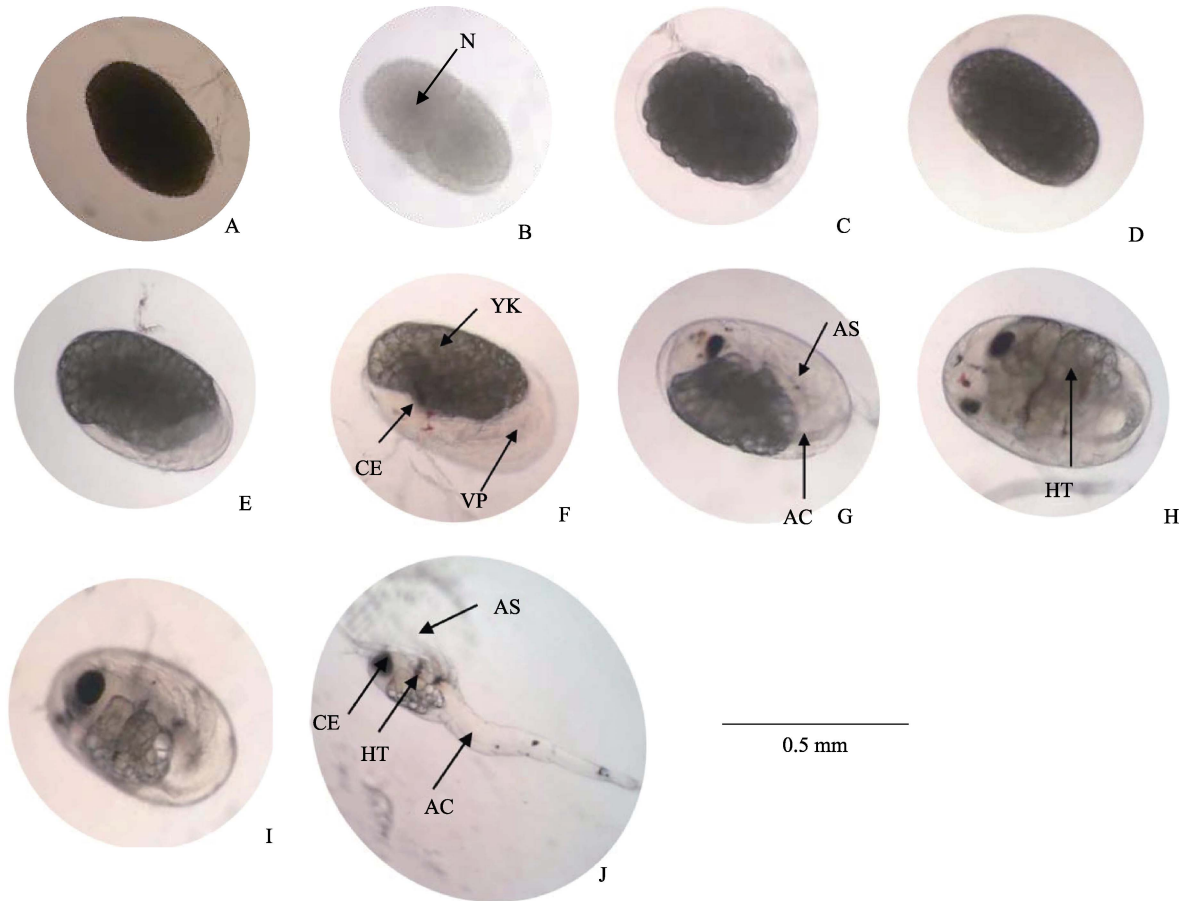


图2 日本米虾胚胎发育各时期的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of *C. japonica* at different embryonic developmental stages

A: 受精卵; B、C: 卵裂期; D: 囊胚期; E: 原肠期; F: 前无节幼体期; G: 后无节幼体期; H: 前溞状幼体期; I: 膜内溞状幼体期; J: 溞状幼体 I 期; N: 细胞核; YK: 卵黄; CE: 复眼; VP: 腹板; AS: 附肢; AC: 消化道; HT: 心脏
 A: Fertilized eggs; B, C: Cleavage stage; D: Blastula stage; E: Gastrula stage; F: Pre-nauplii stage; G: Metanauplius stage;
 H: Before-zoea stage; I: Membrane-zoea stage; J: Zoea I stage; N: Nuclei; YK: Yolk; CE: Compound eyes; VP: Ventral plate;
 AS: Appendages; AC: Alimentary canal; HT: Heart

后心跳逐渐稳定,心跳间隔出现次数减少,心跳约为 100次/min。

膜内溞状幼体期(图 2I):雌虾产卵后 408 h 进入膜内溞状幼体期,此时卵黄仅存少量于胚体的头胸部背面,透明区域几乎充满整个胚胎。卵径增大明显,为 (0.63 ± 0.03) mm \times (0.39 ± 0.02) mm。复眼发育成亮黑色,四周隐约出现放射状条纹,出现眼柄,复眼呈半球状突出于背部表面。头部额角变粗,头胸部附肢分节,附肢末端出现色素块。胚胎组织结构清晰可见,肠道发育完全,偶尔可见蠕动。身体仍然弯曲,偶见抽动。膜内溞状幼体期胚胎心脏发育日趋完全,心跳稳定且加快,不再出现心跳间隔。此时胚胎发育基本完成,体型与溞状幼体类似。

溞状幼体 I 期(图 2J):胚胎发育至 600 h 左右,发育积温达到 637.5℃,心跳增加到约 180 次/min,

陆续开始有幼体孵出,幼体破膜时用头部的额角及附肢刺破卵膜。出膜后的幼体游泳能力弱,头部垂直向下,随水流而浮动。自此,日本米虾完成胚胎发育阶段,将进入幼体变态发育阶段。

2.2 不同时期的胚胎离体孵化效果

水温 25.5℃时,不同时期离体胚胎均能于离体孵化装置中孵出幼体,但孵化率有较大差异(表 2)。卵裂期离体胚胎孵化率为 $(28.2\pm 2.6)\%$,囊胚期离体胚胎孵化率为 $(33.1\pm 4.4)\%$,二者无显著差异($P>0.05$);前无节幼体期离体胚胎孵化率为 $(64.9\pm 6.5)\%$,后无节幼体期离体胚胎的孵化率为 $(66.8\pm 13.2)\%$,其无显著差异($P>0.05$),但与非离体孵化的对照组 $(79.1\pm 4.9)\%$ 差异显著($P<0.05$)。前溞状幼体期胚胎的离体孵化率为 $(78.9\pm 2.2)\%$,膜内溞状幼体期孵化率为 $(80.7\pm 2.4)\%$,

表 2 不同发育期胚胎离体孵化效果
Tab.2 Effects of embryo incubation *in vitro* on different developmental stages

项目 Items	胚胎离体时期 Embryo <i>in vitro</i> period							
	非离体胚胎 Non-isolated embryos	卵裂期 Cleavage stage	囊胚期 Blastula stage	原肠胚期 Gastrula stage	前无节幼体期 Pre-nauplii	后无节幼体期 Metanauplius	前蚤状幼体期 Before-zoea	膜内蚤状幼体期 Membrane-zoea
孵化率 Hatching rate(%)	79.1±4.9 ^d	28.2±2.6 ^a	33.1±4.4 ^a	52.3±2.0 ^b	64.9±6.5 ^c	66.8±13.2 ^c	78.9±2.2 ^d	80.7±2.4 ^d
Z I ~Z II 期变态率 Metamorphosis rate of Z I ~Z II period (%)	66.2±4.4 ^e	66.3±3.6 ^e	67.0±2.7 ^e	66.5±4.0 ^e	65.6±5.7 ^e	66.4±4.0	67.2±1.8 ^e	67.4±2.5 ^e

注: 同行中标有不同小写字母者表示组间有显著性差异($P<0.05$), 标有相同小写字母者表示组间无显著性差异($P>0.05$); Z I 表示蚤状幼体 I 期; Z II 表示蚤状幼体 II 期, 下同

Note: The data with different letters within the same row are significantly different at the 0.05 probability level, and the data with the same letters within the same row are not significantly different; the Z I represents the 1st phase of the zoea larva; Z II represents the 2nd phase of the zoea larva. The same as below

与对照组差异不显著($P>0.05$)。各组离体胚胎所孵化出的 I 期蚤状幼体(Z I)到 II 期蚤状幼体(Z II)的变态率无显著差异($P>0.05$)。

2.3 温度对离体孵化效果的影响

由表 3 可知, 当盐度为 17.0 时, 不同温度组日本米虾前蚤状幼体期胚胎离体孵化时间和孵化率有明显差异。从 15.0℃到 32.0℃, 随着水温的升高, 胚胎孵化时间逐渐缩短, 15.0℃组孵化时间需要(436.8±124.8) h, 而 32.0℃组缩短至(228.0±88.8) h。温度对胚胎离体孵化率有显著影响, 从 15.0℃到 29.0℃, 随着水温升高而呈逐渐升高趋势, 29.0℃时孵化率最高, 为(78.2±2.8)%, 但在 32.5℃时下降至(73.2±3.2)%。由此可知, 温度过高或过低均不利于离体胚胎的发育与孵化。

温度对离体孵化出幼体的质量也有影响。25.5℃组中蚤状幼体变态率最高, 为(67.2±1.8)%, 32.5℃组蚤状幼体变态率最低, 为(57.3±4.0)%, 与其他各组均有显著差异($P<0.05$); 15.0℃、18.5℃、22.0℃ 3 组间

蚤状幼体变态率差异不显著($P>0.05$)。综合孵化率和蚤状幼体变态率, 胚胎离体孵化温度控制在 25.5℃到 29.0℃间, 有利于提高孵化率和幼体质量。

3 讨论

3.1 胚胎发育的分期

虾蟹类胚胎发育可分为胚胎早期和晚期 2 个主要阶段, 早期阶段为卵裂期、囊胚期和原肠胚; 而晚期阶段也就是绝大部分虾蟹具有的膜内幼体期, 其因种类而异, 分期尚无统一标准。适宜的条件下, 锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)膜内幼体期为 14~15 d, 根据附肢数量和复眼色素形成等特征分为 7 对附肢期、9 对附肢期、11 对附肢期、复眼色素形成期、准备孵化期和孵化期(梁华芳等, 2012); 白须条斑鞭腕虾(*Lysmata amboinensis*)膜内幼体期约为 8.5 d, 根据复眼色素形成和心跳等特征分为无节幼体发生期、复眼色素形成前期、复眼色素形成后期、孵化前期和孵化期(张雅静等, 2012); 远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)

表 3 不同温度下离体胚胎孵化效果
Tab.3 Effects of water temperature on *in vitro* embryo hatching performance

项目 Items	离体孵化温度 Incubation temperature <i>in vitro</i> (°C)					
	15.0±0.9	18.5±1.2	22.0±0.7	25.5±1.0	29.0±1.1	32.5±1.0
孵化率 Hatching rate (%)	72.3±3.2 ^a	71.8±2.4 ^a	73.8±4.6 ^a	78.3±2.2 ^b	78.2±2.8 ^b	73.2±3.2 ^a
离体孵化时间 Incubation time <i>in vitro</i> (h)	436.8±124.8	381.6±120.0	345.6±115.2	31.2±91.2	242.4±96.0	228.0±88.8
Z I ~Z II 期变态率 Metamorphosis rate of Z I ~Z II period (%)	62.2±2.9 ^e	62.5±1.2 ^e	61.7±2.1 ^e	67.2±1.8 ^c	66.8±2.4 ^c	57.3±4.0 ^d

的膜内幼体期也为 8.5 d 左右, 但根据身体分节和心跳等特征仅分为无节幼体、后无节幼体和原蚤状幼体(廖永岩等, 2011)。对中华新米虾的研究表明, 其胚胎发育分为卵裂期、囊胚期、原肠期、无节幼体期 I、无节幼体期 II、无节幼体 III 期和无节幼体 IV 期, 在水温为 22℃~26℃ 条件下发育历时 376 h (薛俊增等, 2009)。也有研究者将中华锯齿米虾的胚胎发育分为卵裂期、囊胚期、原肠期、前无节幼体期、后无节幼体期、复眼色素形成期和蚤状幼体期(孙世杰等, 2007)。本研究参考已报道的虾蟹类胚胎分期方法(薛俊增等, 2009; 徐慈浩等, 2015), 将日本米虾早期胚胎分为受精卵、卵裂期、囊胚期和原肠胚期, 而将晚期胚胎分为前无节幼体期、后无节幼体期、前蚤状幼体期和膜内蚤状幼体期。日本米虾胚胎发育过程与中华新米虾等大多数淡水虾类胚胎发育特征相似, 其发育时间长, 膜内幼体期多。但多数淡水虾类孵化出的幼体直接或者经过短暂的变态发育进入仔虾期(薛俊增等, 1995; 孙世杰等, 2007; 刘哲玉, 2009), 日本米虾幼体孵化后要经历较长的浮游期, 这一点又与多数海水虾类相似(蔡生力等, 2006; 季文娟, 1996; 梁俊平, 2013)。日本米虾的胚胎发育及幼体的行为表现兼具淡水和海水种类的特征, 与其降河洄游特性相一致。

3.2 不同发育时期胚胎离体孵化的效果

虾蟹类胚胎离体孵化过程中除了要保证足够的溶解氧, 最主要的影响因素来自于真菌和原生动物等有害生物的滋生, 由于没有亲体的及时清理, 大量的有害生物附着于胚胎表面, 导致胚胎腐烂, 或被这些生物直接进食。为提高胚胎的离体孵化率, 不少研究者使用药物处理胚胎。廖永岩等(2001)研究表明, 使用 0.2 mg/dm³ 浓度的孔雀石绿处理远海梭子蟹离体卵效果显著; 鲍鹰等(1999)对中华绒螯蟹胚胎离体孵化研究表明, 福尔马林与孔雀石绿联用比其单独使用的效果明显。虽然使用药物处理离体胚胎取得了一定成果, 但规模化生产中这无疑将增加生产成本, 且很多作用明显的化学药物会对环境造成危害, 已被列入禁用药品。本研究没有使用任何药物处理离体胚胎, 获得了较好的孵化效果, 这主要取决于装置的持续流水, 以及精细的过滤装置, 其不仅能保证充足的溶解氧, 及时冲洗胚胎表层的有害生物, 而且能将水中的悬浮物滤除, 减少细菌或原生动物对胚胎的影响。实验中还发现水流过大易击破卵膜, 过小又不能彻底清除有害生物, 水流大小对胚胎孵化效果的影响需要进一步研究。

日本米虾各阶段胚胎均能够离体孵化出幼体, 且所孵出的 Z I 幼体均能够发育至 Z II 幼体, 其与抱卵亲虾所孵出幼体的变态率无显著差异, 表明本研究所采用的胚胎离体孵化装置及操作对幼体质量无显著影响。因此, 本实验装置经过规模放大及适当的技术优化可以满足生产需求, 对抱卵过程中因亲体死亡而废弃的受精卵重新利用, 为虾蟹人工育苗技术创新提供参考。

3.3 温度对日本米虾胚胎离体孵化效果的影响

虾蟹类生长繁育中温度是重要环境因子, 不仅影响其抗逆能力(冯亚萍等, 2018)和生长性状(王明珠等, 2018), 更对胚胎发育起决定性作用, 但迄今有关温度对虾蟹离体胚胎发育及孵化效果影响的研究较少。本研究发现在 15.0℃~32.0℃ 范围内, 日本米虾的离体孵化胚胎孵化时间逐渐缩短, 15.0℃ 组孵化需要 (436.8±124.8) h, 而 32.0℃ 组缩短至 (228±88.8) h。在 15.0℃~29.0℃ 范围内, 孵化率也随着水温的升高而呈上升趋势, 但温度高于 29.0℃ 时, 孵化率和幼体的变态率会明显下降。已有研究表明, 在 19.0℃~31.0℃ 范围内, 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 胚胎发育时间随温度升高而缩短, 但高于 28.0℃ 时随着温度升高幼体存活率开始下降, 达到 36.0℃ 时幼体无法变态(梁俊平等, 2013)。这可能由于温度升高导致胚胎代谢加快, 机体发育时各组织器官发育又不完善, 造成各器官的衰竭。另外, 与机体代谢相关的酶及其他大分子物质的活性也均受到温度影响, 过高的温度可能会直接导致其功能受损。水生生物胚胎通常要达到一定的积温才能孵化, 本研究计算了日本米虾离体孵化的积温, 约为 637.5℃, 与锦绣龙虾的 642.4℃ 相近(梁华芳等, 2012), 但远高于一般虾蟹的 300.0℃~400.0℃(蔡生力等, 2006; 顾功超等, 1995)。人工繁育时应建立起孵化温度、孵化率和幼体质量间的平衡, 在保证胚胎正常发育和幼体质量的前提下, 参考积温数值, 利用温度调控胚胎发育时间, 以合理安排生产计划, 降低生产成本。

参 考 文 献

- Bao Y, Liu J, Lin SJ. Study on the breeding of in vitro embryo of mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Marine Sciences, 1999(1): 55-58 [鲍鹰, 刘军, 林少军. 中华绒螯蟹受精卵离体培育的初步研究. 海洋科学, 1999(1): 55-58]
- Cai SL, Chen Y. Research status of marine ornamental crustaceans. Scientific Fish Farming, 2006(1): 2-4 [蔡生力, 陈岩. 海洋观赏性甲壳类的研究现状. 科学养鱼, 2006(1):

- 2-4]
- Feng YP, Kong J, Luo K, *et al.* The difference of tolerance to white spot syndrome virus between *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* at different temperatures. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 120-127 [冯亚萍, 孔杰, 罗坤, 等. 不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑综合征病毒(WSSV)耐受性比较. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 120-127]
- Gao SJ. Characteristics and development prospect of several ornamental shrimp species. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2012(3-4): 129-131 [高淑娇. 几种观赏虾的特征特性及开发前景. *福建农业科技*, 2012(3-4): 129-131]
- Gu GC, Huang XX, Tan ZQ. Artificial hatching of isolated eggs of *Eriocheir sinensis* and its application. *Fishery Modernization*, 1995(5): 11-14 [顾功超, 黄旭雄, 谭正启. 中华绒螯蟹离体卵的人工孵化及其利用. *渔业现代化*, 1995(5): 11-14]
- Hamano T. Ecology of an atyid shrimp *Caridina japonica* (De Man, 1892) migrating to upstream habitats in the Shiwagi rivulet, Tokushima Prefecture. *Researches on Crustacea*, 1992, 21: 1-13
- Hayashi KI, Hamano T. The complete larval development of *Caridina japonica* De Man (Decapoda, Caridea, Atyidae) reared in the laboratory. *Zoological Science*, 1984, 1(4): 571-589
- Ji WJ. Fatty acids changes during larval development of *Penaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1996, 3(4): 28-34 [季文娟. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)幼体发育各阶段脂肪酸组成的研究. *中国水产科学*, 1996, 3(4): 28-34]
- Kang XJ, Sun TC, Wang SA. Preliminary study on the isolated culture of the fertilized egg and embryonic development of the *Macrobrachium nipponense* (Crustacea Decapoda). *Journal of Hebei University (Natural Science)*, 1996(4): 44-48 [康现江, 孙天才, 王所安. 日本沼虾受精卵的离体培养及其胚胎发育的初步观察. *河北大学学报(自然科学版)*, 1996(4): 44-48]
- Li F. Prospects for the development of freshwater ornamental shrimp. *Aquarium*, 2007(6): 52-55 [李帆. 淡水观赏虾开发展望. *水族世界*, 2007(6): 52-55]
- Liang HF, He JG. Study on the artificial propagation and embryonic development of *Panulirus ornatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(2): 236-245 [梁华芳, 何建国. 锦绣龙虾人工繁殖和胚胎发育的研究. *水生生物学报*, 2012, 36(2): 236-245]
- Liang JP, Li J, Li JT, *et al.* Effects of water temperature on the embryonic development, survival and development period of larvae of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) reared in the laboratory. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(4): 1142-1152 [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 不同温度对脊尾白虾胚胎发育与幼体变态存活的影响. *生态学报*, 2013, 33(4): 1142-1152]
- Liang JP. Study on the technology of artificial breeding and expression of genes involving in reproducing of *Exopalaemon carinicauda*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [梁俊平. 脊尾白虾全人工繁育及繁殖相关基因的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Liao YY, Li F, Dong XX. External morphological characteristics during the embryonic development of *Portunus pelagicus*. *Zoological Research*, 2011, 32: 657-662 [廖永岩, 李锋, 董学兴. 远海梭子蟹胚胎发育观察. *动物学研究*, 2011, 32: 657-662]
- Liao YY, Zhao LM. Hatching and larval culture of *in vitro* embryo of *Portunus pelagicus* under anti-fungus. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, 20(3): 363-370 [廖永岩, 赵丽梅. 抗真菌药物对远海梭子蟹离体胚胎(卵)孵化及幼体培育的影响. *台湾海峡*, 2001, 20(3): 363-370]
- Liu ZY. The early development and vitellin levels of the crayfish, *Procambarus clarkii*. Master's Thesis of Hebei University, 2009 [刘哲玉. 克氏原螯虾早期发育及卵黄蛋白含量的研究. 河北大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Sun SJ, Fan CG, Li FC, *et al.* Preliminary study on the conformation development of *Neocaridina denticulata sinensis*. *Hebei Fishery*, 2007(12): 22-25 [孙世杰, 范成功, 李凤超, 等. 中华锯齿米虾形态发育的初步研究. *河北渔业*, 2007(12): 22-25]
- Thlusty M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 2002, 205(3-4): 203-219
- Wang JQ, Liu J, Jiang JY, *et al.* Morphological observation of egg envelopes and pleopods and egg attachment in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*). *Chinese Journal of Fisheries*, 2006, 19(2): 32-36 [王吉桥, 刘晶, 姜静颖, 等. 中华绒螯蟹卵膜和腹肢的形态及卵附着机制. *水产学杂志*, 2006, 19(2): 32-36]
- Wang MZ, Meng XH, Kong J, *et al.* Evaluation of genetic parameters for growth and cold tolerance traits in *Fenneropenaeus chinensis* under low-temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 96-102 [王明珠, 孟宪红, 孔杰, 等. 低温胁迫条件下中国明对虾生长性状和耐低温性状的遗传参数评估. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 96-102]
- Xu CH, Xiao RY, Mu LL, *et al.* Observation on development of *Macrobrachium rosenbergii* embryos and influence of temperature on embryonic development. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(20): 112-117 [徐慈浩, 肖锐媛, 木亮亮, 等. 罗氏沼虾胚胎发育观察及温度对胚胎发育的影响. *广东农业科学*, 2015, 42(20): 112-117]
- Xue JZ, Du NS. Crustacea. Shanghai: Shanghai Education Publishing House, 2009 [薛俊增, 堵南山. 甲壳动物学. 上海: 上海教育出版社, 2009]
- Xue JZ, Zheng L, Chen ZF. Primary study of the embryo development of *Neocaridina denticulata sinensis*. *Journal of Hangzhou Teachers Colloge*, 1995(6): 79-83 [薛俊增, 郑

- 璐, 陈樟福. 中华新米虾胚胎发育的初步研究. 杭州师范大学学报, 1995(6): 79–83]
- Yan BL. Causes of the shedding of fertilized eggs and prevention measures. *China Fisheries*, 2002(7): 50–51 [阎斌伦. 河蟹受精卵脱落的原因与预防措施. 中国水产, 2002(7): 50–51]
- Zhang YJ, Cai SL, Liu H. Morphological observation of embryonic development of marine ornamental shrimp (*Lysmata amboinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 923–929 [张雅静, 蔡生力, 刘红. 海洋观赏虾类清洁虾胚胎发育的形态学观察. 中国水产科学, 2012, 19(6): 923–929]
- Zhao CY, Zhang YN. Industrialized exploitation and prospect of ornamental shrimp in China. *Chinese Fisheries Economics*, 2012, 30(1): 83–87 [赵朝阳, 张亚楠. 中国观赏虾的产业化开发及展望. 中国渔业经济, 2012, 30(1): 83–87]
- Zhou Z, Li ZY, Zhang LT, *et al.* The study on relationship of cumulative temperature and the sex gland development of sturgeon in artificial breeding condition. *Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 39(5): 65–68 [周洲, 李正友, 张龙涛, 等. 人工培育条件下鲟鱼性腺发育积温的研究. 贵州畜牧兽医, 2015, 39(5): 65–68]

(编辑 马瑾艳)

Embryonic Development of *Caridina japonica* and *in vitro* Incubation of Its Fertilized Eggs

CAO Linqun¹, QIN Zheng¹, JIANG Yusheng^{1①}, LIU Xin¹,
LI Xiaodong², LIN Yuan³, HUANG Kaitao¹, LIU Xu²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023;
2. Research and Development Center, Panjin Guanghe Crab Industrial Company Ltd, Panjin 124200;
3. Liaoning Provincial Aquatic Seeds Management Bureau, Dalian 116015)

Abstract In this study, *Caridina japonica* eggs at different developmental stages were incubated *in vitro* within a self-made incubator. The goal was to provide a reference for research on *C. japonica* reproductive biology and crustacean embryo *in vitro* hatching technology. The results showed that *C. japonica* fertilized eggs took about 25 days to hatch into larvae at a water temperature of 25.5°C and the developmental accumulated temperature reaches about 637.5°C. The embryonic development went through eight stages: Fertilized eggs, cleavage stage, blastula stage, gastrula stage, embryonized nauplius stage, embryonized metanauplius stage, embryonized protozoa stage, and embryonized zoea stage. The embryos at different developmental stages could hatch to zoea larvae and can develop normally. The maximum *in vitro* hatching rate was (80.7±2.4)% found in eggs at embryonized zoea stage, which was not significantly different from that observed in normal ovigerous females (79.1±4.9)%. The minimum *in vitro* hatching rate was (28.2±2.6)%, found in eggs at cleavage stage, which was significantly lower than that of normal ovigerous females. Water temperature had a marked effect on embryonic development using *in vitro* hatching method. Incubation time gradually decreased with increasing temperature at a range from 15.0°C to 32.5°C, i.e., where (436.8±124.8) h at 15.0°C, (228.0±88.8) h at 32.5°C. However, the metamorphosis rate from Z I to Z II began to decline when water temperature exceeded 29.0°C.

Key words *Caridina japonica*; Embryonic development; *In vitro* incubation; Temperature

① Corresponding author: JIANG Yusheng, E-mail: jys@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181015003

http://www.yykxjz.cn/

张延青, 秦菲, 费凡, 李笑天, 黄滨, 赵奎峰, 刘宝良. LED 光源在海水养殖水体中传播特征解析. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 153-161

Zhang YQ, Qin F, Fei F, Li XT, Huang B, Zhao KF, Liu BL. Analysis of propagation characteristics of LED light source in aquaculture water. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 153-161

LED 光源在海水养殖水体中传播特征解析*

张延青^{1,3#} 秦菲^{1,3#} 费凡^{1,4} 李笑天¹
黄滨¹ 赵奎峰⁵ 刘宝良^{1,2①}

(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. 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; 3. 青岛理工大学 青岛 266033; 4. 大连海洋大学 辽宁省水产设施养殖与装备工程技术研究中心 大连 116023; 5. 山东东方海洋科技股份有限公司 烟台 264000)

摘要 光是影响水生动物生长和发育的重要环境因子,其在养殖水体中的传播特征仍未明确。本研究选取红光(波峰为 645 nm)、绿光(510 nm)、蓝光(445 nm)、UVA(355 nm)以及全光谱(蓝光激发硅酸盐荧光粉辐射的白光波长范围可达 400~800 nm)5 种 LED 光源,调整辐射照度为 60 W/m²,研究其在不同养殖水质环境中的传播规律,为满足室内工厂化水产养殖对象的光生物学需求,实现养殖光环境标准化调控提供参考。结果显示,5 种不同光谱特征的 LED 光源在深井海水中的透光率随水深增加呈降低趋势,不同光源间变化趋势存在差异。当透光水深为 10 cm 时,绿光透光率最大,为(46.01±4.03)%,UVA 最小,为(26.01±2.53)%;当透光水深为 150 cm 时,各光色透光率均小于 1.5%;5 种不同光色的光源在水体中的透光率衰减曲线均符合乘幂函数。水体对 LED 光的吸收在不同的光谱区域是不同的,具有明显的选择性,水对光谱中红外部分的吸收最为强烈,对可见光谱波段中的红色、黄色和绿色光谱区段的吸收也十分显著;LED 光源在养殖水体中衰减严重,水深是影响 LED 光源在水体中传播的主要因素($P<0.01$),其次是总悬浮物(TSS)和化学需氧量(COD),但不同光源在养殖水体中受 TSS 和 COD 含量的影响程度不同。光在水体中的衰减由水对光的吸收以及散射作用引起,且光在不同波段的衰减率主要由水生介质的吸收光谱决定。

关键词 LED 光源; 养殖水体; 传播特征; 辐射照度; 透光率

中图分类号 Q89 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0153-09

光环境是设施水产养殖生产中最重要环境因素之一,在调控水生动物生长发育、行为及摄食,实现优质、高效生产等方面具有不可替代的作用(Moller *et al*, 1975; 钟志海等, 2014; Gehrke, 2010; Blaxter,

1968)。自 20 世纪 90 年代起,在设施渔业方面,挪威、苏格兰及日本等多国科技人员围绕光照影响鱼虾生理机能的影响研究逐渐增多,但主要针对传统光源的补光应用研究,没有实现光谱的精准化调控。LED

* 国家重点研发计划(2017YFB0404001)资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China [2017YFB0404001]. 张延青, E-mail: zyq_luck@163.com; 秦菲, E-mail: 15192490720@163.com

① 通讯作者: 刘宝良, 副研究员, E-mail: liubl@ysfri.ac.cn

#为共同第一作者

收稿日期: 2018-10-15, 收修改稿日期: 2018-11-14

光源具有光电转化效率高、光利用率高、可控性强、寿命长、节能效果好等优点,在农业、医学、生物等领域也有巨大的应用空间(任桂萍等, 2016; 杨其长等, 2011; 石志芳等, 2017)。

近年来,随着设施渔业的不断发展,LED光源在调控水产动物繁殖、生长及行为等方面的应用研究逐步增多。Sierra-Flores等(2016)研究发现,与红光相比,绿光和蓝光对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)有促进作用,但其在绿光照射下的成活率均最低。Blancovives等(2010)研究发现,不同LED光谱对于塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)仔鱼的变态过程有显著的调控作用。Guo等(2012)研究发现,从蓝光到绿光不同光谱区域的周期性波动可以促进凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的生长,并且这种周期性的光色波动可以用作对虾养殖中的光色调节模式。徐华兵等(2017)研究发现,水下LED光源可以增加凡纳滨对虾养殖水体中微藻生物量的积累,增强浮游植物群落的稳定性,同时也发现,LED光源对水质的稳定也发挥着积极作用。综上所述,LED光源对水产动物具有明显的调节作用,但经查阅大量相关研究报道,研究人员均采用了定点光源、定量光强和特定光谱,忽略了LED光源在养殖水环境中的传播特征。

光在水环境中传播的因素影响较多,如水深、悬浮物、有色可溶性有机物(CDOM)、叶绿素等(马绍赛, 2012; Christian *et al.*, 2003)。在开放水域中,杨顶田等(2003)研究发现,近紫外及蓝光在湖波中的衰减受悬浮质、叶绿素以及有色可溶性物质共同作用;张运林等(2004)通过分析太湖水体表层光学衰减系数与透明度、无机和有机颗粒物质之间的关系,发现太湖光学衰减系数变化的主要影响因子是无机及有机颗粒物;温少红(2001)通过研究光在螺旋藻培养液中的衰减规律,较好描述了螺旋藻培养液中光照强度、螺旋藻浓度及培养液深度之间的关系;徐明芳等(2001)研究发现,当光波长及光传播的路径确定时,光生物反应器中光衰减特征主要受培养物生物量浓度的影响。迄今为止,关于光源在养殖水环境中的传播特征的研究未见报道。

工厂化养殖具有集约化程度高、可控性强、受外界环境影响小等优点,已成为重要的水产养殖模式之一(沈明明等, 2017)。相较于池塘、网箱等传统开放式养殖模式,室内工厂化养殖对自然光线进行了隔绝或者阻拦,可控替代光源的开发以及光照策略的构建应用显得尤为重要。养殖水环境中影响LED光源传

播的因素相对复杂,LED光源在养殖水环境中的传播特征仍未明确。本研究利用地下深井海水和凡纳滨对虾工厂化养殖车间水体模拟养殖水环境,通过研制测量设备,利用直接测量法并进行数据统计分析,对不同光谱成分LED光源在养殖水环境中传播规律进行总结,以期为室内工厂化海水养殖动物的光生物学效应研究的开展和养殖光环境优化策略提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验装置

为避免外界光源交叉污染,准确测定LED光源在养殖水环境中传播特征,项目组研制了水环境光传播测定辅助装置,该实验装置主要由水位槽和测定槽两部分构成,其中,水位槽高2238 mm,外径315 mm,有效水深为2000 mm;测定槽高200 mm,水位槽和测定槽之间由1块高纯度石英片(纯度为99.99%,直径200 mm,厚15 mm)连接。石英片购自江苏省东海县昊天石英玻璃有限公司,经国家硅材料深加工产品质量监督检验中心检测,本实验所用石英片紫外光谱透射比为89.5%以上,可见光透光率可达99%以上。

1.2 实验设计

本实验选取红光(波峰为645 nm)、绿光(510 nm)、蓝光(445 nm)、UVA(355 nm)以及全光谱(400~800 nm)5种LED光源,调整辐射照度为60(W/m²),将深井海水和不同水质条件下养殖水体(凡纳滨对虾)以不同体积注入水环境光传播测定辅助装置,分别测量LED光源经过0、10、20、30、60、90、120和150 cm水深后的辐射照度,光源与水面之间的距离控制在5 cm左右(每次实验前进行充分混匀)。红光、绿光、蓝光和全光谱的辐射照度采用杭州远方光电信息股份有限公司PLA-20光照分析仪测定,UVA的辐射照度采用深圳市林上科技有限公司LS125多探头紫外辐照计测定。

1.3 水质指标

为获得不同水质条件实验用水,项目组利用深井海水对养殖水体(凡纳滨对虾)进行2倍、3倍和5倍稀释,并对实验水体的关键水质指标进行测定,包括总氨氮(Total ammonia nitrogen, TAN)、亚硝酸盐氮(Nitrite, NO₂-N)、化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)和总悬浮物(Total suspended solid, TSS),其中,TAN测定采用纳氏试剂分光光度法(闫修花等,

2004), $\text{NO}_2\text{-N}$ 测定采用萘乙二胺分光光度法(海洋监测规范 GB17378.7-2007), COD 测定采用烘箱加热高锰酸钾法(沈加正等, 2011), TSS 测定采用重量法(海洋监测规范 GB17378.7-2007)。

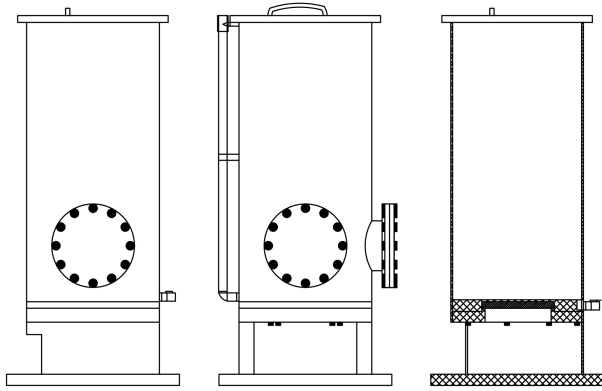


图 1 水环境光传播测定辅助装置

Fig.1 The diagram of auxiliary equipment for measurement of light propagation in water environment

1.4 数据处理

采用 SPSS 24.0 软件进行数据的统计分析, 利用单因素方差分析(One-way ANOVA)和多元回归分析研究不同光源在深井海水以及养殖水体中的传播规律。数据结果均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,

显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 水质测定结果

实验所用水体为深井海水以及凡纳滨对虾养殖池水, 实验用水的水色对比见图 2, 水质参数见表 1。

2.2 不同光源在深井海水中传播特征

实验结果显示, 5 种不同光谱特征的 LED 光源在深井海水中的透光率随水深增加呈降低趋势, 不同光源间变化趋势存在差异(图 3)。数据分析结果表明, 水深可显著影响 5 种不同光谱特征的 LED 光源透光率($P<0.01$), 当水深 ≤ 30 cm 时, 不同 LED 光源在相同水深的透光率存在显著差异; 当水深 >30 cm 时, 不同 LED 光源在相同水深的透光率无显著差异($P>0.05$)。当透光水深为 10 cm 时, 绿光透光率最大, 为(46.01 \pm 4.03)%, 其次为红光[(41.44 \pm 3.31)%]、蓝光[(36.46 \pm 2.30)%]、全光谱[(32.58 \pm 3.12)%], 透光能力最弱的为 UVA[(26.01 \pm 2.53)%], 且不同光源间透光率差异显著($P<0.05$)。水深在 10~30 cm 间, 辐照度衰减较快; 水深 >30 cm 时, 辐射照度衰减缓慢; 150 cm 水深下, 透光率均小于 1.5%。实验所用 5 种不同光色的光源在水体中的透光率衰减曲线均符合乘幂

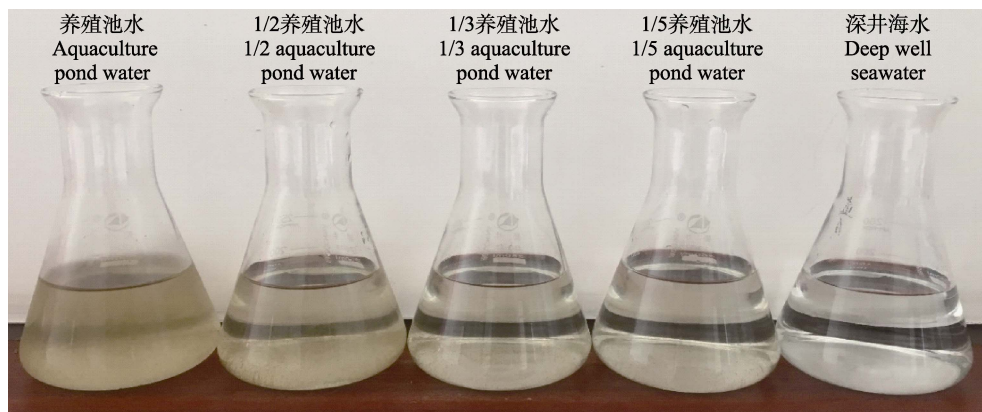


图 2 实验用水的水色对比

Fig.2 The comparison of experiment water color

表 1 实验用水水质参数
Tab.1 Water quality parameters of test water

实验用水 Test water	温度 T($^{\circ}\text{C}$)	总氮 TAN(mg/L)	亚硝态氮 $\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/L)	化学需氧量 COD(mg/L)	总悬浮固体 TSS (mg/L)
深井海水 Deep well seawater	25.20 \pm 0.32	0.09 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.35 \pm 0.08	0.78 \pm 0.12
养殖池水 Aquaculture pond water	25.15 \pm 0.22	0.90 \pm 0.08	0.69 \pm 0.11	6.68 \pm 0.13	123.53 \pm 12.37
1/2 养殖池水 1/2 aquaculture pond water	25.16 \pm 0.25	0.81 \pm 0.10	0.60 \pm 0.07	5.96 \pm 0.21	62.21 \pm 9.33
1/3 养殖池水 1/3 aquaculture pond water	25.20 \pm 0.12	0.75 \pm 0.09	0.57 \pm 0.05	5.6 \pm 0.15	39.72 \pm 7.23
1/5 养殖池水 1/5 aquaculture pond water	25.18 \pm 0.15	0.42 \pm 0.08	0.32 \pm 0.07	3.28 \pm 0.27	23.24 \pm 5.72

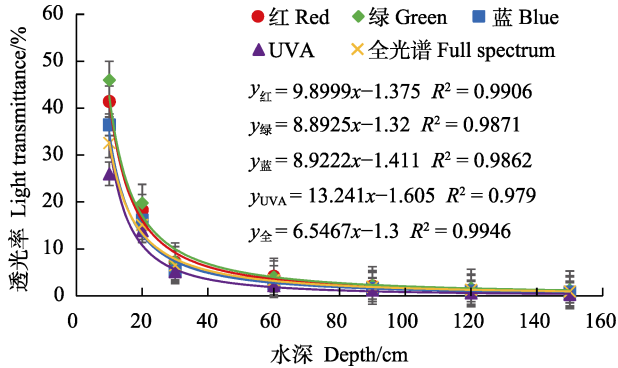


图3 不同LED光源在深井海水中的透光率随水深的变化
Fig.3 The variation of light transmittance of different light sources with depth of deep well seawater

函数。在深井海水中,随水深增大,红光、绿光和蓝光的波长范围基本保持不变(图4~图6);全光谱光源随水深增大,蓝光波长范围基本保持不变,红光波长范围减小,尤其对红外部分的吸收最为强烈(图7)。

2.3 LED光源在不同水质条件下的透光率与水深关联性

结果显示,5种不同光谱特征的LED光源在养殖水体中的透光率随水深增加呈降低趋势(图8)。数据分析结果显示,水深可显著影响5种LED光源透光率($P < 0.01$),当透光水深 ≤ 10 cm时,不同LED光

源在相同水深的透光率存在显著差异($P < 0.05$);水深 > 10 cm时,不同LED光源在相同水深的透光率无显著差异($P > 0.05$)。透光水深为10 cm时,红光透光率最大,为 $(16.55 \pm 2.55)\%$,其次为全光谱 $[(10.60 \pm 1.82)\%]$ 、绿光 $[(7.29 \pm 2.05)\%]$ 、蓝光 $[(4.18 \pm 3.41)\%]$,透光能力最弱的为UVA $[(0.84 \pm 2.83)\%]$,且不同光源间透光率差异显著($P < 0.05$)。当透光水深为30 cm,5种光源的透光率均 $< 1\%$;透光水深为120 cm,5种光源的透光率均为0。

养殖水体稀释2倍后,LED光源透光率随水深增加呈降低趋势(图9)。数据分析结果显示,水深可极显著影响5种LED光源透光率($P < 0.01$),透光水深 ≤ 20 cm时,不同LED光源在相同水深的透光率存在显著差异($P < 0.05$);透光水深为10 cm时,红光透光率最大,为 $(20.35 \pm 3.80)\%$,其次为全光谱 $[(15.89 \pm 2.32)\%]$ 、绿光 $[(14.84 \pm 3.46)\%]$ 、蓝光 $[(7.01 \pm 2.51)\%]$,透光能力最弱的为UVA $[(3.87 \pm 1.25)\%]$;透光水深为60 cm时,5种光源的透光率均 $< 1\%$ 。

养殖水体稀释3倍后,LED光源透光率亦呈随水深增加呈降低趋势(图10)。数据分析结果显示,水深可极显著影响5种LED光源的透光率($P < 0.01$),透

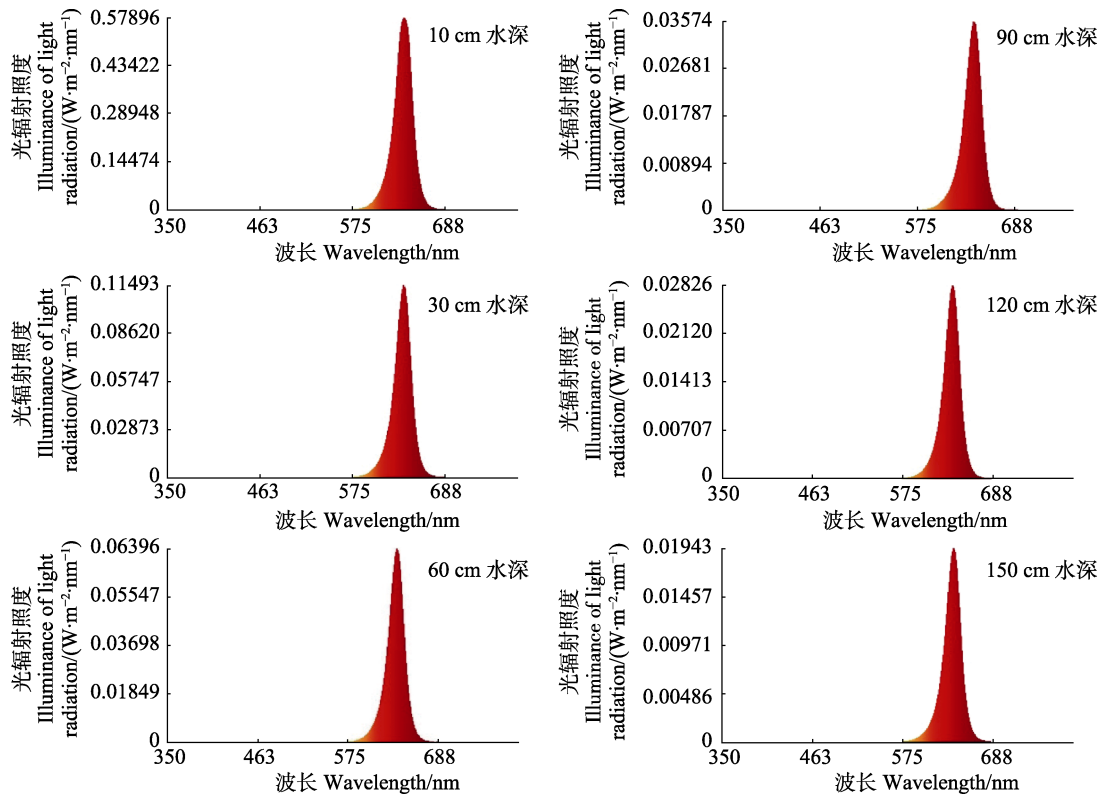


图4 深井海水中不同水深处红光的光谱曲线
Fig.4 The spectral curve of red light at different depths in deep well seawater

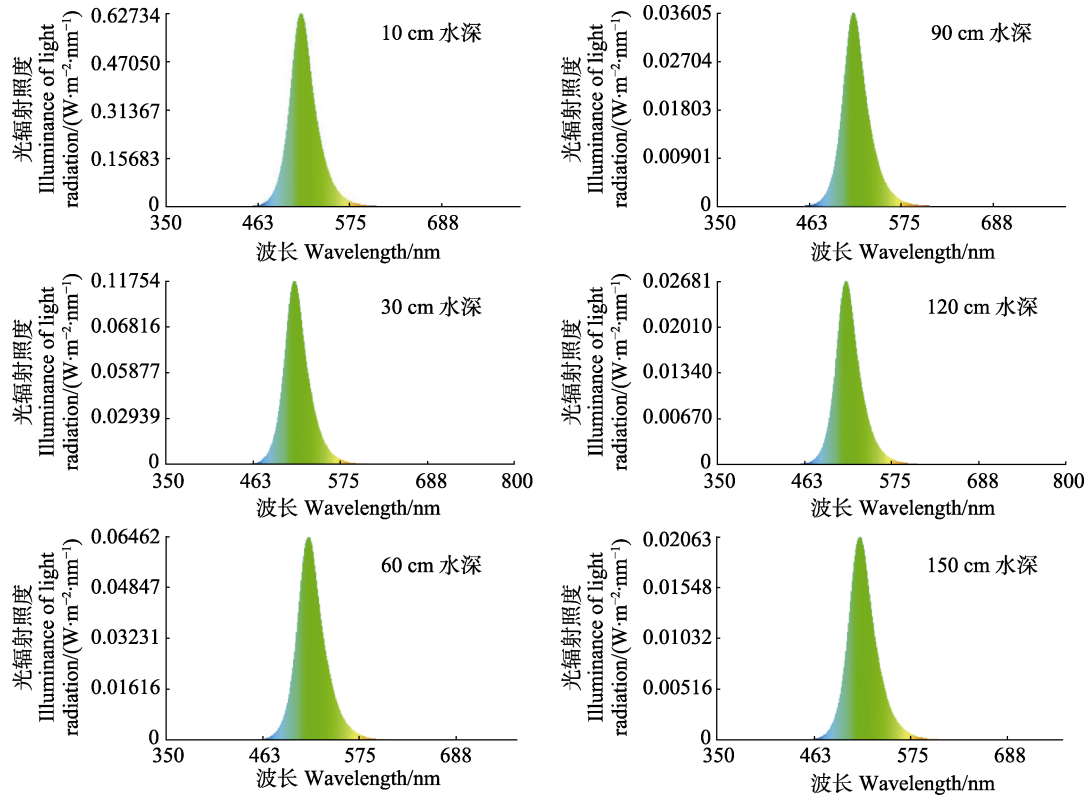


图 5 深井海水中不同水深处绿光的光谱曲线
Fig.5 The spectral curve of green light at different depths in deep well seawater

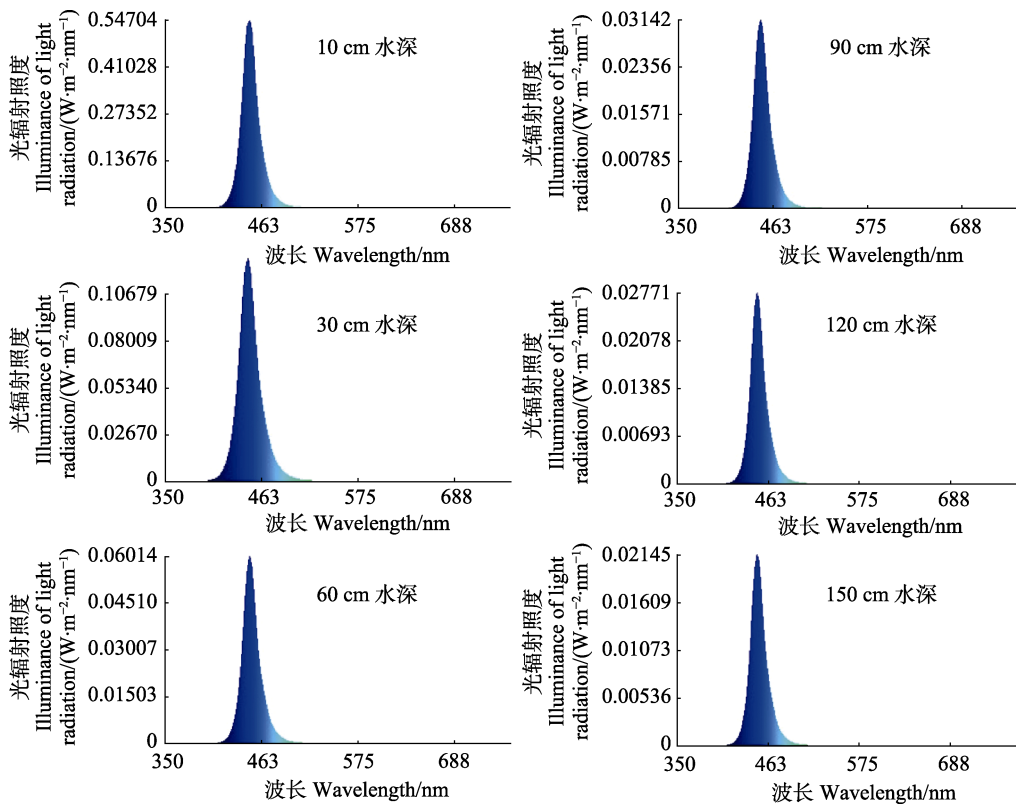


图 6 深井海水中不同水深处蓝光的光谱曲线
Fig.6 The spectral curve of blue light at different depths in deep well seawater

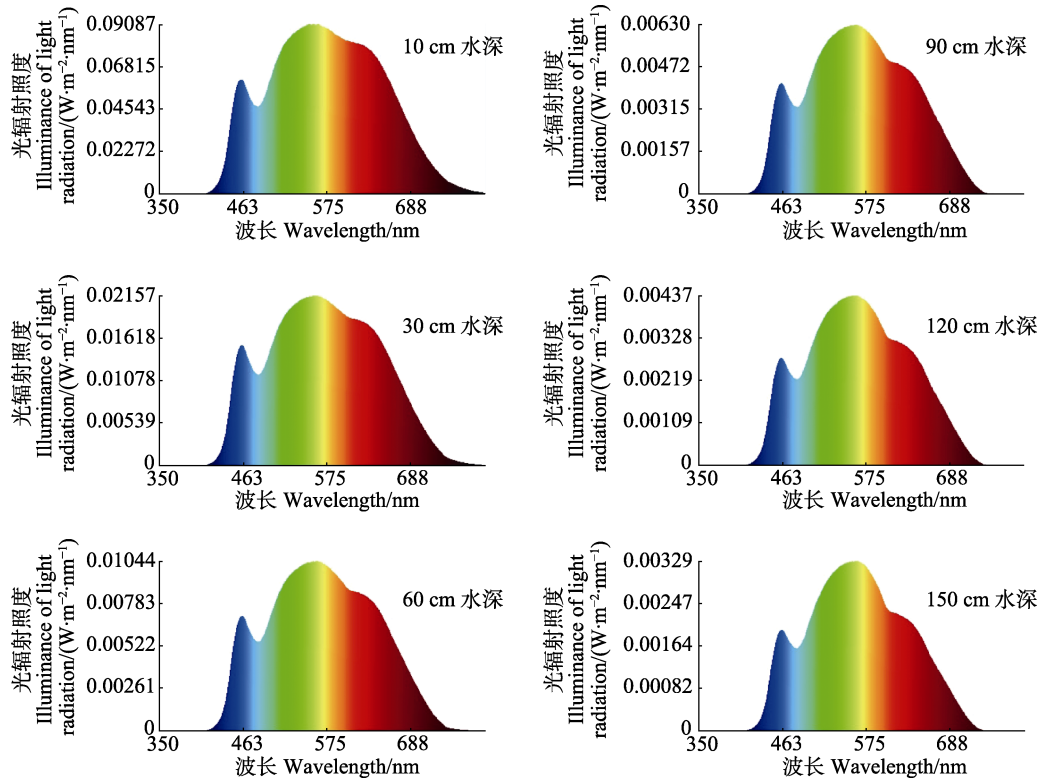


图 7 深井海水中不同水深处全光谱的光谱曲线

Fig.7 The full spectrum spectral curve at different depths in deep well seawater

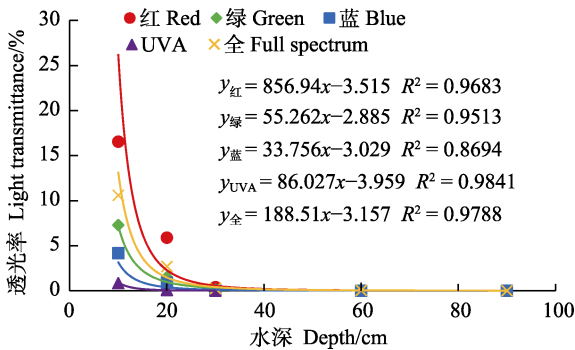


图 8 不同光源在养殖水体中的透光率随水深的变化

Fig.8 The variation of transmittance of different light versus the depth of aquaculture water

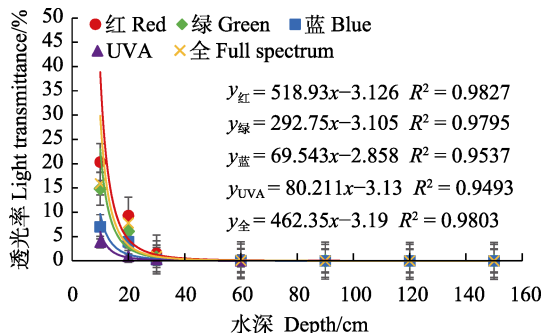


图 9 不同光源在稀释 2 倍养殖水体中的透光率随水深的变化

Fig.9 The variation of transmittance of different light versus the depth of aquaculture water diluted by 2 times

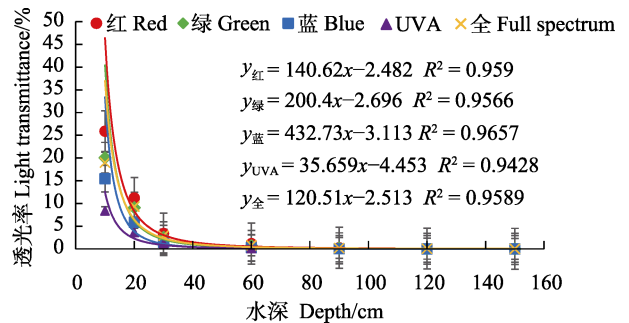


图 10 不同光源在稀释 3 倍养殖水体中的透光率随水深的变化

Fig.10 The variation of transmittance of different light versus the depth of aquaculture water diluted by 3 times

光水深 ≤ 20 cm 时,不同 LED 光源在相同水深的透光率存在显著差异($P < 0.05$);透光水深为 10 cm 时,红光透光率最大,为 $(25.91 \pm 4.53)\%$,其次为绿光 $[(20.05 \pm 3.43)\%]$ 、全光谱 $[(18.99 \pm 2.34)\%]$ 、蓝光 $[(15.46 \pm 2.90)\%]$,透光能力最弱的是 UVA,为 $(8.39 \pm 0.09)\%$;水深为 90 cm 时,5 种光源的透光率均 $< 1\%$ 。

养殖水体稀释 5 倍后,LED 光源透光率亦呈随水深增加呈降低趋势(图 11)。数据分析结果显示,水深可极显著影响 5 种 LED 光源透光率($P < 0.01$),透光水深小于等于 30 cm 时,不同 LED 光源在相同水深的透光率存在显著差异($P < 0.05$);透光水深为 10 cm

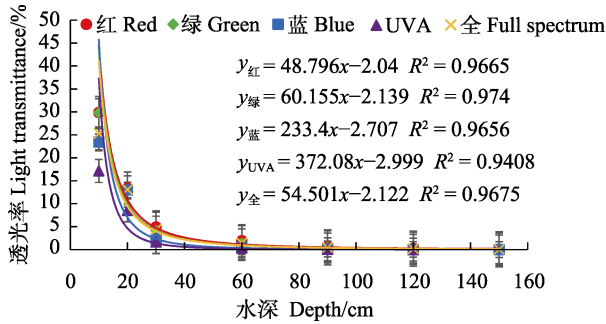


图 11 不同光源在稀释 5 倍养殖水体中的透光率随水深的变化

Fig.11 The variation of transmittance of different light versus the depth of aquaculture water diluted by 5 times

时, 红光透光率最大 $[(29.86 \pm 3.59)\%]$, 其次为绿光 $[(29.80 \pm 3.12)\%]$ 、全光谱 $[(25.31 \pm 3.87)\%]$ 、蓝光

$[(23.46 \pm 1.72)\%]$, 透光能力最弱的为 UVA $[(17.14 \pm 2.56)\%]$; 透光水深为 90 cm 时, 5 种光源的透光率均小于 1%。

2.4 水深、TSS 以及 COD 对 LED 光源在养殖水体中衰减效应的影响

在本实验水质条件下, LED 光在养殖水体传播过程中发生明显的衰减, 多元回归分析结果显示, 水深是影响 LED 光在水中衰减的主要因素($P < 0.01$), 其次是 TSS 和 COD, 但不同光源在养殖水体中的衰减率受 TSS 和 COD 影响的程度不同(图 12), 其中, 红光在养殖水体中的衰减率同 TSS 及 COD 含量关联度较低($P > 0.05$); 蓝光、绿光、UVA 及全光谱光源在养殖水体中的衰减率同 TSS 以及 COD 含量高度相关($P < 0.05$), 受影响程度为 $UVA > 蓝光 > 绿光 > 全光谱 > 红光$ 。

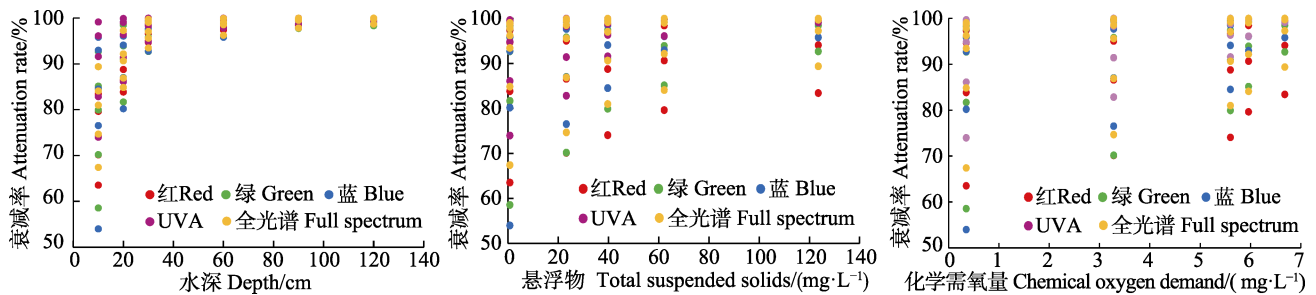


图 12 LED 光源在不同水深、TSS 以及 COD 含量的养殖水体中的衰减率

Fig.12 Attenuation rate of LED light in aquaculture water with different water depth, TSS and COD content

3 讨论

光的本质是一种能量物质, 具有波粒二象性, 它可以被几乎任何物质吸收掉。光在绝对真空环境中沿直线传播且能量不发生衰减, 但在水介质中, 光存在严重的衰减(孙传东等, 2000)。光在水体中的衰减是由水对光的吸收以及散射作用引起的。在清澈透明的海水中, 40%的衰减由吸收引起, 60%的衰减由散射作用引起(孙传东等, 2000)。研究表明, 水深可显著影响 5 种不同光谱特征的 LED 光源的透光率($P < 0.01$), 但当水深 > 30 cm 时, 不同 LED 光源在相同水深的透光率无显著差异($P > 0.05$); 我们推测这主要由于, 为满足养殖需求, 项目组选取的光源强度远低于自然光强, 且大部分能量已在起初的 30 cm 水体中衰减掉了。当透光水深为 10 cm 时, 绿光透光率最大, 推测这是绿光在水体中穿透特性和能量属性综合作用的结果。水对光的吸收在不同的光谱区域是不同的, 具有明显的选择性。本研究发现, 水对光谱中的红外部分的吸收最强, 对可见光谱波段中的红色、黄色和淡绿色光谱区段的吸收也十分显著。

光在不同波段的衰减率主要由水生介质的吸收光谱决定。通常, 与海洋水域相比, 淡水中的蓝光衰减更快, 这是由于内陆水域中的悬浮物质更多。在内陆水域中, 通常绿光的穿透性更强, 其次是红光。然而, 当悬浮物质的浓度很高时, 红光的穿透性可以和绿色一样快, 而且悬浮物质的浓度越高, 红光的穿透性越好(Falkowski, 1987)。本研究结果同样显示, 在养殖水体中, 红光的穿透性远远大于绿光以及蓝光, 且随着养殖水体稀释倍数的增大, 红光的穿透性接近蓝光与绿光, 这是由于养殖水体中粪便、残饵等溶蚀, 导致海水中悬浮物质增多, 进而影响光在水体中的穿透性。

本研究发现, 水深是影响 LED 光源在水体中传播的主要因素, 其次是 TSS 和 COD, 但不同光源在养殖水体中受 TSS 和 COD 含量的影响程度不同。光在不同水体中的传播特征差异显著, 一般来说, 在热带太平洋中的非生产性的海洋水域, 水本身是主要的吸收体, 蓝色和绿色的光的深度和广度都是相同的, 然而, 对于红光来说, 水的吸收非常强烈, 衰减得更快(Falkowski, 1987)。在生产性上升流海洋水域, 由于浮游植物中色素的吸收, 蓝光比绿光衰减的更多,

但仍然不如红光。在沿海水域,其中含有更多的黄色物质和浮游植物,绿光则更具穿透性。然而,仅在深颜色的沿海水域,由于受到主要河流流量影响,蓝光衰减强度与红光一样(Falkowski, 1987)。本研究仅针对 5 种不同波长的光源在纯净海水以及凡纳滨对虾养殖水体中的传播规律进行研究,为凡纳滨对虾工厂化养殖体系提供相关光照数据,以及为优化室内养殖工厂光环境问题和实现光环境在工厂化养殖模式中的良好应用提供科学参考。

参 考 文 献

- Blaxter JHS. Visual thresholds and spectral sensitivity of herring larvae. *Journal of Experimental Biology*, 1968, 48(1): 39–53
- Blancovives B, Villamizar N, Ramos J, *et al.* Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 2010, 306(1): 137–145
- Christian D, Sheng YP. Relative influence of various water quality parameters on light attenuation in Indian River Lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2003, 57(5–6): 961–971
- Falkowski PG. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Kirk JTO. *Quarterly Review of Biology*, 1987, 62(1): 110–110
- Gehrke P. Influence of light intensity and wavelength on phototactic behaviour of larval silver perch *Bidyanus bidyanus* and golden perch *Macquana ambigua* and the effectiveness of light traps. *Journal of Fish Biology*, 2010, 44(5): 741–751
- Guo B, Mu Y, Wang F, *et al.* Effect of periodic light color change on the molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2012, s362–363: 67–71
- Moller TH, Jones DA. Locomotory rhythms and burrowing habits of *Penaeus semisulcatus*, (de Haan) and *P. monodon*, (*Fabricius*) (Crustacea: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1975, 18(1): 61–77
- Ma SS. Analysis and research prospects of ecological damage of suspended solids in water. Abstracts of papers of 2012 academic annual meeting of marine environmental protection professional committee of Chinese society of Environmental Sciences, 2012 [马绍赛. 水体悬浮物的生态损害分析与研究展望. 中国海洋湖沼学会水环境分会中国环境科学学会海洋环境保护专业委员会 2012 年学术年会论文摘要集, 2012]
- Ren GP, Wang XJ, Zhu GF. Effects of different light quality LEDs on the proliferation and rooting of *Phalaenopsis*. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 51(1): 81–88 [任桂萍, 王小菁, 朱根发. 不同光质的 LED 对蝴蝶兰组织培养增殖及生根的影响. *植物学报*, 2016, 51(1): 81–88]
- Shi ZF, Xi L, Ji ZZ, *et al.* LED light source improves the environment of the house and the performance of broiler production. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2017, 33(24): 222–227 [石志芳, 席磊, 姬真真, 等. LED 光源改善鸡舍环境及肉鸡生产性能. *农业工程学报*, 2017, 33(24): 222–227]
- Sierra-Flores R, Davie A, Grant B, *et al.* Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture*, 2016, 450(2): 6–13
- Shen MM, Li J, Wang YQ, *et al.* Analysis of community characteristics of microalgae in the industrialized culture system of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 64–72 [沈明明, 李健, 王清印, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 工厂化养殖系统微藻的群落特征分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 64–72]
- Shen JZ, Hou SS, Liu Y, *et al.* Study on determination method of oxygen oven in seawater by chemical oxygen demand. *Marine Sciences*, 2011, 35(8): 1–4 [沈加正, 侯沙沙, 刘鹰, 等. 海水化学需氧量烘箱加热测定方法的研究. *海洋科学*, 2011, 35(8): 1–4]
- Sun CD, Chen LY. Optical properties of water and its effects on underwater imaging. *Journal of Applied Optics*, 2000, 21(4): 39–46 [孙传东, 陈良益. 水的光学特性及其对水下成像的影响. *应用光学*, 2000, 21(4): 39–46]
- Wen SH. Study on light attenuation law of *Spirulina* culture solution. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(4): 93–97 [温少红. 螺旋藻培养液光衰减规律的研究. *海洋通报*, 2001, 20(4): 93–97]
- Xu HB, Wang LL, Zeng QH, *et al.* The effect of underwater LED on the environmental factors of water and community composition of phytoplankton. *Ecological Science*, 2017, 36(5): 104–113 [徐华兵, 王龙乐, 曾权辉, 等. 水下 LED 光照对凡纳滨对虾养殖水体环境因子和浮游植物群落变化的影响. *生态科学*, 2017, 36(5): 104–113]
- Xu MF, Zhou ZY, Qu DH. Light attenuation characteristics and growth kinetics of spirulina in photobioreactor. *Marine Sciences*, 2001, 25(11): 32–37 [徐明芳, 周远志, 区德洪. 光生物反应器中光衰减特征与螺旋藻生长动力学研究. *海洋科学*, 2001, 25(11): 32–37]
- Yang QC, Xu ZG, Chen HD, *et al.* Application principle and technology progress of LED light source in modern agriculture. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(5): 37–43 [杨其长, 徐志刚, 陈弘达, 等. LED 光源在现代农业的应用原理与技术进展. *中国农业科技导报*, 2011, 13(5): 37–43]
- Yang DT, Chen WM, Wu SC, *et al.* Effects of colored soluble matter in lakes on near-ultraviolet and blue-light attenuation. *Journal of Lake Sciences*, 2003, 15(3): 269–274 [杨顶田, 陈伟民, 吴生才, 等. 湖泊中有色可溶性物质对近紫外及蓝光衰减的影响. *湖泊科学*, 2003, 15(3): 269–274]
- Yan XH, Wang GZ, Chen DJ. Direct determination of ammonia nitrogen in seawater by Nessler's reagent colorimetry. *Environmental Monitoring in China*, 2004, 19(6): 8–10 [闫修花, 王桂珍, 陈迪军. 纳氏试剂比色法直接测定海水中的氨氮. *中国环境监测*, 2004, 19(6): 8–10]

Zhong ZH, Huang ZJ, Chen WZ. Effects of different environmental factors on the growth and biochemical composition of *Heterophyllum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 98–104 [钟志海, 黄中坚, 陈伟洲. 不同环境因子对异枝江蓠的生长及生化组分的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 98–104]

Zhang YL, Qin YL, Chen WM, *et al.* Characteristics and parameterization of optical attenuation coefficient of Taihu Lake. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(3): 209–213 [张运林, 秦伯强, 陈伟民, 等. 太湖水体光学衰减系数的特征及参数化. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 209–213]

(编辑 冯小花)

Analysis of Propagation Characteristics of LED Light Source in Aquaculture Water

ZHANG Yanqing^{1,3}, QIN Fei^{1,3}, FEI Fan^{1,4}, LI Xiaotian¹,
HUANG Bin¹, ZHAO Kuifeng⁵, LIU Baoliang^{1,2①}

(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, Key Laboratory of Marine Fish Seed Engineering and Biotechnology, Qingdao 266071; 2. Marine Science and Technology Pilot National Laboratory (Qingdao), Function Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071; 3. Qingdao University of Technology, Qingdao 266033; 4. Dalian Ocean University, Liaoning Provincial Aquatic Facilities Breeding and Equipment, Dalian 116023; 5. Shandong Oriental Ocean Sci-Tech Co., Ltd, Yantai 264000)

Abstract Light is an important environmental factor affecting the growth and development of aquatic animals, and its propagation characteristics in aquaculture waters are still unclear. In this experiment, five light emitting diode (LED) light sources were selected: red (peak at 645 nm), green (510 nm), blue (445 nm), UVA (355 nm), and full spectrum (the wavelength of white light emitted by blue light excited silicate phosphor can reach λ 400–800 nm). The radiation irradiance was adjusted to 60 W/m², and the propagation law of irradiance was studied under different breeding water quality environments to provide references in order to meet the photobiological requirements of indoor factory aquaculture and the standardization control of aquaculture environment. The experimental results showed that the transmittance of five different LED light sources decreases with the increase in water depth. The variation trends of different light sources were different. When the water depth was 10 cm, the green light showed the largest transmittance (46.01%±4.03%), whereas UVA showed the lowest value (26.01%±2.53%). When the water depth was 150 cm, the light transmittance of all five light sources was less than 1.5%. The attenuation curves of light transmittance in water of five different light colors all agree with power function. The absorption of LED lights by water was discrepant in different spectral regions and has obvious selectivity. Most of the infrared and ultraviolet parts of the spectrum were absorbed by water. The absorption of the red, yellow, and green spectra in the visible spectrum band is also significant. LED light is severely attenuated in aquaculture water, and water depth is the main factor affecting LED light propagation ($P<0.01$), followed by total suspended solids (TSS) and chemical oxygen demand (COD). However, the extent to which different light sources are affected by TSS and COD content in aquaculture water varies. The attenuation of light in water is caused by the absorption and scattering of light by water, and the attenuation rate of light in different wave bands is mainly determined by the absorption spectrum of aquatic media.

Key words Light source; Aquaculture water; Propagation characteristics; Irradiance; Transmittance

① Corresponding author: LIU Baoliang, E-mail: liubl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181207001

http://www.yykxjz.cn/

魏平平, 李鑫, 张俊鹏, 费凡, 马贺, 高东奎, 宋昌斌, 陈涛, 刘鹰. LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 162-168

Wei PP, Li X, Zhang JP, Fei F, Ma H, Gao DK, Song CG, Chen T, Liu Y. Effects of LED spectra on morphological character and gene expression of growth in *Takifugu rubripes* larvae. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 162-168

LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响*



魏平平^{1,3} 李鑫^{1,3} 张俊鹏^{1,3} 费凡^{1,3} 马贺^{1,3}
高东奎^{1,3} 宋昌斌⁴ 陈涛⁵ 刘鹰^{1,2,3①}

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 青岛 266000;

3. 辽宁省水产设施养殖与装备工程研究中心 大连 116023; 4. 中国科学院半导体研究所 北京 100083;

5. 深圳市超频三科技股份有限公司 深圳 518000)

摘要 设置 4 种 LED 光谱环境, 分别为蓝(λ_{450} nm)、绿(λ_{525} nm)、黄(λ_{590} nm)和白($\lambda_{400-780}$ nm), 水温控制在(22±1)°C, 光周期为 16L:8D, 光强设为 200 mW/m²。研究光谱对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)受精卵孵化和孵化后 1~18 d (即实验第 6~23 天)仔稚鱼形态性状(全长、体长、躯干长、尾长、头长、眼径和体高)以及生长相关基因, 包括生长激素(*GH*)、生长激素受体 1 型(*GHRI*)、类胰岛素生长因子 1 型(*IGF1*)基因相对表达量的影响。结果显示, 蓝、绿、黄光处理组的受精卵比白光处理组早 2 d 孵化; 在实验结束时, 蓝光处理组中, 仔稚鱼的全长、体长、躯干长和尾长生长最快, 黄光处理组中, 头长、眼径和体高生长最快。对于生长相关基因, 蓝光下的 *GH* 基因表达量显著高于黄、白光组($P < 0.05$), 但与绿光组无显著性差异; 不同光谱下, *GHRI*、*IGF1* 基因的表达量无显著性差异。结果表明, 蓝光、绿光和黄光促进红鳍东方鲀受精卵的孵化, 蓝光有利于红鳍东方鲀仔稚鱼的生长发育。本文研究了不同光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼早期发育的形态性状及生长相关基因表达的影响, 为养殖厂对红鳍东方鲀育苗提供科学的参考依据。

关键词 LED 光谱; 红鳍东方鲀仔稚鱼; 形态性状; 生长相关基因的表达

中图分类号 S965.335 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0162-07

光(光周期、光强、光谱)作为重要的环境因子之一, 对许多重要硬骨鱼类的胚胎发育、孵化和摄食有重要影响, 包括奇努克三文鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)和比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus*) (Dey *et al*, 1990; Helvik *et al*, 1993、2010; Mangor-Jensen *et al*, 1995)等。在自然海域中, 光随海水的深

度增加而快速衰减, 光谱成分也发生了极大的改变, 红色光谱在浅水域占优势, 而蓝色光谱能量较高, 在深水域占据主导地位(Tyler, 1968)。随着光电材料科技的发展, 发光二极管(LED)在水产中逐步开始应用, 相比于传统的灯具, LED 灯具有发光效率高、耗电量少、安全环保无污染等优点。但 LED 的一些光特性(光

* 国家重点研发计划项目(2017YFB0404000)资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program (2017YFB0404000)]. 魏平平, E-mail: 335613556@qq.com

① 通讯作者: 刘鹰, 教授, E-mail: yingliu@dlou.edu.cn

收稿日期: 2018-12-07, 收修改稿日期: 2019-01-02

强、光谱、光周期)对硬骨鱼类的生长、摄食、繁殖的影响还知之甚少(Villamizar *et al*, 2009)。已有一些研究表明,光影响水产鱼类受精卵孵化、存活和生长发育(Puvanendran *et al*, 2002; Yosedra *et al*, 2008)。另外,不适宜的光强或光谱对硬骨鱼类的早期发育产生影响,导致骨骼发育不全、游泳能力丧失(Battaglione *et al*, 1990; Trotter, 2003)。因此,研究光对硬骨鱼类的影响可为养殖业提供科学的参考依据。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是亚洲地区(韩国、日本和中国)的重要养殖经济鱼种。目前,有关光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼生长影响的研究甚少,本研究探究 LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达量的影响,为养殖厂对红鳍东方鲀育苗提供科学的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用卵取自河北天正实业有限公司人工饲养亲鱼的自然产卵,产卵当日,受精卵空运至大连海洋大学水产设施养殖与装备工程研究中心,放置于实验系统中立即进行光照实验。

1.2 实验方法

实验于 2018 年 3 月 16 日开始,采用遮光布遮挡自然光,采用 4 种 LED 光谱灯(深圳市超频三科技股份有限公司),分别为蓝(λ_{450} nm)、绿(λ_{525} nm)、黄(λ_{590} nm)、白($\lambda_{400-780}$ nm),每种光谱设置 2 个平行,养殖桶采用圆型桶(直径为 80 cm,水深为 60 cm),水体约 250 L(10 粒卵/L),水温为(22±1)°C,光周期为 16L:8D,光强为 200 mW/m²,每天 08:30 采用 SRI-2000-UV 光谱照度计(尚泽股份有限公司)于水面 5 cm 处测定并校准。实验第 6 天,受精卵开始孵化,

孵化后的仔鱼开口后,按生长期分别投喂轮虫(*Rotifer*)(约 10 个/ml)、卤虫(*Artemia*)(约 5 个/ml),从受精卵孵化出仔鱼开始取样,在实验第 6、7、8、9、12、13、14、15、18、21、23 天的 09:00 取样,每次随机取 15~20 尾,用戊二醛保存,采用 9SMZ 745T/SMZ1000 高级体视显微镜[尼康映像仪器销售(中国)有限公司]测量全长、体长、躯干长、尾长、头长、眼径和体高。在实验第 23 天,每个处理组取 30 尾仔稚鱼保存于-80°C 冰箱,用于测定生长相关基因的相对表达量。

1.3 总 RNA 的提取和生长相关基因表达量的测定

将冻存样品取出后,按照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(BBI, A606695)的操作说明书进行总 RNA 的提取。利用微量分光光度计(SMA4000, Merinton)测定 RNA 样品的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值判断总 RNA 纯度;1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

根据 RevertAid Premium Reverse Transcriptase 试剂盒(Thermo ScientificTM, EP0733)操作说明书,将提取的总 RNA 进行反转录扩增,获得 cDNA。反转录产物于-20°C 保存备用,使用 LightCycler480 II (BBI, Roche, 德国)仪器和 SG Fast qPCR Master Mix(2×) (BBI, Roche, 德国)试剂盒进行 Real-time quantitative PCR 实验。根据 GenBank 已有的红鳍东方鲀 *GHR1*、*IGF1*、*SSI*、*GH* 和 β -actin 基因的序列,采用 Primer 5 软件设计引物,引物序列见表 1。经多次测定, β -actin 表达比较稳定,故选为内参基因。PCR 反应条件:95°C 预变性 3 min,95°C 变性 3 s,60°C 退火/延伸 30 s,共 45 个循环;实验结束后对溶解曲线进行分析。所有 PCR 过程中,生物学样品为 3 个平行,每个 RNA 样品均设有 3 个重复。采用 RT-PCR (2^{- $\Delta\Delta C_t$}) 相对荧光定量法对生长相关的基因进行计算。

表 1 定量 PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequence for real-time quantitative PCR

基因 Gene	序列 Sequence (5'~3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>GH</i>	F: CTCATCAAGGCCAGTCAGGAT R: CTCCACCTTGTGCATGTCCT	XM_003968318
<i>GHR1</i>	F: TTGGGTCAACACGGACTTCT R: CTTCAGGATCTTTTGCCTTCTT	XM_011615550.1
<i>IGF1</i>	F:GGCAAACAGCGTGAATGAG R:TCAACACGGAAGCCAGGA	AB465576.1
β -actin	F:AGAGGGAAATCGTGCGTGAC R:GAGGAAGGAAGGCTGGAAAAG	XM_003964421.2

1.4 数据分析

所有数据均以平均值±标准误(Mean±SE)表示,使用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 来检验不同处理组间基因表达量的差异, $P < 0.05$ 为差异显著,分析所得数据使用 Origin 2017 软件进行绘图。

2 结果

2.1 光谱对红鳍东方鲀受精卵孵化的影响

从实验结果得知,在实验第 6 天,蓝、绿、黄光处理组的受精卵开始孵化,白光处理组的受精卵在第

8 天开始孵化(表 2)。白光处理组的受精卵与其他光色相比,孵化出仔鱼延缓了 2 d。

2.2 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状的影响

在孵化后第 6、7 天,不同光谱下初孵仔稚鱼全长未出现显著性差异,但蓝光组仔稚鱼全长平均值高于绿、黄光组。在随后的生长过程中,白光组仔稚鱼全长始终低于其他光照组。在第 17 天,黄光组仔稚鱼全长显著高于蓝、白光组($P < 0.05$),但蓝光组出现快速生长,在第 20 天,蓝、黄光处理组仔稚鱼的全长显著高于绿、白光组($P < 0.05$),在第 23 天,各处理组之间无显著性差异,但蓝光处理组仔稚鱼的全长最大。

表 2 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼全长的影响
Tab.2 The effect of spectra on the total length of *Takifugu rubripes*

实验时间 Experimental time (d)	全长 Total length			
	蓝 Blue (λ_{450} nm)	绿 Green (λ_{525} nm)	黄 Yellow (λ_{590} nm)	白 White ($\lambda_{400-780}$ nm)
1~5	—	—	—	—
6	2.801±0.026	2.725±0.037	2.729±0.025	—
7	2.750±0.020	2.814±0.022	2.780±0.023	—
8	2.960±0.020 ^b	3.038±0.022 ^a	2.859±0.037 ^c	2.925±0.024 ^{bc}
9	3.097±0.025 ^a	3.097±0.025 ^a	3.058±0.032 ^{ab}	2.984±0.025 ^b
10	3.081±0.028 ^{ab}	3.001±0.035 ^a	3.083±0.020 ^{ab}	3.095±0.030 ^a
11	3.123±0.026 ^{ab}	3.094±0.045 ^a	3.198±0.030 ^b	3.150±0.036 ^{ab}
12	3.258±0.039	3.232±0.039	3.253±0.034	3.203±0.028
13	3.320±0.030 ^a	3.235±0.034 ^{ab}	3.199±0.025 ^b	3.119±0.052 ^c
14	3.340±0.044	3.337±0.040	3.335±0.036	3.306±0.037
17	3.195±0.033 ^c	3.324±0.047 ^{ab}	3.412±0.027 ^a	3.266±0.040 ^{bc}
20	3.373±0.047 ^a	3.157±0.054 ^b	3.363±0.048 ^a	3.068±0.074 ^b
23	3.542±0.055	3.399±0.068	3.469±0.165	3.189±0.196

注:数据均表示为平均值±标准误(Mean±SE) ($n=15$);相同字母代表各处理组间无显著性差异($P > 0.05$),不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$),下同

Note: Values are expressed as Mean±SE ($n=15$). The same letter indicates no significant difference between the treatment groups ($P > 0.05$), and different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$), the same as below

第 6 天,不同光谱组体长未出现显著性差异,7 d 时,绿光组的仔稚鱼体长与蓝光组出现显著性差异($P < 0.05$),7、8 d,黄光组体长显著高于绿光组($P < 0.05$)。同样,17 d 后,蓝光组体长生长较快,在 22 d 时显著高于绿光、白光组($P < 0.05$)。23 d,蓝光组的体长平均值达到最高,但与其他光谱组相比,无显著差异,白光组仔稚鱼体长变化情况与全长相似。

第 6 天,蓝光组红鳍东方鲀仔鱼头长与绿、黄光组出现显著性差异($P < 0.05$),7 d 时,不同光谱处理组的差异不显著,在第 11 天,黄光组与蓝、绿光组无显著性差异,但与白光组差异性显著($P < 0.05$)。在第

17 天,蓝、绿、黄光组显著高于白光组($P < 0.05$)。在第 23 天时,黄光组的头长最大。

在实验第 6 天时,绿光处理组仔稚鱼的躯干长与蓝、黄处理组出现显著性差异($P < 0.05$),第 8~11 天,仔鱼的躯干长逐渐减小,而黄光组仔稚鱼的躯干长从第 7 天开始逐渐增长,在第 10 天时,黄光组的躯干长显著高于绿光组($P < 0.05$);17 d 后,白光组与绿光组无显著性差异,第 23 天,蓝光组下仔稚鱼的躯干长最大。

在 6、7 d 时,不同光谱下仔稚鱼的尾长无显著性差异,在第 8 天,蓝、白光谱下的尾长与绿光组出

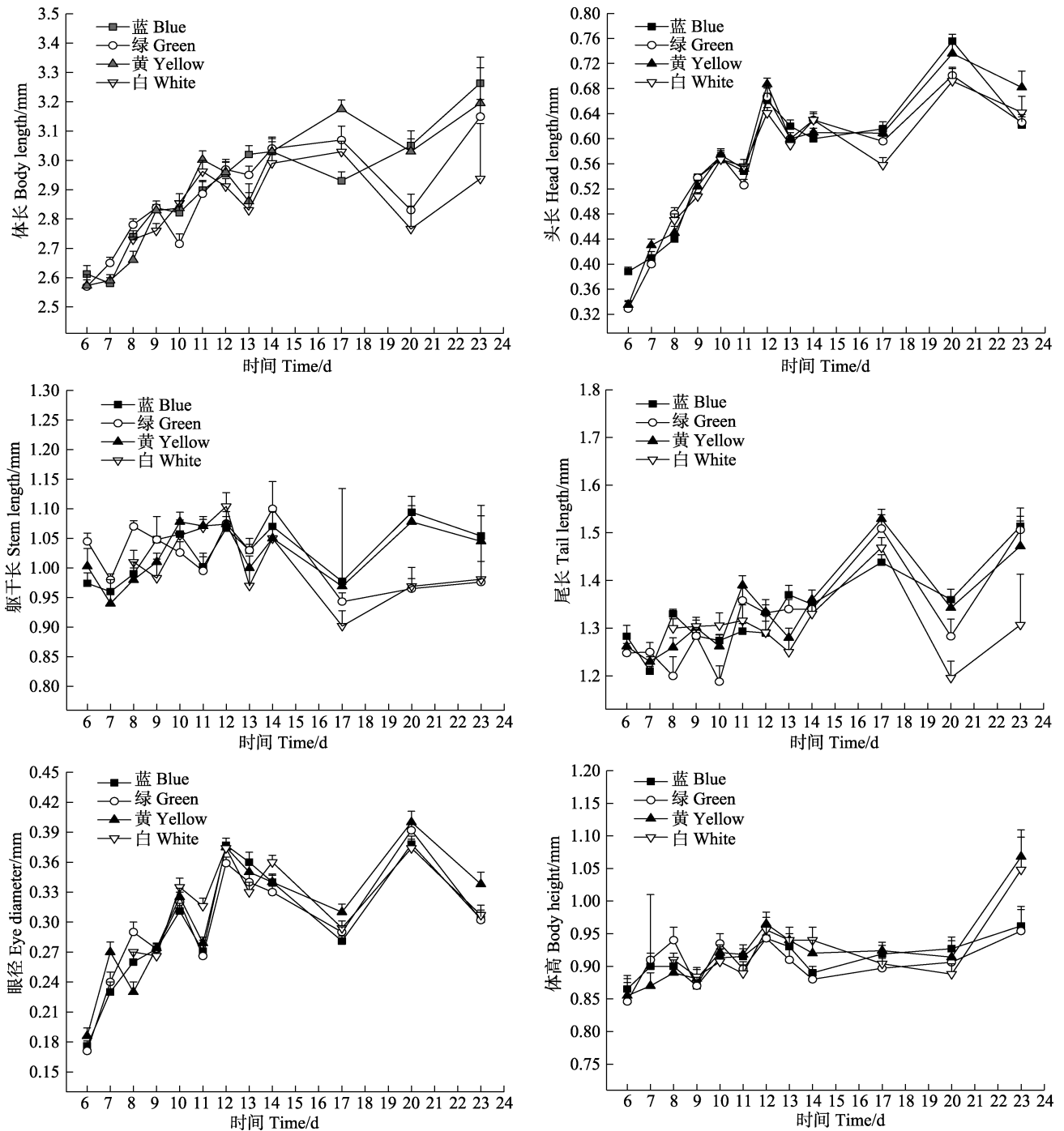


图 1 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状的影响

Fig.1 The effect of spectra on the morphological character of *Takifugu rubripes*

现显著性差异($P < 0.05$), 8 d 时, 蓝、黄、白光组显著高于绿光组($P < 0.05$), 20、23 d, 蓝、绿、黄组之间无显著性差异, 且平均值都高于白光组。

在不同光谱下初孵仔稚鱼眼径无显著性差异, 在第 7、8 天, 绿光组显著高于蓝光组($P < 0.05$)。在第 9、10 天, 各处理组无显著性差异。11 d 后, 不同光谱下的眼径呈现不规则的“M”型趋势, 在第 17 天后,

黄光组下的眼径一直高于其他处理组。

对于红鳍东方鲀仔稚鱼的体高, 仅在 8、14、23 d 时, 不同处理组之间出现显著性差异。在第 8 天, 绿光组显著高于黄光组($P < 0.05$), 与蓝、白光组无显著性差异。14 d, 白光组显著高于蓝、绿光组($P < 0.05$), 但与黄光组无显著性差异; 第 23 天, 黄光组与绿光组有显著性差异($P < 0.05$), 与蓝、白光组无显著性差异。

2.3 光谱对红鳍东方鲀生长相关基因表达量的影响

不同光谱对 *GH* 基因相对表达量有显著影响, 蓝光下, *GH* 基因表达量显著高于黄、白光组($P < 0.05$), 但与绿光组的表达量无显著性差异(图 2A)。对于 *GHR1* 基因, 不同光谱下基因的表达量无显著性差异, 但蓝光下 *GH* 基因的表达量最高, 依次为黄、绿、白光(图 2B)。蓝、绿光下 *IGF1* 基因表达量较高, 但与黄、白光组的表达量之间无显著性差异(图 2C)。

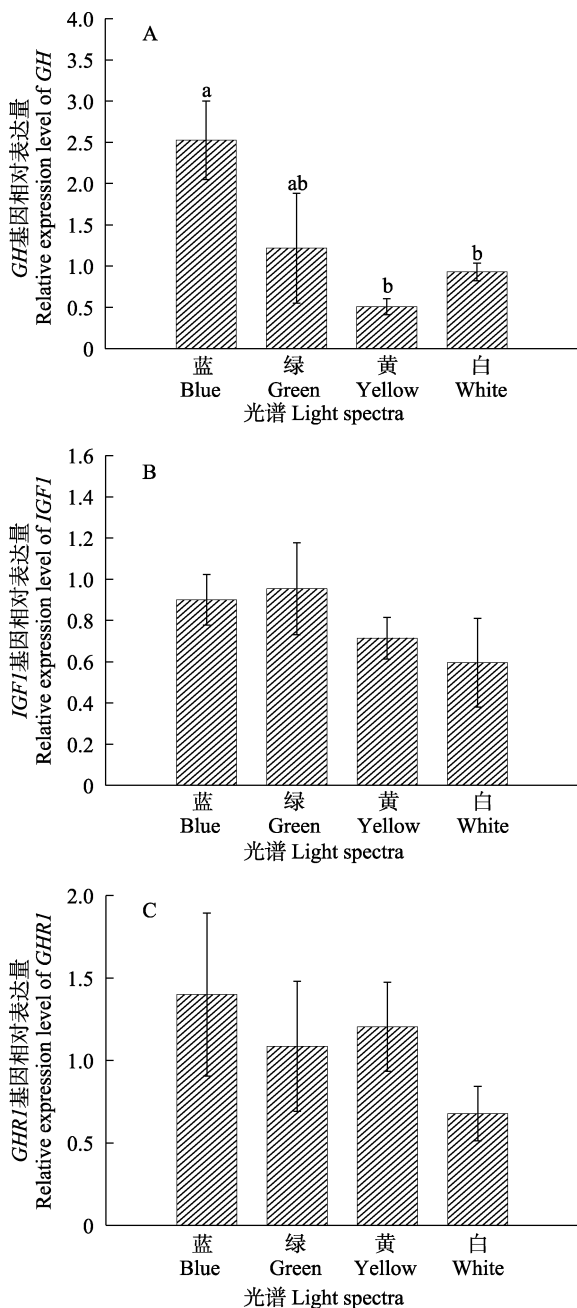


图2 光谱对红鳍东方鲀生长相关基因表达的影响
Fig.2 The effect of spectra on the expression of growth-related gene in *Takifugu rubripes*

3 讨论

研究表明, 鱼类受精卵的孵化受温度、盐度、pH、溶解氧等环境因子的影响(杨明秋等, 2012; 戈志强等, 2003), 而光作为重要的环境因子之一, 对鱼类受精卵的孵化、仔鱼的生长也有着重要的影响(柳学周等, 2004; Villamizar *et al*, 2009; Blanco-Vives *et al*, 2010)。本文研究了不同光谱(蓝、绿、黄、白)对红鳍东方鲀受精卵孵化和仔稚鱼形态性状的影响。结果显示, 蓝、绿、黄光处理下的第 6 天, 受精卵开始孵化, 且各组之间的全长、体长、尾长、眼径、体高均无显著差异, 但蓝光下的头长显著高于绿、黄光组, 绿光下的躯干长显著高于蓝、黄光组的躯干长。而白光组在第 8 天开始孵化出仔稚鱼。分析认为, 在蓝、绿和黄处理组中, 受精卵受到单色光刺激, 促进了受精卵的孵化, 导致蓝、绿和黄光组中受精卵比白光组提前 2 d 孵化。Downing 等(2002)关于光谱(蓝、绿和白)对黑线雪鱼(*Melanogrammus aeglefinus*)受精卵影响研究中, 并未发现光谱对黑线雪鱼的孵化有显著性差异, 这可能是由于不同物种对不同光谱的敏感度不同, 具有种属特异性(Bocuf *et al*, 1999)。在实验结束时, 蓝光下仔稚鱼的全长、体长、躯干长和尾长的平均值最大, 黄光下仔稚鱼头长、眼径和体高的平均值最大。分析认为, 这可能是由于仔稚鱼不同性状对不同光谱的敏感度不同。蓝色光谱对欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)、大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)仔鱼的生长有促进作用(Villamizar *et al*, 2009; Blanco-Vives *et al*, 2010; Sierra-Flores *et al*, 2016), 这与本研究结果相似。欧洲舌齿鲈受精卵在孵化后 30 d, 蓝光可以促进其仔鱼生长; 同时, 对于其器官发育, 蓝光下仔稚鱼牙齿发育率为 100%, 白光、红光下的发育率分别为 63%、40%, 鱼鳔也是蓝光下发育的最好, 体长、体重也一样(Villamizar *et al*, 2009)。本研究中, 蓝光促进了仔稚鱼的生长(全长、体长、躯干长和尾长)。由此, 可以推测, 优势光谱对仔鱼生长和器官发育的影响相似。

环境因子如温度、光周期、光谱会影响生物体内激素的变化(Kim *et al*, 2016), 生长激素 *GH/IGF* 轴是脊椎动物生长的调节核心, *GH* 可以通过刺激细胞分化直接影响生长, *IGF1* 导致细胞增殖, 从而促进生物的生长(Björnsson, 1997; Duan, 1997; Green *et al*, 2010)。本研究中, 蓝光下 *GH* 基因的相对表达量显著高于黄、白光组, 而 *GHR1*、*IGF1* 基因在不同光谱下的表达无显著性差异, 但蓝光组 *GHR1*、*IGF1* 基因表达量均较其他光处理组高。从图 4、图 5 可以

看到, 蓝、黄光组的尾长、头长发育较快, 在前 10 d, 头长处于快速生长阶段。对于体高, 各光谱处理组总体变化不大, 分析认为, 处理组中的仔稚鱼体内卵黄囊在不断消耗, 体积逐渐变小, 而仔稚鱼又在不断生长, 故在实验前 20 d, 体高的变化幅度不大, 待卵黄囊完全消耗时, 体高的发育出现明显差异(图 7)。

综上所述, 蓝、绿、黄光处理组的受精卵比白光处理组早 2 d 孵化; 在实验结束时(第 23 天), 蓝光处理组仔稚鱼的全长、体长、躯干长和尾长生长最快, 黄光处理组头长、眼径和体高生长较快。对于生长相关基因, 蓝光下的生长相关基因 *GH* 相对表达量最高, 对于 *GHRI*、*IGF1* 基因, 不同光谱下基因的相对表达量无显著性差异, 因此, 建议在红鳍东方鲀受精卵孵化时, 可采用蓝色光谱照射, 以减少孵化时间, 促进仔鱼生长, 缩短养殖周期, 节约成本。

参 考 文 献

- Battaglione SC, Talbot RB. Initial swim bladder inflation in intensively reared Australian bass larvae, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner) (Perciformes: Percichthyidae). *Aquaculture*, 1990, 86(4): 431–442
- Björnsson BT. The biology of salmon growth hormone: From daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17(1–6): 9–24
- Blanco-Vives B, Villamizar N, Ramos J, *et al.* Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 2010, 306(1–4): 137–145
- Boeuf G, Bail PYL. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 1999, 177(1–4): 129–152
- Dey DB, Damkaer DM. Effects of spectral irradiance on the early development of *Chinook salmon*. *Progressive Fish-Culturist*, 1990, 52(3): 141–154
- Downing G, Litvak MK. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) embryos. *Aquaculture*, 2002, 213(1): 265–278
- Duan CM. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Integrative and Comparative Biology*, 1997, 37(6): 491–503
- Ge ZQ, Zhu J, Zhu YF, *et al.* Effects of different light and temperature on hatching rate of fertilized eggs of large silver fish. *Freshwater Fishery*, 2003, 33(5): 23–24 [戈志强, 朱江, 朱玉芳, 等. 不同光照、温度对大银鱼受精卵孵化率的影响. *淡水渔业*, 2003, 33(5): 23–24]
- Green H, Morikawa M, Mxon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*, 2010, 29(2): 195–198
- Helvik JV, Walther BT. Environmental parameters affecting induction of hatching in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. *Marine Biology*, 1993, 116(1): 39–45
- Helvik JV, Walther BT. Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 2010, 263(2): 204–209
- Kim BH, Hur SP, Hur SW, *et al.* Relevance of light spectra to growth of the rearing tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Development and Reproduction*, 2016, 20(1): 23–29
- Liu XZ, Xu YJ, Ma AJ, *et al.* Effects of salinity, temperature, light rhythm and light intensity on embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* Gunther and its hatching technology optimization. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 1–6 [柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鳎胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究. *海洋水产研究*, 2004, 25(6): 1–6]
- Mangor-Jensen A, Waiwood KG. The effect of light exposure on buoyancy of halibut eggs. *Journal of Fish Biology*, 1995, 47(1): 18–25
- Puvanendran V, Brown JA. Foraging, growth and survival of Atlantic cod, *Gadus morhua*, larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquaculture*, 2002, 214: 131–151
- Sierra-Flores R, Davie A, Grant B, *et al.* Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture*, 2016, 450(2): 6–13
- Trotter AJ. Effect of photoperiod and light intensity on initial swim bladder inflation, growth and post-inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture*, 2003, 224(1): 141–158
- Tyler JE. Optical oceanography. *Earth-Science Reviews*, 1968, 4(4): A302
- Villamizar N, García-Alcazar A. Sánchez-Vázquez FJ. Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 2009, 292(1–2): 80–86
- Yang MQ, Wang YP, Fu SY, *et al.* Effects of different temperatures and salinities and pH values on the early development of *Plectropomus leopardus* Lacepe. *Journal of Tropical Organisms*, 2012, 3(2): 104–108 [杨明秋, 王永波, 符书源, 等. 温度、盐度和 pH 值对豹纹鳃棘鲷早期发育的影响. *热带生物学报*, 2012, 3(2): 104–108]
- Yoseda K, Yamamoto K, Asami K, *et al.* Influence of light intensity on feeding, growth, and early survival of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) larvae under mass-scale rearing conditions. *Aquaculture*, 2008, 279(1–4): 55–62

Effects of LED Spectra on Morphological Characters and Gene Expression of Growth in *Takifugu rubripes* Larvae

WEI Pingping^{1,3}, LI Xin^{1,3}, ZHANG Junpeng^{1,3}, FEI Fan^{1,3}, MA He^{1,3},
GAO Dongkui^{1,3}, SONG Changbin⁴, CHEN Tao⁵, LIU Ying^{1,2,3①}

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023;

2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266000;

3. Liaoning Aquaculture Facilities and Equipment Engineering Research Center, Dalian 116023;

4. China Academy of Sciences Institute of Semiconductors, Beijing 100083;

5. Led Cooler Technology Co. Ltd, Shenzhen 518000)

Abstract Four LED spectral parameters were set, which were blue (λ_{450} nm), green (λ_{525} nm), yellow (λ_{590} nm), and white ($\lambda_{400-780}$ nm), water temperature was controlled at $(22\pm 1)^\circ\text{C}$, photoperiod was 16L:8D. The light intensity was set at 200 mW/m^2 . The results showed that the fertilized eggs of *Takifugu rubripes* under the blue, green and yellow light hatched 2 days earlier than the white light. At the end of the experiment, the full length, body length, trunk length and tail length of the larvae under the blue light were the most. Under yellow light, the head length, eye diameter, and body height showed the fastest growth. For growth genes, the expression of growth hormone (*GH*) gene under the blue light was significantly higher than yellow and white light group ($P<0.05$), but there was no significant difference with green light group. There was no significant difference in gene expression for growth hormone receptor 1 (*GHR1*) and insulin-like growth factor type (*IGF-1*) under different spectra, but the expression of *GH* gene under blue light was the highest. The results showed that LED spectrum (blue, green, and yellow) promoted the hatching of the fertilized eggs of *T. rubripes*, and the blue spectrum is beneficial to the growth and development of the *T. rubripes* larvae. The paper provided a scientific reference for the incubation of *T. rubripes*.

Key words LED Spectrum; *Takifugu rubripes* larvae; Morphological character; Gene expression of growth

① Corresponding author: LIU Ying, E-mail: yingliu@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181106001

http://www.yykxjz.cn/

黄仲园, 何文辉, 彭自然, 刘玉超, 华雪铭, 冯悦, 李向, 左琳. 苦草粉对草鱼幼鱼生长性能与生理生化性能的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 169-177

Huang ZY, He WH, Peng ZR, Liu YC, Hua XM, Feng Y, Li X, Zuo L. Effects of adding *Vallisneria natans* meal to diet on growth performance, physiological and biochemical properties of juvenile grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 169-177

苦草粉对草鱼幼鱼生长性能与 生理生化性能的影响*



黄仲园^{1,2,3} 何文辉⁴ 彭自然⁴ 刘玉超⁵
华雪铭^{2,3①} 冯悦^{1,2,3} 李向^{1,2,3} 左琳^{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. 上海海洋大学海洋生态与环境学院 上海 201306; 5. 上海太和水环境科技有限公司 上海 200433)

摘要 本研究评价了苦草(*Vallisneria natans*)粉在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)饲料中的应用效果。以不含苦草粉的基础饲料(VN0 组)为对照, 分别用 10%(VN1 组)、20%(VN2 组)和 30%(VN3 组)的苦草粉替代基础组饲料中的次粉和米糠, 配制出 4 种实验饲料, 另设置 1 组只投喂新鲜苦草的青饲料组(VN组)。选用初始体重为(18.85±0.20) g 的草鱼幼鱼在室内水泥池网箱进行为期 56 d 的养殖实验。结果显示, 添加苦草粉不影响草鱼的生长性能、存活率和饲料系数。随着苦草粉添加量的增加, 内脏指数及肝胰脏指数显著降低; 前肠淀粉酶活力显著增强, 中、后肠淀粉酶活力显著降低; 对照组前、中、后肠蛋白酶活力依次增强, 随着苦草粉含量的增加, 前肠蛋白酶活力显著增强, 中肠蛋白酶活力表现出先增强再减弱再增强的变化, VN1 组显著高于其他组, 后肠蛋白酶活力呈现显著降低的趋势; 肝胰脏SOD活力显著提高, MDA含量先下降后上升, VN3 组最高。血清总蛋白含量有上升的趋势, VN3 组显著高于其他组; 血清白蛋白含量呈现先增加后降低的趋势, VN1 组最高; 血清ALT活力先增强后减弱; 与对照组相比血清AST活力显著降低, 各苦草粉组之间没有显著性差异。添加苦草粉显著降低了饲料表观消化率, 但在一定程度上增强了草鱼对嗜水气单胞菌的抗感染能力。VN组出现负增长现象, 内脏指数及肝胰脏指数、血清白蛋白、球蛋白及ALT都显著低于其他组; 肠道各段淀粉酶活力显著高于各实用饲料组; 中肠蛋白酶活力显著高于对照组, 后肠蛋白酶活力显著低于对照组。研究表明, 饲料中添加 10%~30%苦草粉对草鱼生长没有影响, 且有利于鱼体健康, 可以作为草鱼饲料原料进行资源化的利用; 苦草粉的使用效果明显优于新鲜苦草。

关键词 草鱼幼鱼; 苦草; 生长性能; 肝胰脏指标; 消化率; 抗感染能力

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0169-09

苦草(*Vallisneria natans*)隶属于水鳖科苦草属, 是一种多年生无茎沉水草本植物, 广泛分布于我国的河

* 水体污染控制与治理科技重大专项子课题(2014ZX07101-012-04)资助 [This work was supported by the Subproject of the National Water Pollution Control and Treatment Science and Technology Major Project (2014ZX07101-012-04)]. 黄仲园, E-mail: 1099889240@qq.com

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

收稿日期: 2018-11-06, 收修改稿日期: 2018-12-10

流、湖泊等水域。因为苦草适应环境的能力强,在修复水生态过程中对维护生态完整性与稳定性、净化水质、抑制藻类生长等具有重要作用,是生态修复工程上常用的一种沉水植物(Horppila *et al*, 2003; 潘慧云等, 2008)。然而,沉水植物生长迅速,形成的生物量相当可观,在其腐烂分解时会释放出大量的有机物质和营养盐,易造成水体的二次污染(李文朝等, 2001; Chimney *et al*, 2006; 杨清心, 1998)。生态工程上一般采用人工打捞的方法来适时迁出富营养化水体中的水草,迁出的这些水草的处理处置便成了当务之急。

目前对于沉水植物资源化利用的研究大多集中在高投入且工艺不成熟的固体发酵、堆肥上(王艳丽等, 2006; 杨柳燕等, 2016; 陈专专, 2013; 查国君等, 2008)。研究发现,凤眼莲草粉可用作鲢鱼(*Silurus asotus*)的饲料源(Liang *et al*, 1971)。由于沉水植物是野生或湖泊放流河蟹(*Eriocheir sinensis*)的重要食物来源,对其生长发育起着重要作用(张蕾等, 2016),因此,轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)、伊乐藻(*Elodea nuttallii*)、马来眼子菜(*Potamogeton malaianus*)、苦草和金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)可以开发成饲料原料被中华绒螯蟹利用(孙丽萍, 2011)。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国第一大淡水养殖鱼类,肉质细嫩,深受人们喜爱。草鱼具有摄食沉水植物的习性,摄食优先选择次序为:轮叶黑藻>苦草>菹草(*Potamogeton crispus*)>金鱼藻>穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)(孙健等, 2015)。研究发现,沉水植物的构造和次生代谢产物是影响其适口性的主要原因(Sun *et al*, 2017);而水温、沉水植物的粗蛋白含量以及黄酮类物质的种类和含量则影响摄食量(Sun *et al*, 2018)。苦草经干燥处理后粗蛋白含量为20%,粗脂肪含量约为5%,氨基酸种类齐全且含量丰富,氨基酸构成比例优良,有较高的营养价值(孙丽萍, 2011)。因此,本实验以草鱼为研究对象,探讨饲料中添加苦草粉对其生长性能、组织生化指标、消化酶、饲料表观消化率和抗感染能力的影响,为苦草的资源化利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验设计与实验饲料

取苦草叶子,经晒干后粉碎、过60目,其粗蛋白含量为16.8%,粗脂肪含量为4.5%。在基础饲料(VN0)中分别添加10%(VN1)、20%(VN2)和30%(VN3)的苦草粉,相应减少米糠和次粉的添加量,共配制出4组等氮等能的实验饲料(表1)。所有原料经粉碎后过60目筛,逐级混匀制成粒径为2mm的沉性颗粒饲料

(单螺杆挤压机 SLP-45, 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 中国; 制粒温度为90℃~95℃), 避光晾干, 塑料自封袋保存备用; 另设置只投喂新鲜苦草的青饲料组(VN)。

表1 实验饲料配方及营养组成(% , 风干样品)

原料 Ingredients	VN0	VN1	VN2	VN3
秘鲁鱼粉 Peru fish meal	2	2	2	2
豆粕 Soybean meal	18	18	18	18
菜粕 Rape seed meal	24	24	24	24
棉粕 Cotton seed meal	12	12	12	12
米糠 Rice bran	14	12	11	9
次粉 Wheat middlings	25	17	8	0
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5	1.5	1.5
豆油 Soybean oil	1.5	1.5	1.5	1.5
沸石粉 Zeolite powder	0.5	0.5	0.5	0.5
多维 Mineral premix ¹	1	1	1	1
多矿 Vitamin premix ²	0.5	0.5	0.5	0.5
苦草粉 <i>V. natans</i> meal	0	10	20	30
总计 Total	100	100	100	100
营养水平 Nutrient levels				
粗蛋白 Crude protein	30.51	30.70	30.86	31.06
粗脂肪 Crude fat	5.16	5.11	5.19	5.14
总能 Gross energy(MJ/kg)	15.83	15.44	15.05	14.65
灰分 Ash	9.29	10.40	13.71	14.20
水分 Moisture	8.87	8.99	8.71	8.32

注: 1. 维生素预混料向每千克饲料提供: 维生素 A, 6000 IU; 维生素 D₃, 2000 IU; 维生素 C, 200 mg; 维生素 E, 50 mg; 维生素 K₃, 5 mg; 维生素 B₁, 15 mg; 维生素 B₂, 15 mg; 维生素 B₃, 30 mg; 维生素 B₅, 35 mg; 维生素 B₆, 6 mg; 维生素 B₁₂, 0.03 mg; 生物素, 0.2 mg; 叶酸, 3 mg; 肌醇, 200 mg

2. 矿物元素预混料向每千克饲料提供: 碘, 0.4 mg; 铜, 4 mg; 锌, 80 mg; 铁, 150 mg; 锰, 20 mg; 镁, 100 mg; 钴, 0.1 mg; 硒, 0.1 mg

Note: 1. The vitamin premix provided the following per kg of diets: V_A, 6000 IU; V_{D3}, 2000 IU; V_C, 200 mg; V_E, 50 mg; V_{K3}, 5 mg; V_{B1}, 15 mg; V_{B2}, 15 mg; V_{B3}, 30 mg; V_{B5}, 35 mg; V_{B6}, 6 mg; V_{B12}, 0.03 mg; biotin, 0.2 mg; folic acid, 3 mg; inositol, 200 mg

2. The mineral premix provided the following per kg of diets: I, 0.4 mg; Cu, 4 mg; Zn, 80 mg; Fe, 150 mg; Mn, 20 mg; Mg, 100 mg; Co, 0.1 mg; Se, 0.1 mg

1.2 实验用鱼与饲养管理

实验用草鱼平均初始体重为(18.85±0.20)g, 购来自浙江省湖州淡水鱼苗场。取750尾体格健壮, 规格整齐的个体, 随机分到25个网箱(2.0m×1.2m×1.2m), 每个网箱30尾, 共5组, 每组5个重复, 网箱随机置于7个室内水泥池(5.0m×2.0m×1.2m)中。养殖实验在上海

海洋大学滨海基地进行, 养殖周期为 56 d。

在养殖期间, 每天按体重的 3%~5% 分 3 次(07:30, 12:30, 17:00)限量投喂, 各网箱保持基本一致的投饲量, VN 组按体重的 20%~30% 限量投喂新鲜苦草, 并依据天气、水温和鱼体增重等情况作适当调整。饲喂期间, 每 5 d 更换 1/3 池水, 7 d 吸污 1 次, 水体 24 h 不间断充气, 溶解氧 > 5.0 mg/L, pH 为 7.3~7.8, 水温为 26℃~33℃, 氨氮浓度低于 0.2 mg/L。

1.3 样品采集与指标测定

养殖结束后, 停食 24 h, 统计每个网箱草鱼数量并称总重, 计算相对增重率(WGR)和饲料系数(FCR); 每个网箱随机取 9 尾鱼, 测体重和体长, 计算肥满度(CF); 尾静脉取血, 4℃ 静置 24 h 后以 3500 r/min 离心 10 min, 取上层血清; 之后将实验鱼解剖, 分离肝胰脏, 并称量以计算肝胰脏指数; 分离前、中、后肠并剔除脂肪组织; 最后, 将所有样品置于 -80℃ 保存用于后续检测分析。

1.3.1 生长性能和形体指标

存活率(Survival rate, SR, %) = 实验结束时鱼尾数 / 实验初始时鱼尾数 × 100

相对增重率(Weight gain rate, WGR, %) = (终末平均体重 - 初始平均体重) / 初始平均体重 × 100

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR) = 平均摄食量 / (终末平均体重 - 初始平均体重)

肥满度(Condition factor, CF) = 100 × 终末鱼体重 / 终末鱼体长³

内脏指数(Viscerosomatic index, VSI, %) = 内脏重 / 鱼体总重 × 100

肝胰脏指数(Hepatosomatic index, HSI, %) = 肝胰脏重 / 鱼体总重 × 100

1.3.2 血清样品分析 碱性磷酸酶(AKP)活性、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性均采用南京建成生物的试剂盒检测, 具体操作按照说明书进行。

1.3.3 肝胰脏样品分析 肝胰脏匀浆液制备: 取部分新鲜肝胰脏称重, 按照质量体积比 1:9 加入生理盐水, 1000 r/min 匀浆 3 min, 3500 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液分装, 4℃ 保存, 24 h 内测定完成。

肝胰脏超氧化物歧化酶活力(SOD)、丙二醛(MDA)含量采用南京建成试剂盒测定。

1.3.4 消化酶活力的分析测定 肠道组织匀浆液的制备同肝胰脏组织匀浆液制备。

蛋白酶活力的测定参照 Folin 酚法进行; 淀粉酶活力采用南京建成生物的试剂盒检测。

1.3.5 表观消化率的测定 在养殖实验的中后期

VN0、VN1、VN2 和 VN3 组开始投喂含有 Cr₂O₃ 的饲料, 适应 7 d 后开始在每次投喂 2 h 后收集新鲜、外表带有包膜的完整粪便; VN 组无法采用相同的方法测定表观消化率, 故不提供相应的结果。

表观消化吸收率(%) = (1 - F_c / S_c) × 100

F_c 为饲料中 Cr₂O₃ 含量; S_c 为粪便中 Cr₂O₃ 含量。

1.4 攻毒实验

嗜水气单胞菌活化后, 经预实验确定攻毒浓度为 5 × 10⁸ CFU/ml, 注射剂量为 0.2 ml。待养殖实验中各组样本采集完成后, 随机将各实用饲料组剩余草鱼分成 4 重复, 每重复 20 尾鱼, 用预实验确定的嗜水气单胞菌攻毒浓度和剂量对各实用饲料组草鱼进行急性攻毒, 攻毒 4 d 后, 草鱼死亡趋于稳定。详细记录内各组草鱼累计死亡数, 并计算累计死亡率(Accumulative death rate)和相对免疫保护率(Relative percent survival rate, RPS)。

RPS(%) = (1 - 免疫组死亡率 / 对照组死亡率) × 100

1.5 数据处理与分析

实验结果用平均值 ± 标准差(Mean ± SD)表示, 采用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 影响显著时用 Duncan 氏法进行多重比较, P < 0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 饲料中苦草粉含量对草鱼生长性能与形体指标的影响

饲料中添加苦草粉对草鱼生长性能和形体指标的影响见表 2。研究表明, 除 VN 组外, 其他各组在 WGR、FCR 和 SR 上都无显著性差异(P > 0.05); VN0、VN1 和 VN2 三组鱼体 CF 没有显著性差异(P > 0.05), 都显著高于 VN3 组(P < 0.05); 随饲料中苦草粉含量的增加 VSI 和 HSI 显著降低, VN0 组的 VSI 和 HSI 显著高于其他各组(P < 0.05), VN3 组最小。VN 组草鱼出现反常的负增长现象, 其 VSI 和 HSI 都显著低于其他各组(P < 0.05)。

2.2 饲料中苦草粉含量对草鱼消化酶活力和表观消化率的影响

由表 3 可见, 淀粉酶活力后肠最高, 前肠最低; 与 VN0 组相比, 苦草粉组前肠淀粉酶活力显著增强(P < 0.05), 中、后肠淀粉酶活力则显著降低(中肠 VN1 除外, P < 0.05), VN 组前、中、后肠淀粉酶活力均显著高于其他组(P < 0.05)。

对照组前、中、后肠蛋白酶活力依次增强, 随着

表2 苦草粉对草鱼生长性能和形体指标的影响指标
Tab.2 Effects of *V. natans* meal on growth performance and physical indicators of grass carp

组别 Group	VN0	VN1	VN2	VN3	VN
初均重 IMB (g)	18.86±0.25 ^a	18.84±0.15 ^a	18.75±0.15 ^a	18.83±0.24 ^a	18.97±0.19 ^a
末均重 FBW (g)	71.51±2.44 ^{bc}	71.19±3.77 ^{bc}	68.77±1.71 ^b	73.63±2.14 ^c	17.77±0.42 ^a
增重率 WGR (%)	279.33±17.16 ^{bc}	277.78±17.24 ^{bc}	266.89±11.72 ^{bc}	291.06±6.53 ^c	-6.54±2.06 ^a
饲料系数 FCR (%)	1.46±0.04 ^a	1.55±0.08 ^a	1.54±0.07 ^a	1.47±0.06 ^a	
存活率 SR (%)	96.67±2.36 ^a	93.33±4.71 ^a	96.67±4.08 ^a	92.67±3.65 ^a	97.33±2.79 ^a
肥满度 CF	1.92±0.00 ^b	1.94±0.03 ^b	1.90±0.00 ^b	1.85±0.02 ^a	1.94±0.04 ^b
内脏指数 VSI (%)	10.82±0.40 ^d	9.08±0.71 ^c	8.47±0.19 ^{bc}	8.07±0.17 ^b	6.75±0.27 ^a
肝胰脏指数 HSI (%)	1.97±0.10 ^d	1.65±0.02 ^c	1.59±0.05 ^c	1.40±0.06 ^b	0.62±0.06 ^a

注: 同行数据肩标相同表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Notes: In the same row, values with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as following

表3 苦草干粉对草鱼肠道消化酶活力的影响(U/mg prot)
Tab.3 Effects of *V. natans* meal on intestinal digestive enzymes of grass carp (U/mg prot)

组别 Group	V0	VN1	VN2	VN3	VN	
淀粉酶 Amylase	前肠 Foregut	24.13±0.53 ^a	28.19±0.23 ^c	25.46±0.84 ^b	27.98±0.34 ^c	40.20±0.98 ^d
	中肠 Midgut	40.85±1.82 ^c	45.29±1.09 ^d	24.19±2.39 ^a	28.85±1.57 ^b	55.77±0.38 ^e
	后肠 Hindgut	98.56±2.66 ^d	90.43±1.31 ^c	64.85±1.51 ^a	68.74±2.38 ^b	102.11±0.00 ^e
蛋白酶 Protease	前肠 Foregut	5355.39±74.02 ^b	6763.02±79.01 ^c	7911.60±29.86 ^a	10575.33±22.57 ^d	5303.26±98.40 ^b
	中肠 Midgut	10836.01±98.40 ^b	12940.93±205.36 ^c	9930.17±130.17 ^a	12289.25±70.49 ^d	11943.86±29.86 ^c
	后肠 Hindgut	15586.74±130.17 ^d	15632.36±19.55 ^d	9324.11±45.15 ^b	7701.43±62.85 ^a	10816.45±100.32 ^c

苦草粉含量的增加, 前肠蛋白酶活力显著增强($P<0.05$); 中肠蛋白酶活力表现出先增再降再增的变化, VN1 组显著高于其他组($P<0.05$); 后肠蛋白酶活力呈现显著降低的趋势($P<0.05$); VN 组中肠蛋白酶活力显著高于对照组($P<0.05$), 后肠蛋白酶活力显著低于对照组($P<0.05$)。

由图 1 可知, 随着饲料中苦草粉含量的增加, 饲料表观消化率显著降低($P<0.05$), 当添加量达到 20% 以后逐渐趋于稳定。

2.3 饲料中苦草粉含量对草鱼生化指标的影响

由表 4 可知, 随着苦草粉用量的增加, 肝胰脏 SOD 活力显著提高($P<0.05$); MDA 含量显著降低而后又升高($P<0.05$)。

随着饲料中苦草粉含量的上升血清总蛋白含量有上升的趋势, VN3 组显著高于其他组($P<0.05$); 血清白蛋白含量先增后降, 各添加组都显著高于对照组($P<0.05$), VN1 组最高; 血清球蛋白含量先降后增, VN2 组最低; 血清 AKP 活力显著下降($P<0.05$); 血清 ALT 活力先增后降, VN2 组显著高于其他各组($P<0.05$); 与对照组相比, 添加苦草后血清 AST 活力显著降低($P<0.05$), VN1、VN2 和 VN3 组之间没有显

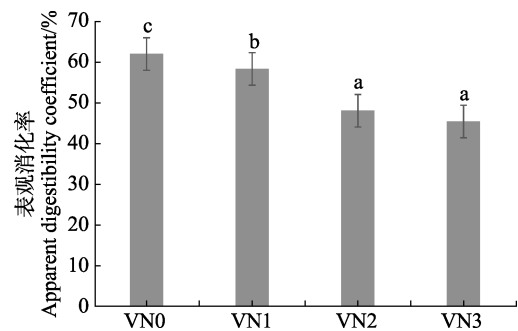


图1 苦草粉对饲料表观消化率的影响

Fig.1 Effects of *V. natans* meal on the apparent digestibility coefficient of the diets

图中相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$),

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Columns with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$)

著性差异($P>0.05$)。

VN 组的肝胰脏 SOD 显著低于其他各组($P<0.05$), 肝胰脏 MDA 含量、血清球蛋白和总蛋白含量显著高于其他各组($P<0.05$), 而血清白蛋白含量与血清 ALT 显著低于其他各组($P<0.05$); 血清 AKP 及 AST 普遍低于 VN0、VN1 与 VN2 组。

表 4 苦草粉对草鱼血清、肝胰脏指标的影响
Tab.4 Effects of *V. natans* meal on biochemical indicators in serum and hepatopancreas of grass carp

项目 Items	组别 group				
	VN0	VN1	VN2	VN3	VN
肝胰脏 SOD (U/mg prot)	222.92±3.97 ^b	232.75±2.45 ^c	228.71±2.76 ^c	241.70±3.14 ^d	206.49±0.61 ^a
肝胰脏 MDA (nmol/mg prot)	2.53±0.15 ^c	1.06±0.05 ^a	1.68±0.04 ^b	3.71±0.21 ^e	3.36±0.05 ^d
血清总蛋白 TP (mg/ml)	25.53±0.41 ^{ab}	27.07±0.54 ^b	24.72±0.16 ^a	35.37±1.49 ^d	32.12±1.13 ^c
血清白蛋白 TP (mg/ml)	17.00±0.46 ^b	20.50±0.25 ^d	19.11±0.89 ^c	18.60±0.66 ^c	7.37±0.13 ^a
血清球蛋白 TP (mg/ml)	8.48±0.00 ^c	6.43±0.29 ^b	4.88±0.00 ^a	16.77±0.83 ^d	24.75±1.00 ^e
血清 AKP (U/L)	10.50±0.00 ^d	9.51±0.02 ^c	9.07±0.21 ^b	7.74±0.11 ^a	8.83±0.21 ^b
血清 ALT (U/L)	6.24±1.04 ^b	7.40±1.39 ^{bc}	8.41±1.22 ^c	6.70±0.46 ^{bc}	3.15±0.43 ^a
血清 AST (U/L)	5.65±0.55 ^b	3.81±0.24 ^a	4.53±0.48 ^a	3.64±0.37 ^a	3.89±0.92 ^a

2.4 饲料中苦草粉含量对草鱼抗感染能力的影响

草鱼受到嗜水气单胞菌感染后, 相继出现死亡, 24~48 h 死亡最为严重, 死鱼表现出肛门红肿溃烂、腹腔肿胀有积液、眼球红肿、肝胰脏发黑等症状, 第 72 h 之后不再死亡。表 5 显示, 各组累计死亡率没有显著性差异, VN2 组的免疫保护率显著高于其他各组 ($P<0.05$)。

表 5 苦草对草鱼死亡率和免疫保护率的影响
Tab.5 Effects of *V. natans* meal on accumulative death and relative percent survival of grass carp

组别 Group	死亡率 Accumulative death rate (%)	免疫保护率 RPS (%)
VN0	28.33±2.89 ^a	0.00±0.00 ^a
VN1	26.67±2.89 ^a	5.86±1.00 ^{ab}
VN2	22.81±6.08 ^a	19.48±2.10 ^c
VN3	25.93±3.21 ^a	8.47±1.11 ^{ab}

注: 同列数据肩标相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Notes: In the same column, values with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$)

3 讨论

3.1 苦草粉作为饲料原料对草鱼生长性能的影响

目前, 关于沉水植物对动物生长影响的报道主要见于中华绒螯蟹(孙丽萍等, 2012)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(El-Sayed *et al*, 2003)、鲮鱼(Liang *et al*, 1971)等。在中华绒螯蟹饲料中按 15% 的量分别添加 5 种不同的沉水植物, 平均 WGR 从高到低依次为轮叶黑藻组>伊乐藻组>对照组>苦草组>金

鱼藻组>马来眼子菜组(孙丽萍等, 2012); 10% 凤眼莲茎叶草粉替代饲料中的麦麸, 对尼罗罗非鱼的体组成没有显著的影响, 但是显著降低了生长性能, 替代量增加至 20% 时, 罗非鱼的生长性能进一步受到抑制(El-Sayed *et al*, 2003); 然而在饲料中添加 5%~10% 的凤眼莲草粉可显著提高鲮鱼的生长速度和存活率, 添加到 20% 也不影响饲料的适口性(Liang *et al*, 1971)。本研究中, 随着苦草粉含量的上升, 草鱼 WGR 有增长的趋势, 但差异并不显著, 与上述报道存在差异, 同时, 本研究还观察到, 添加苦草粉的饲料组草鱼抢食迅速, 食欲旺盛, 可见添加苦草粉对草鱼可以起到一定的诱食作用。各种沉水植物所含营养物质不同(孙丽萍, 2011; Sun *et al*, 2018), 且中华绒螯蟹、罗非鱼和鲮鱼均属于杂食性水产动物, 而草鱼是典型的草食性鱼类, 营养物质和食性不同均可能引起饲料的适口性差异。

本研究中随着苦草粉含量的增加, 草鱼 HSI 和 VSI 显著降低 ($P<0.05$), 这可能是由于实验中米糠和次粉被草粉所替代, 饲料的糖源总量减少, 而饲料中糖源对鱼的 HSI 有显著影响(Cui *et al*, 2010; Hutchins *et al*, 1998; 吴小易等, 2007)。本研究中, 在没有其他饵料来源、只投饲新鲜苦草的情况下, 草鱼 WGR 为负值, 这是因为沉水植物的含水量很高, 一般超过 90%, 苦草的水分含量更高达 95%, 干物质只有 5%, 即便苦草干物质蛋白含量可以达到 20%, 干物质粗脂肪含量可以达到 5%(尚士友等, 1997), 也远远不能满足草鱼的生长需求。

3.2 苦草粉作为饲料原料对草鱼肠道部分消化酶及饲料表观消化吸收率的影响

草鱼无胃, 肠道是食物容纳、运输、消化吸收的主要场所, 肠壁表皮能够吸收营养物质, 通过血液和

淋巴循环运输到全身(隗黎丽, 2009)。鱼类肠道消化酶活性与其食性和饲料营养成分密切相关, 也反映了其对不同营养物质的利用能力(徐介民, 2008; 李弋等, 2015)。研究发现, 草鱼肠道蛋白酶活力高于肝胰脏, 且后肠活力最强, 鱼类淀粉主要在肠道被消化和吸收(黄耀桐等, 1988)。本研究结果中, 在对照组, 无论是蛋白酶还是淀粉酶, 都是前肠活力最弱, 后肠活力最强, 与上述研究结果一致。

已有研究表明, 草食性鱼类的淀粉酶活力要高于肉食性鱼类(Zanotto *et al*, 1997; Fu, 2015), 淀粉酶活性主要由遗传因素决定, 饲料中的糖水平对其活性没有显著影响(Ugolev *et al*, 1983), 也有研究表明, 饲料中添加淀粉可以提高淀粉酶的活力(李弋等, 2015), 饲料中过高的糖含量可以抑制鲈鱼蛋白酶的活力(Moyano *et al*, 1996)。本研究中, 苦草粉替代饲料中的次粉和米糠, 饲料中淀粉种类及含量都发生变化, 而糖水平的下降可能是导致淀粉酶活力下降的主要原因(胡毅等, 2018; 蒋阳阳等, 2016)。关于沉水植物对鱼类消化酶活力影响的报道甚少, 有报道称大型沉水植物所含有的黄酮类物质可以限制草鱼对植物当中蛋白的吸收, 同时抑制消化酶的活力(Sun *et al*, 2018), 这可能是导致本研究后肠蛋白酶活力变化的一个重要原因。

由草鱼对饲料干物质和沉水植物表观消化率的结果可知(罗莉等, 2001; 陈少莲等, 1993), 草鱼对苦草、次粉和米糠的表观消化率依次为: 苦草(63.05%)>次粉(61.64%)>米糠(47.41%)。本研究中, 苦草粉主要替代原料中的次粉和米糠, 随着苦草粉用量的增加, 饲料干物质表观消化率显著降低, 可能与消化酶的活力有关, 但这与上述结果存在一定差异, 具体原因有待进一步研究。

3.3 苦草粉作为饲料原料对草鱼组织生化指标的影响

SOD 是氧自由基的自然天敌, 广泛分布于细胞内和各种体液间, 能阻止并消除自由基的连锁反应, 以保护机体免受损害, SOD 活力水平与机体免疫水平有密切关联(张笑天等, 2014)。检测 SOD 活力能够比较准确地反映机体内自由基的代谢及组织的氧化损伤情况, 对判断机体的健康状况以及免疫防御能力具有重要价值。当机体处于氧化损伤时, 会产生丙二醛、4-羟基壬烯醛(4-Hydroxynonenal)等脂质过氧化产物(Melin *et al*, 2000; Michiels *et al*, 1994), 抑制蛋白质的合成和酶活性(Szymonik-Lesiuk *et al*, 2003)。本研究中, 苦草粉添加量不超过 30%时, 草鱼肝胰脏 SOD 活性增强, MDA 含量显著降低, 表明肝胰脏细

胞受到损伤的可能性减小, 这与孙丽萍等(2012)的研究结果一致。其原因可能是和苦草中含有阿魏酸、乌头酸等抗菌、抗肝毒、抗雌激素及抗有丝分裂等功效的化合物有关, 阿魏酸还能抗氧化和清除自由基, 保护内膜不受损伤(孙文基等, 1998; 鲜启鸣等, 2004)。鱼体摄食过多的糖类物质, 势必会造成肝脏损伤和免疫力下降(许霄霄, 2017; 蒋利和等, 2013), 本研究中, 随着苦草粉用量的增加, 饲料总糖水平下降, 这也可能是肝胰脏损伤程度降低的另一原因。

血清中酶活力的改变通常意味着机体组织的病理损伤, 当肝通透性改变或者肝细胞破裂时, 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及碱性磷酸酶(ALP)会溢出细胞进入血液循环, 导致血液中三者的活力上升。本研究中, 草鱼摄食不同含量的苦草粉饲料后, 血清 ALT 活力稍有升高, 而血清 AST 与 ALP 活力显著降低, 进一步说明苦草能降低草鱼肝胰脏损伤。

血清总蛋白(TP)是由白蛋白(ALB)与球蛋白(GLB)组成, 其浓度是鱼体健康状况的基本指标(Misra *et al*, 2006), 较高的血清白蛋白标志着较快的生长速度, 较高的球蛋白含量对应着较强的免疫力(Li *et al*, 2012)。在本研究中, 饲料中添加苦草粉血清总蛋白含量显著提高, 各苦草粉组草鱼血清 ALB 含量均显著高于对照组, 这说明在生长上添加苦草粉要优于对照组, 各组生长性能结果得到了进一步验证; 10%(VN1)和 20%(VN2)组血清 GLB 含量低于对照组, 当苦草粉添加量达到 30%时, 血清 GLB 含量显著高于对照组, 说明适量使用苦草粉在一定程度上可以提高草鱼的免疫力。这可能与苦草中的 β -谷甾醇具有较强的抗炎作用和表皮渗透性、并促进血纤维蛋白溶酶原激活因子产生等功效有关(王艳丽等, 2006)。

4 结论

研究表明, 饲料中添加 30%以下的苦草粉对草鱼生长性能没有影响, 且有利于鱼体健康, 可以作为草鱼饲料原料进行资源化的利用; 苦草粉的使用效果明显优于新鲜苦草; 饲料中添加苦草粉使草鱼抢食迅速, 食欲旺盛, 苦草或可以作为草食性鱼类诱食剂来开发利用。

参 考 文 献

- Chen SL, Liu XF, Su ZG. Nutrition and bioenergetics of the Chinese herbivorous fishes with important food values, II. Maximum consumption and digestion of seven aquatic plants

- by *Ctenopharyngodon idella* and *Megalobrama amblycephala*. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(1): 1–12 [陈少莲, 刘肖芳, 苏泽古. 我国淡水优质草食性鱼类的营养和能量学研究 II. 草鱼、团头鲂对七种水生高等植物的最大摄食量和消化率的测定. 水生生物学报, 1993, 17(1): 1–12]
- Chen ZZ. Nutrient mineralization of compost of aquatic plants and its agricultural utilization approaches. Master's Thesis of Yangzhou University, 2013, 1–51 [陈专专. 水生植物混合堆腐料养分矿化规律及农业利用途径. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–51]
- Chimney MJ, Pietro KC. Decomposition of macrophyte litter in a subtropical constructed wetland in south Florida (USA). Ecological Engineering, 2006, 27(4): 301–321
- Cui XJ, Zhou QC, Liang HO, et al. Effects of dietary carbohydrate sources on the growth performance and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus). Aquaculture Research, 2010, 42(1): 99–107
- El-Sayed AFM. Effects of fermentation methods on the nutritive value of water hyacinth for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. Aquaculture, 2003, 218(1–4): 471–478
- Fu SJ. The growth performance of southern catfish fed diets with raw, precooked cornstarch and glucose at two levels. Aquaculture Nutrition, 2015, 11(4): 257–261
- Horpila J, Nurminen L. Effects of submerged macrophytes on sediment resuspension and internal phosphorus loading in Lake Hiidenvesi (southern Finland). Water Research, 2003, 37(18): 4468–4474
- Hu Y, Chen YF, Zhang DH, et al. Effects of different dietary carbohydrate and protein levels on growth, intestinal digestive enzymes and serum indexes in large-size grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Journal of Fisheries of China, 2018, 42(5): 777–786 [胡毅, 陈云飞, 张德洪, 等. 不同碳水化合物和蛋白质水平膨化饲料对大规格草鱼生长、肠道消化酶及血清指标的影响. 水产学报, 2018, 42(5): 777–786]
- Huang YT, Liu YJ. Study on protease activity in the intestinal and hepatopancreas of grass carps. Acta Hydrobiologica Sinica, 1988, 12(4): 328–333 [黄耀桐, 刘永坚. 草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性的初步研究. 水生生物学报, 1988, 12(4): 328–333]
- Hutchins CG, Rawles SD, Gatlin DM III. Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops*♀ × *M. saxatilis*♂). Aquaculture, 1998, 161(1–4): 187–199
- Jiang LH, Wu HY, Huang K, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on growth performance and liver metabolism functions of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 245–255 [蒋利和, 吴宏玉, 黄凯, 等. 饲料糖水平对吉富罗非鱼幼鱼生长和肝代谢功能的影响. 水产学报, 2013, 37(2): 245–255]
- Jiang YY, He JX, Li HY, et al. Effect of protein to carbohydrate ratios on growth performance, body composition and digestive enzymes activities of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(5): 753–758 [蒋阳阳, 何吉祥, 李海洋, 等. 不同饵料蛋白糖比对草鱼幼鱼生长性能、体组成和消化酶活性的影响. 南方农业学报, 2016, 47(5): 753–758]
- Li WC, Chen KN, Wu QL, et al. Experimental studies on decomposition process of aquatic plant material from East Taihu Lake. Journal of Lake Sciences, 2001, 13(4): 331–336 [李文朝, 陈开宁, 吴庆龙, 等. 东太湖水生植物生物质腐烂分解实验. 湖泊科学, 2001, 13(4): 331–336]
- Li XF, Liu WB, Lu KL, et al. Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 316–323
- Li Y, Zhou PP, Qiu H, et al. Effects of dietary carbohydrate sources on growth performance, digestive enzyme and carbohydrate metabolic key enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(11): 3438–3447 [李弋, 周飘苹, 邱红, 等. 饲料中糖源对大黄鱼生长性能及消化酶、糖代谢关键酶活性的影响. 动物营养学报, 2015, 27(11): 3438–3447]
- Liang JK, Lovell RT. Nutritional value of water hyacinth in channel catfish feeds. Hyacinth Control Journal, 1971, 9(1): 40–44
- Luo L, Lin SM, Ye YT. The apparent digestibility of grass carp in the dry matter, protein and fat of nine feeds. Freshwater Fisheries, 2001, 31(3): 47–50 [罗莉, 林仕梅, 叶元土. 草鱼对九种饲料的干物质、蛋白质和脂肪的表现消化率. 淡水渔业, 2001, 31(3): 47–50]
- Melin AM, Perromat A, Délérís G. Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: *in vivo* toxicity of carbon tetrachloride on rat liver. Biopolymers, 2000, 57(3): 160–168
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 1994, 17(3): 235–248
- Misra S, Sahu NP, Pal AK, et al. Pre- and post-challenge immuno- haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinised or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 346–356
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, et al. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry, 1996, 15(2): 121–130
- Pan HY, Xu XH, Gao SX. Study on process of nutrition release during the decay of submerged macrophytes. Environmental Science Research, 2008, 21(1): 64–68 [潘慧云, 徐小花, 高士祥. 沉水植物衰亡过程中营养盐的释放过程及规律. 环境科学研究, 2008, 21(1): 64–68]

- Shang SY, Du JM, Zhang ZY, *et al.* Exploitation of submersed macrophytes resources and lake protection. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 1997(3): 16–20 [尚士友, 杜建民, 张志毅, 等. 沉水植物资源开发与湖泊保护的研究. 农业工程学报, 1997(3): 16–20]
- Sun J, He F, Zhang Y, *et al.* The feeding behavior of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) on different types of submerged plants. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(5): 997–1002 [孙健, 贺锋, 张义, 等. 草鱼对不同种类沉水植物的摄食研究. 水生生物学报, 2015, 39(5): 997–1002]
- Sun J, Wang L, Ma L, *et al.* Determinants of submerged macrophytes palatability to grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. Ecological Indicators, 2018, 85: 657–663
- Sun J, Wang L, Ma L, *et al.* Factors affecting palatability of four submerged macrophytes for grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(36): 1–9
- Sun LP, Song XH, Zhu JR, *et al.* Effects of submerged plants on growth performance and non-specific immunity of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Freshwater Fisheries, 2012, 42(1): 35–40 [孙丽萍, 宋学宏, 朱金荣, 等. 沉水植物对中华绒螯蟹生长和非特异性免疫力的影响. 淡水渔业, 2012, 42(1): 35–40]
- Sun LP. Assessment of common submerged macrophytes in east Taihu Lake as feed resources for *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Soochow University, 2011, 1–65 [孙丽萍. 东太湖常见沉水植物作为中华绒螯蟹饲料源的可行性研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2011, 1–65]
- Sun WJ, Sheng JF. A concise manual for natural active ingredients. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1998, 536 [孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1998, 536]
- Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, *et al.* Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 2003, 10(4): 309–315
- Ugolev AM, Egorova VV, Kuzmina VV, *et al.* Comparative-molecular characterization of membrane digestion in fish and mammals. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Comparative Biochemistry, 1983, 76(3): 627–635
- Wang YL, Xiao Y, Pan HY, *et al.* Analysis of nutrient composition and comprehensive utilization of submersed aquatic macrophytes (*Vallisneria spiralis*). Journal of ecology and rural environment, 2006, 22(4): 45–47, 70 [王艳丽, 肖瑜, 潘慧云, 等. 沉水植物苦草的营养成分分析与综合利用. 生态与农村环境学报, 2006, 22(4): 45–47, 70]
- Wei LL. Subchronic effects of microcystin-LR on the ultrastructure of liver of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2009, 31(5): 812–817 [隗黎丽. 微囊藻毒素-LR 对草鱼肝脏超微结构的亚急性毒性影响. 江西农业大学学报, 2009, 31(5): 812–817]
- Wu XY, Liu YJ, Tian LX, *et al.* Utilization of several different carbohydrate sources by juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). Journal of Fisheries of China, 2007, 31(4): 463–471 [吴小易, 刘永坚, 田丽霞, 等. 黄鳍鲷幼鱼对几种不同糖源的利用. 水产学报, 2007, 31(4): 463–471]
- Xian QM, Chen HD, Zhou HX, *et al.* Analysis of organic acids in aqueous leachates of three submerged macrophytes. Journal of Plant Resources and Environment, 2004, 13(3): 57–58 [鲜启鸣, 陈海东, 邹惠仙, 等. 3 种沉水植物水浸提液中有有机酸成分分析. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 57–58]
- Xu JM. Effects of chitosan on growth of grass carps. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2008, 1–43 [徐介民. 壳聚糖对草鱼生长影响的研究. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2008, 1–43]
- Xu XX. Effects of high carbohydrate levels in the dietary on growth properties, glucose and lipid metabolisms, intestinal health and immune performance of GIFT, *Oreochromis niloticus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017, 1–80 [许霄霄. 高糖饲料对吉富罗非鱼生长性能、糖脂代谢、肠道健康以及免疫性能的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017, 1–80]
- Yang LY, Zhang W, Chen QK, *et al.* Resources utilization of macrophytes. Water Resources Protection, 2016, 32(5): 5–10, 28 [杨柳燕, 张文, 陈乾坤, 等. 大型水生植物的资源化利用. 水资源保护, 2016, 32(5): 5–10, 28]
- Yang QX. Ecological functions of aquatic vegetation in east Taihu Lake and its reasonable regulation. Journal of Lake Sciences, 1998, 10(1): 67–72 [杨清心. 东太湖水生植被的生态功能及调节机制. 湖泊科学, 1998, 10(1): 67–72]
- Zanotto F, Gouveia S, Simpson S, *et al.* Nutritional homeostasis in locusts: Is there a mechanism for increased energy expenditure during carbohydrate overfeeding? Journal of Experimental Biology, 1997, 200(18): 2437–2448
- Zha GJ, Zhang WD, Yin F, *et al.* Separating solid and liquid of Dianchi's *Eichhornia crassipes* for biogas generation. Chinese Wild Plant Resources, 2008, 27(1): 36–38 [查国君, 张无敌, 尹芳, 等. 滇池水葫芦固液分离后的沼气发酵研究. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 36–38]
- Zhang L, Zhang WQ, Wu RF, *et al.* The comparison of nutritional composition of commonly used aquatic plants in aquaculture ponds of adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2016, 35(2): 113–121 [张蕾, 章文琪, 吴仁福, 等. 中华绒螯蟹成蟹养殖池塘常用水草的营养成分比较. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2016, 35(2): 113–121]
- Zhang XT, Zheng XY. Oxidative free radical scavenger superoxide dismutase and disease. Chinese Journal of Public Health, 2014, 30(10): 1349–1352 [张笑天, 郑晓琪. 氧化自由基清除剂超氧化物歧化酶与疾病. 中国公共卫生, 2014, 30(10): 1349–1352]

Effects of Adding *Vallisneria natans* Meal to Diet on Growth Performance, Physiological and Biochemical Properties of Juvenile Grass Carps (*Ctenopharyngodon idellus*)

HUANG Zhongyuan^{1,2,3}, HE Wenhui⁴, PENG Ziran⁴, LIU Yuchao⁵,
HUA Xueming^{2,3}①, FENG Yue^{1,2,3}, LI Xiang^{1,2,3}, ZUO Lin^{1,2,3}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition 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. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 5. Shanghai Taihe Water Environment Technology Development Co.Ltd., Shanghai 200433)

Abstract In this study, the effect of *Vallisneria natans* meal used as feed ingredient in the diet of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) on growth, physiological, and biochemical properties was evaluated. Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated by replacing the secondary powder and rice bran with 0 (VN0, control), 10% (VN1), 20% (VN2), and 30% (VN3) *V. natans* meal. In addition, a group that was fed only with fresh *V. natans* was designed. Juvenile grass carp of initial weight (18.85±0.20) g were selected to be cultured for 56 days in indoor cement tank cages. The results showed that addition of *V. natans* meal did not affect the growth performance, survival rate of grass carp, and feed coefficient. With the increase in the amount of *V. natans* meal, the visceral index and hepatopancreas index significantly decreased, the activity of amylase in the foregut was significantly increased, and that in the middle and rear intestines was significantly decreased. In the control group, the protease activity of foregut, and middle and rear intestines, in turn, strengthened, and with the increase in the content of *V. natans* meal the activity of foregut protease was significantly increased; meanwhile, midgut proteinase activity increased first, then decreased, and increased again. The highest value was observed in group VN1, and protease activity in the posterior intestine showed a significant decrease trend. The superoxide dismutase (SOD) activity of the hepatopancreas was significantly increased, whereas malondialdehyde (MDA) content decreased first and then increased, and that in group VN3 was the highest. The content of serum total protein increased significantly, whereas the serum albumin content increased first and then decreased, and the highest value was found in group VN1. Compared with the control group, serum alanine aminotransferase (ALT) activity increased and then recovered to the control level, and serum aspartate aminotransferase (AST) activity significantly decreased in *V. natans* meal groups, and there was no significant difference among the *V. natans* meal groups. The addition of *V. natans* meal resulted in significantly reduced apparent digestibility of the diets and enhanced resistance ability of grass carp to *Aeromonas hydrophila* to some extent. Group VN showed negative growth and depressed visceral index, hepatopancreas index, serum albumin, globulin, and ALT. The activity of amylase in the intestinal segments was significantly higher than that in all practical formulated diets. The activity of midgut protease in VN group was significantly higher than that in the control group, and that of hindgut protease was significantly lower than that of the control group. The above results showed that the addition of 10%~30% *V. natans* meal in the diet had no effect on the growth of grass carp, but was beneficial to the health of the fish body. The results indicated that *V. natans* meal used as the raw material of grass carp feed for resource utilization would be much better than fresh *V. natans*.

Key words Juvenile *Ctenopharyngodon idellus*; *Vallisneria natans*; Growth performance; Hepatopancreas index; Apparent digestibility; Ability of anti-infection

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181017001

http://www.yykxjz.cn/

陈依萍, 崔文萱, 高瑞昌, 李渐鹏, 曾名湧, 唐淑玮, 冯秋凤, 赵元晖. 冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 178-186

Chen YP, Cui WX, Gao RC, Li JP, Zeng MY, Tang SW, Feng QF, Zhao YH. Changes in quality of sturgeon fillet during 4°C and -3°C partial freezing storage. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 178-186

冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化*



陈依萍¹ 崔文萱² 高瑞昌³ 李渐鹏¹
曾名湧¹ 唐淑玮¹ 冯秋凤¹ 赵元晖^{1①}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003; 2. 蓬莱市水产技术推广站 蓬莱 265600;
3. 江苏大学食品与生物工程学院 镇江 212013)

摘要 为了比较鲟鱼(*Acipenser sinensis*)肉在 4°C 冷藏与 -3°C 微冻过程中的品质变化, 提供一种提高鲟鱼新鲜品质的贮藏方式, 通过感官评分、菌落总数(TVC)、pH 值、挥发性盐基氮值(TVB-N)、硫代巴比妥酸值(TBA)、质构、挥发性风味物质、水分分布状态与肌纤维微观结构等指标的测定, 评价了 2 种温度贮藏对鲟鱼肉品质的影响。结果显示, 随着贮藏时间的延长, 2 种低温保鲜方式下鲟鱼肉的自由水与结合水的比例、TVB-N、TBA 和菌落总数均呈现上升趋势; 质构指标硬度和弹性及感官评分均呈降低趋势; 观察其微观结构发现, 随着贮藏时间的延长, 肌纤维之间出现黏连, 肌节逐渐由清晰变为模糊, -3°C 贮藏后期表现尤为明显。综合各指标的变化规律, 确定了 4°C 冷藏和 -3°C 微冻条件下, 鲟鱼肉的货架期分别为 6 d 和 18 d。与冷藏相比, 微冻可较好地保持鲟鱼肉品质, 微生物对鲟鱼肉的腐败进程影响较小, 而质构指标则是影响贮藏末期感官评分的最主要因素。

关键词 鲟鱼; 微冻; 品质变化; 微观结构; 贮藏期

中图分类号 TS254.7 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)01-0178-09

鲟鱼 (*Acipenser sinensis*) 隶属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、辐鳍亚纲 (Actinopterygii)、硬鳞总目 (Ganoidomorpha)、鲟形目 (Acipenseriformes), 是现存起源最早的脊椎动物之一 (朱国平, 2017)。成年鲟鱼可长至 2~3 m, 最长可达 9~10 m, 平均体重为 200~400 kg, 是世界上最大的淡水鱼类 (董佳等, 2017)。近年来, 中国已成为全球鲟鱼产量最大的国家, 2016 年鲟鱼养殖量为 89773 t (农业农村部渔业渔政管理局, 2017)。鲟鱼肉目前主要用于餐馆鲜销和冷冻出口 (李贝贝等, 2018), 鲜销鲟鱼肉贮藏期过短, 而冻藏鱼肉则面临着解冻后鱼肉品质严重劣化的问题 (董佳

等, 2017)。屠冰心等 (2014) 的研究也表明, 大黄鱼在不同温度冻藏过程中, 质构指标发生不同程度的劣化。因此, 应用一种能够延长鱼肉贮藏期并能够较好保持其品质的贮藏方式, 对于鲟鱼肉的贮藏和销售有着重要意义。

微冻技术起于 1920 年, 即应用介于传统冻结和冰温之间的温度, 但是, “微冻”或者“部分冷却”的概念在 2008 年才正式被提出, 定义为“产品中的 5%~30% 的水分被冻结”, 温度定义为低于初始冻结点 1°C~2°C (Magnussen *et al*, 2008)。研究表明, 微冻条件下水产品的感官、质构等优于冷冻样品, 且相比冷

* 山东省重点研发项目 (2017GHY15128) 和现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-46) 共同资助 [This work was supported by Shandong Province Key Research and Development Project (2017GHY15128), and China Agriculture Research System (CARS-46)]. 陈依萍, E-mail: cyp10103@163.com

① 通讯作者: 赵元晖, 副教授, E-mail: zhaoyuanhui@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-10-17, 收修改稿日期: 2018-11-30

藏保鲜贮藏期可以提升 1.4~5.0 倍(Kaale *et al*, 2011)。Mi 等(2013)评估了-2℃微冻条件下草鱼的品质变化, 研究表明, 其贮藏期可延长至 21 d。Sun 等(2017)将气调包装与微冻结合用于梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)贮藏, 考察贮藏期的品质指标, 研究表明, 可延长其贮藏期 15~20 d, 且 CO₂ 的比例是关键影响因素。Banerjee 等(2017)则认为, 微冻保鲜技术目前仍处于起步阶段, 消费者对微冻产品的认知度很低, 但微冻能够保持新鲜度、保持质量和延长贮藏期这 3 个优势, 使得微冻技术有着广阔的应用空间。

有关鲟鱼肉微冻保鲜的研究鲜见报道, 为了比较鲟鱼肉在 4℃冷藏与-3℃微冻过程中的品质变化, 提供一种提高鲟鱼新鲜品质的贮藏方式, 本文以鲟鱼肉为研究对象, 通过测定其质构、色差、水分状态、pH 值、挥发性盐基氮值(TVB-N)、硫代巴比妥酸值(TBA)和菌落总数等指标, 结合感官评定和电子鼻, 研究鲟鱼肉在 4℃冷藏和-3℃微冻条件下的贮藏期, 并且通过扫描电镜观察在贮藏期间其肌纤维的微观结构变化, 为鲟鱼肉的保鲜技术提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用鲟鱼购于青岛市城阳区水产市场, 体重为 1.5~2.5 kg, 充氧 2 h 内活体运输至实验室; 平板计数琼脂(Plate count agar, PCA), 青岛海博生物技术有限公司; HCl、H₃BO₃、NaCl 和 NaOH 等常规试剂均为分析纯试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

冰箱 BCD-216SDN 青岛海尔集团; 差示扫描量热仪 DSC250, 美国 TA 仪器; TMS-PRO 质构仪,

美国 Food Technology 公司; PEN3 便携式电子鼻, 德国 Airsense 公司; MR25 核磁共振成像分析系统, 上海纽迈电子科技有限公司; 扫描电镜 VEGA3 SBU, 捷克 Tescan 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料处理 新鲜鲟鱼运输至实验室, 于环境温度 18℃的工艺实验室处理, 敲击至晕, 去头尾、去皮和内脏, 无菌冰水洗净, 取鱼背肉将其分割为 10 cm×10 cm×3 cm 的鱼段, 用滤纸擦干鱼肉表面水分, 放入聚丙烯保鲜盒中, 使用聚乙烯材质的保鲜膜封口, 置于 4℃冷藏冰柜和-3℃微冻贮藏冰柜中进行贮藏实验。4℃下每 2 d 取样, 至鱼肉感官不可接受为止, 微冻条件每 3 d 取样, 至感官不可接受为止, 取样后于 4℃冰箱解冻 1 h 再进行指标测定。

1.3.2 冰点测定 鲟鱼肉冰点采用 DSC 法进行测定。首先用标准程序对仪器进行温度和灵敏度校准。取坩埚 2 套, 其中, 空坩埚压封后作为参比, 另 1 套称取微冻鲟鱼肉样品(10~15 mg)作为实验组。程序设置, 载气为高纯氮气, 保护气的速度为 60~70 ml/min, 吹扫气速度为 20~30 ml/min, 手动控制液氮冷却到-40℃, 恒温 1 min, 然后以 1℃/min 升温至 20℃。为了确保实验数据的准确性, 每个实验重复 3 次。根据测得的曲线判断鲟鱼肉冰点。

1.3.3 感官评定 参照胡玥(2016)的方法制作感官评分表(表 1), 分色泽、气味、组织形态和肌肉弹性 4 项指标, 邀请 7 位受过感官评定培训的实验员进行评价, 总分满分为 20 分。

1.3.4 菌落总数测定 参照 GB 4789.2-2016《食品微生物学检验 菌落总数测定》

1.3.5 pH 测定 取 10 g 鱼背肉样品, 加入 90 ml

表 1 鲟鱼感官评价标准
Tab.1 Sensory evaluation criteria of sturgeon

感官指标 Sensory index	分值 Score				
	5分	4分	3分	2分	1分
色泽 Color	色泽正常, 肌肉切面有光泽	色泽正常, 肌肉切面稍有光泽	色泽较暗淡, 无明显光泽	暗淡, 无光泽	非常暗淡, 无光泽
气味 Flavor	固有鱼肉清香	较清新	略带异味	清香味消失, 有腥臭味或氨臭味	强烈腥臭味
组织形态 Muscle tissue	肌肉组织致密, 纹理清晰	肌肉组织较紧密, 纹理较清晰	不紧密, 但不松散	不紧密, 局部松散	肌肉松散
肌肉弹性 Springiness	坚实有弹性, 按压后凹陷立即消失	较有弹性, 按压后凹陷较快消失	按压后凹陷消失较慢	稍有弹性, 按压后凹陷消失很慢	无弹性, 按压后凹陷不消失

去离子水匀浆,使用 pH 计测定匀浆 pH,每个样品重复测定 3 次,结果取平均值。

1.3.6 TVB-N 测定 参照 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定》。

1.3.7 TBA 测定 参照 GB5009.181-2016《食品中丙二醛的测定》。

1.3.8 质构测定 将鱼肉切成 1 cm 见方的块状,采用 TMS-PRO 质构仪进行 TPA 测定。测定参数:直径为 50 mm 的圆柱形探头;触发力为 1.0 g;测试前速度为 1.0 mm/s,测试速度为 1.0 mm/s,测试后速度为 2.0 mm/s;形变量为 60%。

1.3.9 水分状态测定 参照樊燕等(2017)的方法,测定样品 T_2 弛豫时间。将样品切成片(2.0 cm×0.6 cm×0.6 cm),放置在 NMR 核磁管的底部,将管放入 NMR 仪器。测试条件:质子共振频率 22.6 MHz,测量温度 32℃。采用仪器自带软件进行数据处理,选用 CPMG 序列, τ -值为 100 μ s,用指数衰减曲线进行反演,反演结果包括 T_2 弛豫时间对应的峰面积及峰宽度。

1.3.10 挥发性风味物质测定 采用德国 Airsense 公司的 PEN3 便携式电子鼻对样品进行测定,准确称量 0.5 g 搅碎鱼背肉样品,装入 20 ml 顶空瓶中,室温平衡 30 min 后进行测定。测定参数:传感器清洗时间为 90 s,进样时间为 3 s,气流流速 150 ml/min,数据采集时间为 70 s。采用电子鼻内置程序 (Winmuster, version 1.6.2) 进行数据处理与分析。

1.3.11 微观结构观察 取鲟鱼背部肌肉,从平行于肌原纤维伸展方向纵切,大小为 3 mm×3 mm×6 mm,使用戊二醛固定肌肉组织,冷冻干燥,离子溅射仪喷金后,通过扫描电镜观察其微观结构,并拍照。

1.3.12 统计分析 所有数据均设置 3 次重复,采用 SPSS 19.0 分析数据,以 $P<0.05$ 表示差异显著。实验数据处理及统计采用 Origin 2017 进行分析,以平均值±标准差(Mean±SD)表示,每个样品进行 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 冰点分析

鲟鱼肉冰点采用 DSC 法测定,取升温熔融曲线左侧拐点的切线与扫描基线的交点对应的横轴温度为冰点(刘大松, 2012)。图 1 即为新鲜鲟鱼肉 DSC 升温熔融相变曲线,可以得出,新鲜鲟鱼肉的冰点为 $(-2.10\pm 0.15)^\circ\text{C}$ 。微冻技术大多选取冰点或冰点以下 $1^\circ\text{C}\sim 2^\circ\text{C}$ 之间的温度进行贮藏,同时,考虑到鲟鱼各部位及个体的差异会导致其冰点略微不同以及贮藏

设备自身的温度波动,本实验设定 -3°C 作为鲟鱼微冻贮藏的温度。

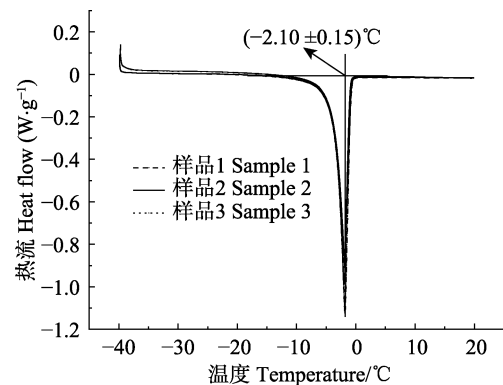


图 1 新鲜鲟鱼肉 DSC 扫描曲线
Fig.1 DSC scanning curve of fresh sturgeon

2.2 感官评定

感官评定是衡量食品品质的重要手段。Sun 等(2017)研究表明,当梭子蟹的菌落总数并未达到国际微生物标准委员会(ICMSF, 1986)规定的甲壳类水产品卫生限值 6 logCFU/g 时,就已严重腐败,感官亦不接受,因此,感官指标比生化性质更直观。图 2 显示了鲟鱼肉在 2 种不同条件贮藏过程中的感官评分,随贮藏时间的延长,鲟鱼肉感官分值呈逐渐下降趋势。贮藏至第 4 天时,冷藏的鱼肉感官评分值已降至 8.43 ± 0.53 ,此时鱼肉具有轻微的腐败异味,同时,鱼肉表面出现黏液,弹性降低;第 6 天感官评分为 4.29 ± 0.49 ,鱼肉异味明显,黏粘严重,感官完全不能接受。在整个贮藏期间,微冻与冷藏的感官评分值差异显著 ($P<0.05$),微冻处理的感官评分项在色泽和气味上没有明显下降,分值持续缓慢下降主要体现在组织形态和肌肉弹性上的劣化,贮藏至第 18 天时,感官评分

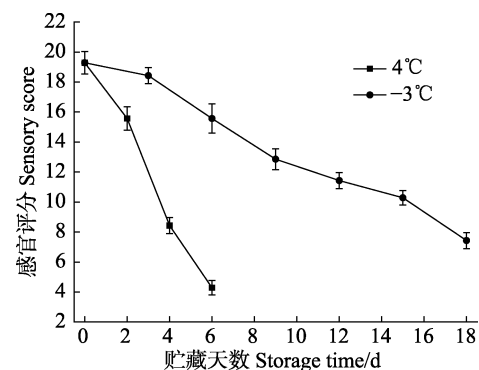


图 2 鲟鱼肉在冷藏与微冻贮藏过程中感官评分变化
Fig.2 Changes in sensory evaluation of sturgeon during 4°C and -3°C storage

才降至 7.43 ± 0.53 。同时, 微冻处理延缓了鲟鱼肉的脂肪氧化, 这也是微冻鲟鱼肉能在较长时间维持气味较好的原因。

2.3 菌落总数测定

《微生物检验与食品安全控制》国际食品微生物标准委员会(ICMSF, 1986)规定, 淡水鱼和海水鱼的微生物可接受极限为 $7.00 \log\text{CFU/g}$ 。图 3 显示了鲟鱼肉贮藏过程中菌落总数(TVC)的变化趋势, 新鲜鲟鱼肉的 TVC 为 $(4.35 \pm 0.01) \log\text{CFU/g}$, 随着贮藏时间的增加, 冷藏鲟鱼肉的 TVC 几乎呈直线上升, 并在贮藏的第 6 天达到了 $(7.35 \pm 0.01) \log\text{CFU/g}$, 已超过限值。与冷藏鲟鱼肉相比, 微冻鲟鱼肉 TVC 增长速度缓慢, 第 6 天的 TVC 仅为 $(4.62 \pm 0.04) \log\text{CFU/g}$, 第 18 天时 TVC 为 $(5.06 \pm 0.08) \log\text{CFU/g}$, 依然低于 $6.00 \log\text{CFU/g}$ 。同样的结果也出现在 Lu 等(2014)的研究中, 微冻贮藏对松浦镜鲤(*Cyprinus carpio*)中微生物的抑制效果明显优于冷藏条件。这种现象与微冻使微生物细胞中的游离水部分冻结、细胞液浓度增加、水分活度降低、抑制了微生物的繁殖(Kaale et al, 2014)有关。

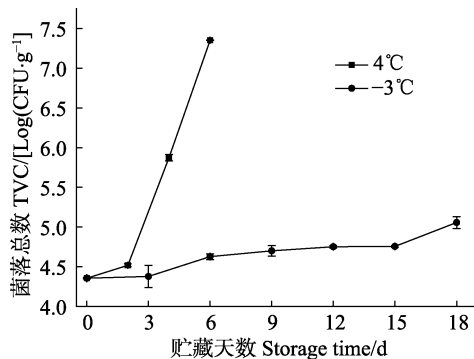


图 3 鲟鱼肉在冷藏与微冻贮藏过程中菌落总数的变化
Fig.3 Changes in total visible colonies of sturgeon during 4°C and -3°C storage

2.4 化学指标分析

2.4.1 pH 分析 pH 值的变化可以在一定程度上反映水产品的新鲜程度。鲟鱼肉在冷藏与微冻贮藏期间的 pH 值变化如图 4 所示。2 组样品的 pH 值均呈先下降后上升的趋势, 原因可能是鲟鱼贮藏初期发生的生化反应主要是糖原酵解、脂肪分解和 ATP 降解, 这些反应会相应产生乳酸、脂肪酸和磷酸等酸性物质, 使肌肉整体 pH 下降(陈思等, 2015)。贮藏后期, 鱼肉蛋白质会加速降解产生氨基酸、吲哚、氨和胺类物质等碱性物质, 使 pH 值上升(Jiang et al, 1985)。冷藏条件下, 鲟鱼肉在第 2 天即已达到最低 pH, 为 6.44 ± 0.03 ; 而微冻贮藏的样品, pH 值在第 6 天才降至

最低水平, 之后开始上升, 表明微冻处理能在一定程度上抑制蛋白分解和 ATP 降解等生化反应过程, 从而延长鲟鱼的保鲜期。

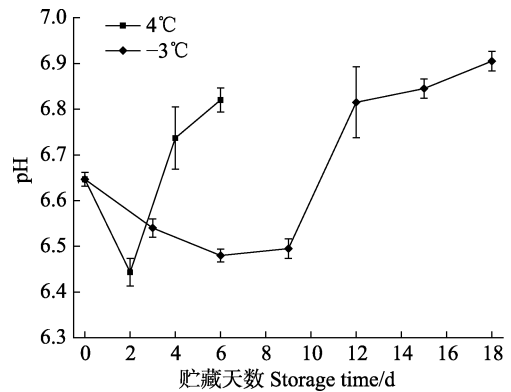


图 4 冷藏与微冻鲟鱼 pH 值的变化
Fig.4 Changes in pH value of sturgeon during 4°C and -3°C storage

2.4.2 TVB-N 与 TBA 分析 挥发性盐基氮(TVB-N)是用于判断食品新鲜度常用的理化指标, 在微生物和内源酶的作用下, 蛋白质持续分解产生氨以及胺类等碱性含氮物质。沈妮等(2019)研究表明, 0°C 和 4°C 2 种冷藏条件下, 带鱼(*Trichiurus lepturus*)的蛋白氧化致使其新鲜度和品质都遭到破坏, 散发出异味。从图 5 可以看出, 新鲜鲟鱼肉初始 TVB-N 值为 $12.63 \text{ mg}/100\text{g}$, 较其他淡水鱼偏高, 这可能是由于鲟鱼肉的蛋白含量较高。TVB-N 值在贮藏过程中呈逐渐上升趋势, 在贮藏第 4 天, 冷藏的 TVB-N 值达到 $(16.94 \pm 0.07) \text{ mg}/100\text{g}$, 第 6 天达到 $(21.56 \pm 0.41) \text{ mg}/100\text{g}$, 根据 GB 2733-2015 鲜、冻动物性水产品卫生标准, 淡水鱼的 TVB-N 卫生限值为 $20 \text{ mg}/100\text{g}$, 已超过限值。而微冻鲟鱼肉 TVB-N 含量的增长速度明显缓于

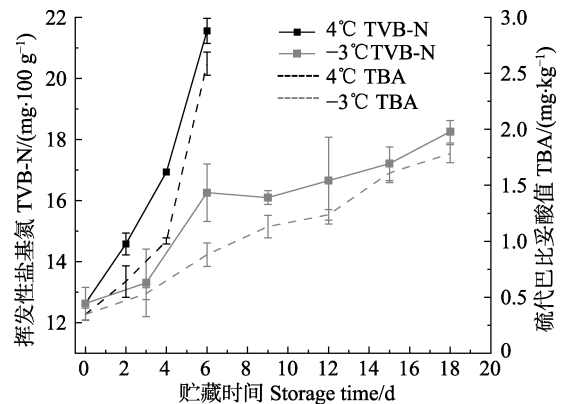


图 5 冷藏与微冻鲟鱼挥发性盐基氮值与硫代巴比妥酸值的变化
Fig.5 Changes in TVB-N and TBA value of sturgeon during 4°C and -3°C storage

冷藏($P<0.05$),第6天TVB-N值为(16.10±0.23) mg/100 g,第18天为(18.26±0.37) mg/100 g,仍未超过腐败限值20 mg/100 g。这是由于微冻处理能够显著抑制微生物的繁殖代谢和内源酶活力,减缓其对鱼肉蛋白质的分解,使胺类和氨类等碱性物质的积累减小(杨胜平,2010)。

脂质氧化是引起水产品风味劣化的重要原因之一,硫代巴比妥酸值(TBA)是表征水产品脂肪氧化程度的常用指标。图5反映了鲟鱼肉TBA值的变化情况,在整个贮藏期间,2种不同贮藏温度的鲟鱼肉TBA含量呈逐渐增加的趋势。冷藏样品的TBA值从最初的(0.35±0.06) mg/kg增加到第6天的(2.59±0.10) mg/kg,脂肪氧化会产生酮、醛类等挥发性物质,当TBA值高于2.2时,鱼类有明显腥臭味(刘奇,2013)。微冻的样品在第18天TBA值才达到(1.78±0.08) mg/kg,表明微冻处理可以在一定程度上延缓脂质的氧化,使鲟鱼肉能够在较长时间内保持良好的风味,这可能与微冻能更好抑制鲟鱼脂肪氧化酶的活力有关(徐永霞等,2016)。

2.5 物理指标分析

2.5.1 质构分析

鱼体宰杀后,其肌肉的质构特性是评价鱼肉新鲜度及品质质量的一个重要方面,在所有的质构指标中,硬度、弹性和咀嚼性是其中最重要的,消费者可根据这些指标来判定鱼肉是否新鲜。高昕等(2010)研究表明,冷藏过程中鲟鱼(*Lateolabrax japonicus*)硬度、弹性和咀嚼性等指标均呈现减小的趋势,肌肉细胞间结合力下降,口感质量降低。表2和表3显示了4℃冷藏和微冻贮藏鲟鱼肉在贮藏期内的这3个质构指标的变化趋势。随着贮藏时间的延长,2种贮藏条件下的鲟鱼肉硬度、弹性均呈现不同程度的降低趋势。4℃冷藏条件下,鱼肉的硬度和弹性在第4天时即已比新鲜鱼肉显著降低。微冻贮藏条件下,硬度在第9天时出现显著降低,而弹性则在第3天时已出现显著降低。咀嚼性是指把固态食品咀嚼为能够吞咽的状态所需要的能量,表3数据可以看出,随着时间延长,咀嚼性也呈现明显的降低趋势,表明鱼肉纤维的结构被一定程度地破坏,这与硬度和弹性的下降是对应的。蒋晓庆(2016)在研究草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)在冰藏和微冻条件下质构品质变化过程中发现,由胶原蛋白酶引起的胶原蛋白降解与鱼肉硬度下降存在一定的关联,另外,冰晶形成对其肌纤维结构的破坏可能是影响其贮藏末期感官评分主要因素。

表2 鲟鱼肉在冷藏过程中的质构变化

Tab.2 Changes in texture of sturgeon during 4℃ storage

贮藏天数 Storage time (d)	硬度 Hardness (N)	弹性 Springiness (mm)	咀嚼性 Chewiness (mJ)
0	52.967±3.235 ^a	1.890±0.108 ^a	17.410±3.784 ^a
2	51.867±3.612 ^a	1.733±0.040 ^a	13.033±1.429 ^b
4	40.700±3.315 ^b	1.523±0.045 ^b	9.303±0.733 ^{cd}
6	35.033±1.950 ^b	1.187±0.086 ^b	6.387±1.084 ^d

注:不同的字母表示各组之间存在显著性差异($P<0.05$)。下同

Note: Mean values with different letters (a, b, c, and d) for each group differ significantly at $P<0.05$. The same as below

表3 鲟鱼肉在微冻贮藏过程中质构变化

Tab.3 Changes in texture of sturgeon during -3℃ storage

贮藏天数 Storage time (d)	硬度 Hardness (N)	弹性 Springiness (mm)	咀嚼性 Chewiness (mJ)
0	52.967±3.235 ^a	1.890±0.108 ^a	17.410±3.784 ^a
3	50.900±1.127 ^{ab}	1.623±0.062 ^{bc}	17.133±0.469 ^a
6	47.833±3.557 ^{ab}	1.560±0.165 ^b	12.700±3.655 ^b
9	42.800±2.691 ^{bc}	1.617±0.046 ^c	12.280±0.661 ^b
12	41.400±1.700 ^b	1.553±0.064 ^c	11.043±1.686 ^{bc}
15	32.600±0.866 ^{bd}	1.420±0.038 ^c	7.493±1.963 ^d
18	27.333±1.504 ^d	1.227±0.086 ^d	7.387±3.277 ^{cd}

2.5.2 水分状态分析

低场核磁技术(LF-NMR)近年来被广泛应用于食品领域研究,通过分析 T_2 弛豫时间的长短可以判断食品中自由水、结合水和不易流动水的状态。臧秀(2017)研究表明,海参干燥过程中水分分布与弛豫时间和信号幅值均有很好相关性。弛豫时间越短,表明水分子与大分子结构结合越紧密,弛豫时间越长,表明水分子越自由。图6中 T_{21} 峰(0.01~10 ms)为结合水峰, T_{22} 峰(10~150 ms)为不易流动水峰, T_{23} 峰(大于150 ms)为自由水与加热溢出的部分油脂。贮藏末期相比于储存初期,不易流动水的弛豫时间 T_{22} 和自由水的弛豫时间 T_{23} 逐渐向右移动,且弛豫时间变长,说明水分的流动性随着储藏时间的延长而增加。而微冻条件下,贮藏末期的自由水含量明显高于冷藏末期,结合水含量明显低于冷藏末期,这表明微冻条件会增加鱼肉的汁液流失率(Sivertsvik *et al.*, 2003),这与前文鱼肉质构指标的下降是对应的。

2.5.3 挥发性物质分析

电子鼻具有10个高灵敏度传感器,对应不同类型的挥发性化合物。本研究通过电子鼻传感器测定4℃和微冻贮藏条件下不同时期

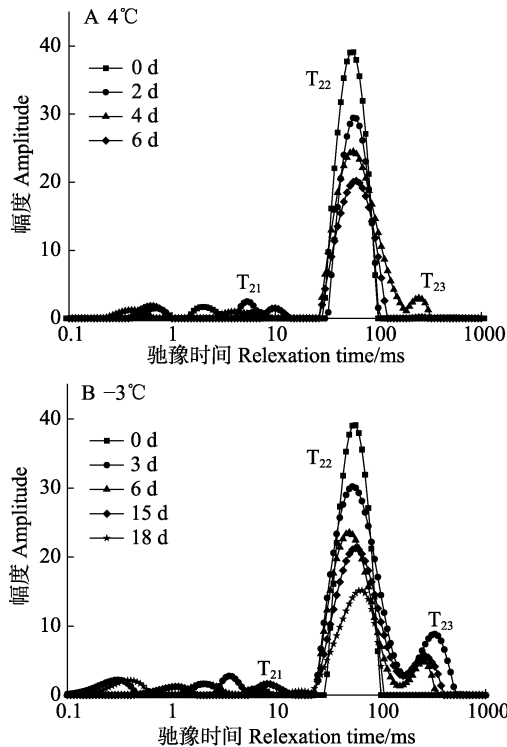


图 6 鲟鱼肉在冷藏与微冻贮藏过程中 T₂ 弛豫图谱
Fig.6 T₂ relaxation spectrum of sturgeon during 4°C and -3°C storage

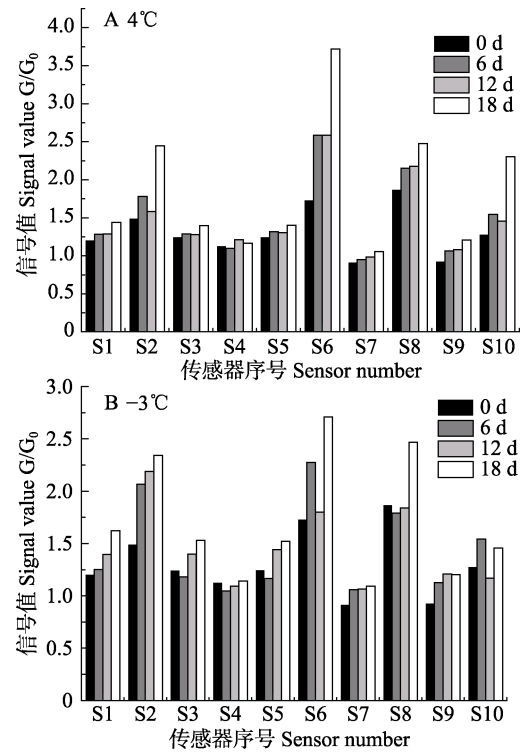


图 7 鲟鱼肉在冷藏与微冻贮藏过程中挥发性物质的变化
Fig.7 Changes in volatile substances of sturgeon during 4°C and -3°C storage

表 4 PEN3 电子鼻传感器构成

Tab.4 Composition of sensors in PEN3 electronic nose

传感器 Sensors	性能描述 Property description	代表性化合物 Representative compound	相应阈值 Threshold (ml/m ³)
S1	对芳香成分敏感	C ₇ H ₈	10
S2	对氮氧化物敏感	NO ₂	1
S3	对氨水、芳香成分敏感	C ₆ H ₆	10
S4	主要对氢气有选择性	H ₂	100
S5	对烷烃芳香成分敏感	C ₃ H ₈	1
S6	对甲烷灵敏	CH ₄	100
S7	对硫化物灵敏	H ₂ S	1
S8	对乙醇灵敏	CO	100
S9	对有机硫化物灵敏	H ₂ S	1
S10	对烷烃灵敏	CH ₄	10

的样品中挥发性物质组成。本实验提取 10 个传感器稳定后第 65 s 的响应值,如图 7 所示,鲟鱼肉在不同贮藏条件下,随着时间的推移,电子鼻信号特征均会发生显著变化。其中,2 号可能是由于蛋白质的氧化或降解产生的物质,6 号和 8 号响应值迅速增大,感官上出现较为明显的鱼腥味和轻微的酸败气味。4°C 条件下,10 号响应值在贮藏末期也显著增大。相较

于 4°C 冷藏条件,微冻鲟鱼肉在贮藏后期,几种挥发性物质的响应值较低,在 6 号和 10 号上表现尤为明显。这与感官评价中微冻贮藏后期气味指标评分没有显著降低也是相对应的。卞瑞姣等(2017)对于秋刀鱼(*Cololabis saira*)的电子鼻研究结果与之相近,贮藏后期 6~10 号响应值相对较大,共同构成了秋刀鱼强烈的鱼腥味和酸败气味。

2.6 微观结构分析

组织学特征是研究水产品肌肉结构的基础,也是评价肌肉品质的重要因素。Kaale 等(2013)研究表明,不论冻结速度如何,微冻处理中冰晶的形成都是影响肌肉组织形态的关键因素。图 8 为鲟鱼肌肉纵切面的扫描电镜照片。图 8-1 为 4°C 贮藏过程中鱼肉的微观结构变化,可以看出新鲜鲟鱼的肌肉纤维非常清晰,排列整齐有序,并且能够清晰观察到肌节单位和肌原纤维的网状结构。随着贮藏时间的延长,鱼肉在自身蛋白酶和微生物的作用下,结缔组织被降解,导致网状结构消失,肌原纤维发生粘黏。微冻贮藏图 8-2B 的鲟鱼肌肉纤维微观结构要比冷藏(图 8-1C)更清晰,说明微冻在贮藏前期对肌原纤维降解、微观组织结构的劣变与蛋白酶活性有一定的抑制作用,能更好地保持肌肉纤维结构完整性,但在微冻贮藏中后期,

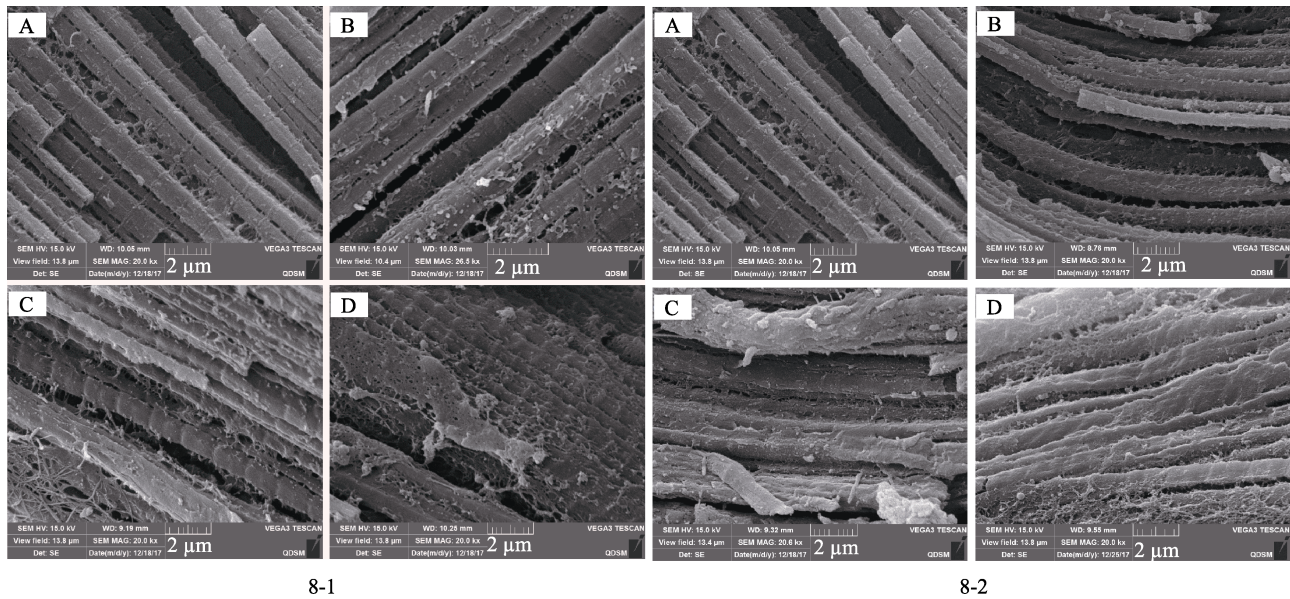


图8 扫描电镜下冷藏与微冻鲟鱼肌肉微观结构

Fig.8 Changes in microstructure of sturgeon muscles during 4°C and -3°C storage

8-1: A: 新鲜鲟鱼样; B: 冷藏 2 d; C: 冷藏 4 d; D: 冷藏 6 d

8-2: A: 新鲜鲟鱼样; B: 微冻 6 d; C: 微冻 12 d; D: 微冻 18 d

8-1: A: Fresh sturgeon; B: storage at 4°C for 2 days; C: Storage at 4°C for 4 days; D: Storage at 4°C for 6 days

8-2: A: Fresh sturgeon; B: storage at -3°C for 6 days; C: storage at -3°C for 12 days; D: storage at -3°C for 18 days

肌肉纤维则呈现较为明显的劣化,肌节逐渐消失,这也是造成感官评分中微冻组鱼肉组织结构和肌肉弹性指标得分明显降低的原因。

3 结论

4°C冷藏条件下,鲟鱼肉 TVB-N、TBA 与菌落总数等指标劣化较快,导致感官评分也随之迅速下降,其贮藏期为 6 d。-3°C微冻条件下,鲟鱼肉的 pH 值呈先下降后上升的趋势,贮藏后期,硬度和弹性等质构指标值持续降低,感官评分也因此呈降低趋势;微冻鲟鱼肉的自由水与结合水比例呈上升趋势,表明鲟鱼肉在贮藏后期持水性逐渐下降;TVB-N、TBA 与菌落总数均呈现上升趋势,但在贮藏末期也并未超过鲜冻水产品卫生限值。观察其微观结构,随着贮藏时间的延长,肌纤维之间出现粘黏,肌节逐渐由清晰变为模糊。综合各指标的变化规律,确定了-3°C微冻条件下其贮藏期为 18 d,相比 4°C冷藏鲟鱼肉的贮藏期 6 d 延长了 2 倍,表明微冻可明显延缓品质劣化趋势。本研究探明了冷藏与微冻贮藏条件下鲟鱼肉的贮藏期,并初步探明微生物并不是微冻鲟鱼肉品质劣化的主要因素,而冰晶形成和蛋白酶对其肌纤维的破坏可能是更为重要的原因,为鲟鱼肉的冷鲜贮藏与多元化销售提供了理论基础。本研究对其品质劣化的机理探

究不够深入,在后期研究中将继续从冰晶形成和蛋白酶角度深入探究微冻鲟鱼肉的品质变化机理。

参 考 文 献

- Banerjee R, Maheswarappa NB. Superchilling of muscle foods potential alternative for chilling and freezing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017(4): 1-8
- Bian RJ, Cao R, Zhao L, *et al.* Application of the electronic nose for assessing the freshness of *Cololabis saira*. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 243-247, 260 [卞瑞姣, 曹荣, 赵玲, 等. 电子鼻在秋刀鱼鲜度评定中的应用. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 243-247, 260]
- Bureau of Fisheries and Fisheries Law Enforcement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2017 [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, 2017]
- Chen S, Li TT, Li H, *et al.* Changes in freshness and quality of silver carp fillets during chilled and partial freezing storage. *Food Science*, 2015, 36(24): 297-301 [陈思, 李婷婷, 李欢, 等. 白鲢鱼片在冷藏和微冻条件下的鲜度和品质变化. *食品科学*, 2015, 36(24): 297-301]
- Dong J, Hu JJ, Wang Q, *et al.* Effect of immersion chilling and freezing technique on sturgeon quality during frozen storage. *Food Science*, 2017, 38(5): 281-287 [董佳, 胡嘉杰, 王庆, 等. 液体浸渍冷冻对鲟鱼贮藏过程中品质的影响. *食品*

- 科学, 2017, 38(5): 281–287]
- Fan Y, Hou H, Sun CY, *et al.* Effects of processing methods on the moisture status change of Russian sturgeon (*Acipenser gueldensti* Brandt). *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(6): 97–102 [樊燕, 侯虎, 孙晨阳, 等. 加工方式对俄罗斯鲟鱼肉水分状态的影响. *中国食品学报*, 2017, 17(6): 97–102]
- Gao X, Han F, Xu JC, *et al.* Freshness and texture changes of *Lateolabrax japonicus* meat during partially frozen storage. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1294–1302 [高昕, 韩芳, 许加超, 等. 微冻贮藏条件下鲈鲜度和质构变化. *水产学报*, 2010, 34(8): 1294–1302]
- Hu Y. Studies on the superchilling technology of hairtail (*Trichiurus haumela*). Master's Thesis of Zhejiang University, 2016, 1–82 [胡玥. 带鱼微冻保鲜技术研究. 浙江大学硕士学位论文, 2016, 1–82]
- ICMSF (International Committee on Microbiological Specifications for Foods). Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. New Jersey: Blackwell Scientific Publications, 1986, 288
- Jiang ST, Lee TC. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 839–844
- Jiang XQ. Study on collagen change and quality control of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets during chilling storage. Master's Thesis of Jiangnan University, 2016, 1–75 [蒋晓庆. 草鱼片低温贮藏过程中胶原变化及品质控制研究. 江南大学硕士学位论文, 2016, 1–75]
- Kaale LD, Eikevik TM, Rustad T, *et al.* Ice crystal development in pre-rigor Atlantic salmon fillets during superchilling process and following storage. *Food Control*, 2013, 31(2): 491–498
- Kaale LD, Eikevik TM, Rustad T, *et al.* Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering*, 2011, 107(2): 141–146
- Kaale LD, Eikevik TM. The development of ice crystals in food products during the superchilling process and following storage, a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2014, 39(2): 91–103
- Li BB, Gong H, Ai YW, *et al.* Study on shelf-life and quality of fresh sturgeon meat under commercial conditions. *Food Science and Technology*, 2018, 43(4): 122–127, 135 [李贝贝, 龚恒, 艾有伟, 等. 市售条件下冷鲜鲟鱼肉贮藏期及品质变化规律研究. *食品科技*, 2018, 43(4): 122–127, 135]
- Liu DS. Quality changes of grass carp muscle during partial-frozen and iced storage. Master's Thesis of Jiangnan University, 2012, 1–54 [刘大松. 草鱼肉在微冻和冰藏保鲜中的品质变化及其机理. 江南大学硕士学位论文, 2012, 1–54]
- Liu Q. Study on the off-flavor compounds character of sturgeon and their relationship with lipid oxidation. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 1–102 [刘奇. 鲟鱼腥
- 味物质特征及其与脂肪酸氧化的关系研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–102]
- Lu H, Luo YK, Zhou ZY, *et al.* The quality changes of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*) during partial freezing and chilled storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014, 38(3): 948–954
- Magnussen OM, Haugland A, Hemmingsen AKT, *et al.* Advances in superchilling of food—Process characteristics and product quality. *Trends in Food Science and Technology*, 2008, 19(8): 418–424
- Mi HB, Qian CL, Zhao YY, *et al.* Comparison of superchilling and freezing on the microstructure, muscle quality and protein denaturation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 2013, 37(5): 546–554
- Shen N, Wu TT, Li Y, *et al.* Effect of chilling storage on the muscle protein of hairtail. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 196–202 [沈妮, 吴甜甜, 李苑, 等. 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]
- Sivertsvik M, Rosnes JT, Kleiberg GH. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, 2003, 68(4): 1467–1472
- Sun B, Zhao Y, Yu J, *et al.* The combined efficacy of superchilling and high CO₂ modified atmosphere packaging on shelf life and quality of swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2017, 26(6): 655–664
- Tu BX, Lou YJ, Liu YG. Sharp freezing effects on the quality of frozen stored *Larimichthys crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 55–59 [屠冰心, 娄永江, 刘永固. 低温速冻处理对养殖大黄鱼冻藏品质的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 55–59]
- Xu YX, Zhang CM, Zhao JM, *et al.* Quality changes of *Paralichthys olivaceus* during partial freezing and refrigerated storage. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(4): 337–341, 346 [徐永霞, 张朝敏, 赵佳美, 等. 微冻和冷藏对牙鲆贮藏品质的影响. *食品工业科技*, 2016, 37(4): 337–341, 346]
- Yang SP. Study on biopreservation technology and modified atmosphere packaging of *Trichiurus haumela*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2010, 1–64 [杨胜平. 带鱼生物保鲜剂及气调包装保鲜技术的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–64]
- Zang X. Quality monitoring analysis of sea cucumber during drying process by low field nuclear magnetic resonance and imaging technology. Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2017, 1–61 [臧秀. 低场核磁共振及成像技术监测海参干制过程中的品质变化. 大连工业大学硕士学位论文, 2017, 1–61]
- Zhu GP. Discussion and reflection on the industrialization

development of sturgeon industry in China. *Hubei Agricultural Sciences*, 2017, 56(19): 3708–3710 [朱国平. 中国鲟鱼产

业化发展的探讨与思考. *湖北农业科学*, 2017, 56(19): 3708–3710]

(编辑 陈辉)

Changes in Quality of Sturgeon Fillet During 4°C and –3°C Partial Freezing Storage

CHEN Yiping¹, CUI Wenxuan², GAO Ruichang³, LI Jianpeng¹,
ZENG Mingyong¹, TANG Shuwei¹, FENG Qiufeng¹, ZHAO Yuanhui¹①

(1. *College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003;*

2. *Penglai Aquatic Product Technology Promotion Department, Penglai 265600;*

3. *School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013*)

Abstract In this work, changes in the quality and storage life of sturgeon fillets were compared during –3°C partial freezing storage and 4°C storage in order to develop a method that will improve the storage quality of sturgeon fillets. Several indicators including sensory evaluation, total visible colonies (TVC), pH value, volatile base nitrogen value (TVB-N), thiobarbituric acid (TBA), texture, volatile substances, moisture distribution state, and microstructure changes of muscle fibers were studied and were later used to evaluate the effect of two temperature storages on the quality of sturgeon fillets. The results showed that the proportion of free water and combined water, TVB-N, TBA, and TVC of sturgeon fillets stored at 4°C and –3°C increased with the extension of storage time, whereas texture indices such as hardness and springiness and the score of sensory evaluation showed a decreasing trend. Microstructure observations illustrated that stickiness appeared between the muscle fibers, and the sarcomere gradually became blurred with the extension of storage time, especially during the later period of –3°C partial freezing storage. Interestingly, its chemical indicators including TVB-N and TBA did not exceed the hygienic limits, whereas sensory evaluation rates were unacceptable. Taking all these indicators into consideration, it was observed that the storage life of sturgeon fillet was 6 days at 4°C and 18 days at –3°C. It can therefore be concluded that partial freezing temperature storage (–3°C) maintained the quality of sturgeon fillets much longer compared with storage at 4°C. Microbes have a small effect on the decay process of sturgeon fillets, whereas ice crystal formation and endogenous cathepsin may be the main influencing factors that led to the destruction of its structure during –3°C partial freezing storage. Results of this study will enrich the basic theory of aquatic products and provide a technique for sturgeon fillets storage.

Key words Sturgeon; Partial freezing; Microstructure; Quality change; Storage life

① Corresponding author: ZHAO Yuanhui, E-mail: zhaoyuanhui@ouc.edu.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李健 LI Jian	李军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美国)CHEN Yong
林洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐跑 XU Pao
徐皓 XU Hao	黄健 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 李健 LI Jian 孔杰 KONG Jie

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41卷 第1期 2020年2月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.41 No.1 Feb. 2020

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕

印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发刊

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986200