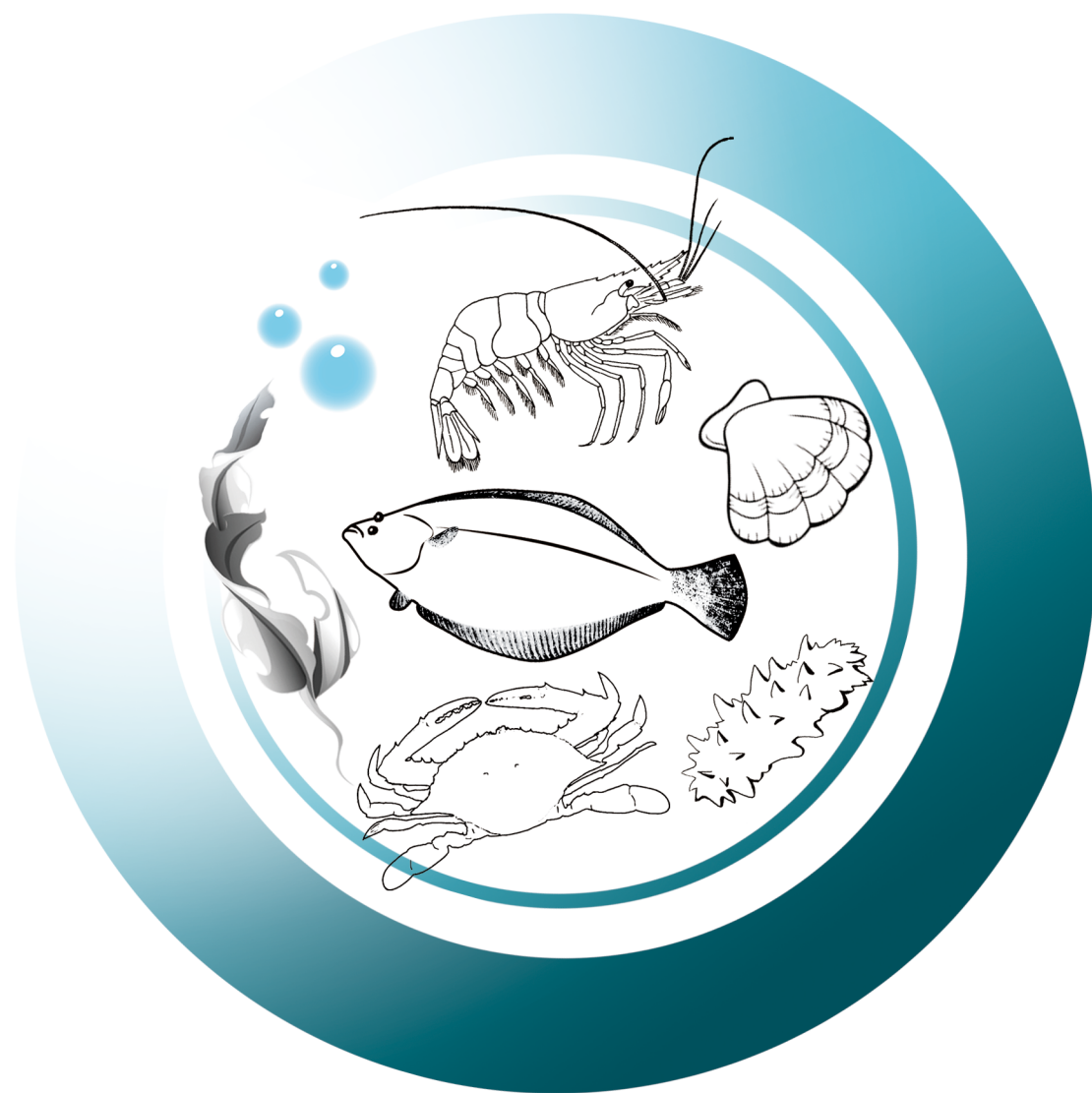


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第41卷 VOL.41 第3期 NO.3



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 3 期

2020 年 6 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

- 基于 GNOME 的溢油污染渔业资源损失评估.....毕研军 刘心田 宋协法 董登攀 (1)
- 海洋酸化对颗石藻生理特性的影响.....黄书杰 徐 东 王东升 张现盛 叶乃好 (11)
- 极北海带对氮、磷吸收和砷、镉、铅吸附的研究.....袁艳敏 刘福利 杜欣欣 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 (25)
- 基于 IBR 模型的 Cu²⁺对厚壳贻贝的毒性效应研究.....李 磊 平仙隐 宋 炜 蒋 玫 黄 艇 王鲁民 (32)
- 布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应影响的数值模拟研究.....
.....王佳浩 刘莉莉 蔡新晨 陈佳滢 杨意馨 姜书侠 (40)
- 半滑舌鳎甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1 基因的克隆及表达分析.....
.....王 倩 张 雪 陈亚东 沙珍霞 (49)
- 卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量.....
.....于万峰 林黑着 黄 忠 虞 为 周传朋 谭连杰 荀鹏伟 黄倩倩 黄小林 (60)
- 四指马鲛淋巴器官发育组织学观察.....蓝军南 温久福 李俊伟 区又君 周 慧 李加儿 李 活 (70)
- 斑石鲷 TGF-β1 基因克隆和表达分析.....王 杉 徐文腾 李 明 王 洁 王 磊 翟介明 陈松林 (78)
- 低温驯化下斑马鱼 LINE1 的表达检测.....陶筱帆 谢婷婷 李小霞 罗军涛 白雅静 韩兵社 张俊芳 (88)
- 正反交奥尼罗非鱼形态性状差异及对体质量的影响.....
.....陈炳霖 肖 炜 邹芝英 祝璟琳 李大宇 喻 杰 杨 弘 胡平各 马银花 (94)
- 凡纳滨对虾 6 个国内群体的遗传背景分析.....
.....李旭鹏 栾 生 曹宝祥 罗 坤 谭 建 孔张伟 孟宪红 孔 杰 (103)
- 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术.....陈 维 魏守祥 李禹含 潘鲁青 (111)
- 短期高盐胁迫对脆江蓠抗氧化酶活性及光合酶活性的影响.....
.....徐 涵 薛素燕 李加琦 丁敬坤 霍恩泽 张雯雯 毛玉泽 方建光 (119)
- UV-B 紫外辐射对条斑紫菜生理生化的影响.....潘 雪 茅云翔 王俊皓 曹 敏 毕桂萁 杜国英 (125)
- 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响.....
.....杨运楷 宋晓玲 王海亮 谢国驷 黄 捷 (133)
- 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析.....兰 欣 李 杰 李贵阳 肖 鹏 莫照兰 (142)
- 大口黑鲈弹状病毒的分离培养及其卵黄抗体的制备.....
.....袁雪梅 吕孙建 施伟达 杭小英 刘 莉 吴颖蕾 (151)
- 金乌贼端粒酶逆转录酶基因鉴定和组织差异表达分析.....
.....项子龙 刘长琳 张金勇 胡 鹏 何暮春 柳淑芳 庄志猛 薛同明 (158)
- 综述
- 捕捞诱导鱼类生物学特征进化研究进展.....单秀娟 胡芷君 邵长伟 唐 政 (165)
- α-黑素细胞刺激素及黑皮质素受体-4 在能量平衡和繁殖中的功能研究.....
.....温海深 张 莹 冯启超 侯志帅 齐 鑫 李 昀 (176)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.41 No.3 June 2020

Oil Spill Pollution and Fishery Resource Loss Assessment Based on GNOME	
..... BI Yanjun, LIU Xintian, SONG Xiefa, DONG Dengpan	(1)
Effects of Ocean Acidification on Physiological Characteristics of Coccolithophores	
..... HUANG Shujie, XU Dong, WANG Dongsheng, ZHANG Xiansheng, YE Naihao	(11)
Study on the Assimilation of Nitrogen and Phosphorus and on the Sorption of Heavy Metals in <i>Laminaria hyperborea</i>	
..... YUAN Yanmin, LIU Fuli, DU Xinxin, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao	(25)
Toxic Effects of Copper Ion in <i>Mytilus coruscus</i> : An Integrated Biomarker Approach	
..... LI Lei, PING Xianyin, SONG Wei, JIANG Mei, HUANG Ting, WANG Lumin	(32)
Numerical Simulation Study on Influence of Disposal Space on Effects of Flow Field Around Porous Square Artificial Reefs	
..... WANG Jiahao, LIU Lili, CAI Xinchun, CHEN Jiaying, YANG Yixin, JIANG Shuxia	(40)
Cloning and Expression Analysis of the <i>MASP1</i> Gene from the Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... WANG Qian, ZHANG Xue, CHEN Yadong, SHA Zhenxia	(49)
Dietary Selenium Requirement of Golden Pompano (<i>Trachinotus ovatus</i>)	
..... YU Wanfeng, LIN Heizhao, HUANG Zhong, YU Wei, ZHOU Chuanpeng, TAN Lianjie, XUN Pengwei, HUANG Qianqian, HUANG Xiaolin	(60)
Histological Observations on the Early Development of Lymphoid Organs in <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	
..... LAN Junnan, WEN Jiufu, LI Junwei, OU Youjun, ZHOU Hui, LI Jiaer, LI Huo	(70)
Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of <i>TGF-β1</i> in Spotted Knifejaw (<i>Oplegnathus punctatus</i>)	
..... WANG Shan, XU Wenteng, LI Ming, WANG Jie, WANG Lei, ZHAI Jieming, CHEN Songlin	(78)
Expression of <i>LINE1</i> in Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) During Cold Acclimation	
..... TAO Xiaofan, XIE Tingting, LI Xiaoxia, LUO Juntao, BAI Yajing, HAN Bingshe, ZHANG Junfang	(88)
Correlation Analysis and Morphological Difference and Contributions to Body Weight of Reciprocally-Crossed Subgroups of <i>Oreochromis niloticus</i> × <i>O. Aureus</i>	
..... CHEN Binglin, XIAO Wei, ZOU Zhiying, ZHU Jinglin, LI Dayu, YU Jie, YANG Hong, HU Pingge, MA Yinhua	(94)
Genetic Background Analysis of Six Groups of White Shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> in China Using SSR Markers	
..... LI Xupeng, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LUO Kun, TAN Jian, KONG Zhangwei, MENG Xianhong, KONG Jie	(103)
Isolation and Identification of Subcellular Fractions from Digestive Glands of <i>Chlamys farreri</i>	
..... CHEN Wei, WEI Shouxiang, LI Yuhan, PAN Luqing	(111)
Effects of Short Period High-Salinity Stress on Antioxidant Enzyme Activities and Photosynthesis Enzyme Activities of <i>Gracilaria chouae</i>	
..... XU Han, XUE Suyan, LI Jiaqi, DING Jingkun, HUO Enze, ZHANG Wenwen, MAO Yuze, FANG Jianguang	(119)
Effects of UV-B Ultraviolet Radiation on the Physiology and Biochemistry of <i>Pyropia yezoensis</i>	
..... PAN Xue, MAO Yunxiang, WANG Junhao, CAO Min, BI Guiqi, DU Guoying	(125)
Effect of A Compound Probiotics on the Ability of <i>Litopenaeus vannamei</i> to Resist <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Infection	
..... YANG Yunkai, SONG Xiaoling, WANG Hailiang, XIE Guosi, HUANG Jie	(133)
Sequencing and Phylogenetic Analysis of the 16S rRNA Genes of Bacterial Strains Isolated from Diseased Flatfish	
..... LAN Xin, LI Jie, LI Guiyang, XIAO Peng, MO Zhaolan	(142)
Isolation and Egg-Yolk Antibody Preparation of <i>Micropterus salmonides</i> Rhabdovirus	
..... YUAN Xuemei, LV Sunjian, SHI Weida, HANG Xiaoying, LIU Li, WU Yinglei	(151)
Gene Identification and Tissue Differential Expression Analysis of <i>Sepia esculenta</i> Telomerase Reverse Transcriptase	
..... XIANG Zilong, LIU Changlin, ZHANG Jinyong, HU Peng, HE Muchun, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng, XUE Tongming	(158)
Progress in the Study of Fishing-Induced Evolution of Fish Biological Characteristics	
..... SHAN Xiujian, HU Zhijun, SHAO Changwei, TANG Zheng	(165)
The Functions of α-Melanocyte Stimulating Hormone and Melanocortin-4 Receptor During Energy Homeostasis and Reproduction	
..... WEN Haishen, ZHANG Ying, FENG Qichao, HOU Zhishuai, QI Xin, LI Yun	(176)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190312002

http://www.yykxjz.cn/

毕研军, 刘心田, 宋协法, 董登攀. 基于 GNOME 的溢油污染渔业资源损失评估. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 01-10
Bi YJ, Liu XT, Song XF, Dong DP. Oil spill pollution and fishery resource loss assessment based on GNOME. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 01-10

基于 GNOME 的溢油污染渔业资源损失评估*

毕研军¹ 刘心田² 宋协法^{1①} 董登攀¹

(1. 中国海洋大学水产学院海洋渔业系 青岛 266003; 2. 威海市渔业技术推广站 威海 264200)

摘要 基于 GNOME 溢油模型模拟“世纪之光”轮沉没溢油事件的漂移轨迹和扩散分布。采用 FVCOM 水动力模型模拟建立潮流场, 与《潮汐表》的结果基本吻合。采用美国国家环境预报中心(NCEP)的环境预报系统再分析资料(CFSR)的风场, 通过 GNOME 溢油模型进行数值模拟, 得出最小遗憾轨迹跟最佳预测区域, 并采用泰森分析法进行污染面积分析。结果显示, 将 21 h 的模拟结果与 MODIS 遥感监测数据对照发现, 漂移位置基本吻合。参照各种渔业资源的评估标准、海洋生态损害和损失补偿评估的方法, 将模拟结果与拖网调查数据相结合, 分别计算出游泳动物直接经济损失为 6.1 万元, 渔业资源 4 d 内的直接损失为 51.29 万元, 得出“世纪之光”轮 4 d 内的溢油损失已达到了 211.26 万元。本研究将数值模拟方法与渔业资源的评估相互联系, 不通过现场观测就可以对渔业资源的损失进行估算。GNOME 溢油模型可以运用于类似的溢油事故溢油轨迹和扩散的快速预报, 为溢油事故应急响应提供了参考。

关键词 GNOME; 溢油; 渔业资源; 损失评估

中图分类号 S932.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0001-10

随着我国经济的不断发展, 海上运输逐渐增多, 特别是石油运输导致海洋船舶溢油事故逐渐增多。石油泄漏进入海洋, 导致海洋生态环境遭到破坏, 不仅影响浮游植物群落(宋广军等, 2016)及其他海洋生物, 在养殖区还会影响养殖生物的产量和品质, 进而影响人类的健康, 海洋船舶溢油事故已经引起了广大人民的普遍关注。

由于海洋船舶溢油事故发生的地点、时间不同, 在溢油事故发生后, 很难准确地鉴定溢油的范围。对于事故发生后渔业资源等方面的评估工作、恢复工作也带来了不小的难题。自 1950 年开始, 有大批国内外学者更新研究和改进溢油模型的运算过程, 在水动力的基础上研究开发了不同类型、不同功能的溢油模型。溢油模型发展可分为第 1 代、第 2 代、第 3 代模型(Alan *et al*, 2012)。国外对溢油行为及其归宿预报的

研究发展较早, 比较有代表性的是 Fay(1969)提出的惯性力、粘性力和表面张力 3 个阶段理论; Shen 等(1987)基于欧拉法提出了模拟油膜在水表面漂移的 ROSS 模型; 汪德胜等(1996)在 ROSS 模型的基础上建立了油在河流中漂移的 ROSS2 双层数学模型。

20 世纪 80 年代中期, ASCE Task Committee (1996) 研究开发出了“油粒子”模型; 瞿波等(2009)运用 f Bm 模型研究海上污染物的运动规律; 郭为军(2011)在模拟大连附近海域“阿提哥”号油轮溢油事故中运用 f Bm 模型模拟, 其模拟结果和卫星观测数据相吻合; 郭为军(2007)采用 POM 普林顿海洋模型作为流场模拟海洋溢油。其他运用到溢油当中的模型还有油-水两相双流体模型(沈永明等, 1992)、单组份溢油风化模型(Blokker, 1964)、IKU 风化模型(Stiver, *et al*, 1984)、OSIS 风化模型(Leech *et al*, 1993)、ADIOS 风化模型

* 国家重点研发计划项目(2016YFC0503600)资助 [This work was supported by National Research and Development Program of China (2016YFC0503600)]. 毕研军, E-mail: 1021471631@qq.com

① 通讯作者: 宋协法, 教授, E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-03-12, 收修改稿日期: 2019-04-01

(Lehr *et al.*, 1992)、Navy模型(Webb *et al.*, 1970)、OSCAR模型(Mark *et al.*, 1999)、OILMAP模型(孙俊等, 2002)、GNOME模型和FVCOM水动力模型(陈波昌等, 2013)等。

本研究参照丁东生等(2016)的方法,以 GNOME (General NOAA Operational Modeling Environment)溢油模型为基础,在 FVCOM 模拟的流场与美国国家环境预报中心(NCEP)的环境预报系统再分析资料的风场条件下,对“世纪之光”轮溢油事故进行数值模拟,并通过遥感数据进行验证。确定污染范围之后,通过渔业资源评估的技术方法,结合数值模拟确定渔业资源的损失,从溢油检测到资源评估形成业务化体系。

1. 材料与方法

1.1 GNOME 溢油模型

GNOME 是免费提供溢油轨迹预测的专业溢油模型,模型由 HAZMAT(NOAAO R & R, 美国)危险品应急反应部门研究开发(张彩霞, 2013)。GNOME 模型包含标准模式、GIS 输出模式和诊断模式,可以通过 GNOME 模型的诊断模式对风场、流场及其他影响因素进行设定,预测溢油的最佳轨迹。通过设置流场、风场的不确定性对轨迹进行最小遗憾预测(90%置信区间分布)。

模型中通过设置岸线数据(地图数据)、流场数据、风场数据、溢油位置、溢油污染物类型、某些特殊环境因素等条件,对 GNOME 模型进行控制。黑色点为最佳预测区域油粒子分布,红色点为不确定性因素存在造成的最小遗憾轨迹粒子分布,流场数据与风场数据合成漂移速度。之后,将 GNOME 模型输出数据使用导入工具导入 Arcgis 中与地图进行整合,画图,再进行进一步的分析。

1.2 FVCOM 水动力模型

FVCOM (Finite Volume Coast and Ocean Model)模型是一套结合溢油预报的原始方程组、三角形网格划分等多功能海洋水动力模型(杨红等, 2013)。与 2 种常用的解决大洋环流模型(有限差分方法、有限元方法)相比,具有精度高、运行简单、边界容易拟合、计算简便、几何灵活等优点。FVCOM 模型通过离散控制方程,以三角形网格为单元,在三角形网格中结合数学计算方法,进行积分方程的求解。FVCOM 模型还包括了三维拉格朗日粒子追踪模型、生物模型、沉积模型、海冰模型等。本研究运用 FVCOM 水动力模型对黄、渤海地区的潮流进行数值模拟,将模

拟的潮流带入 GNOME 模型中进行溢油模拟。

1.3 遥感应用

遥感技术是 20 世纪 60 年代开始逐渐发展的一种探测技术,它作为海洋环境监测的一种重要的手段,已经得到了很好的发展和应用。

本研究采用 NASA 提供的 MODIS LIB 数据。MODIS 作为一种中高分辨率的卫星传感器,其通道较多,遥感影像有 250、500 和 1000 m 共 3 种空间分辨率,有 36 个离散光谱波段,其中,2 个波段分辨率为 250 m,5 个波段为 500 m,29 个波段为 1000 m。光谱范围宽为 0.4(可见光)~14.4 μm (热红外)。本研究主要对 MODIS 影像进行选取、处理、增强等,将处理后带有溢油信息的影像与 GNOME 模拟的溢油位置进行对比。

1.4 渔业资源评估办法

根据沈新强等(2014)的方法,以近 3 年事故发生前张网捕捞产量和面积为估算依据,参照各类标准的生物损失率对溢油事故进行评估;丁东生等(2016)通过数值模拟的方法确定溢油面积,通过《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》(DB37/T 1448-2009)对各区域、各类海洋生物生物量的估算,并对渔业资源进行了评估计算;牙韩争等(2014)参照曹妃甸某次生物体密度调查的数据,确定鱼卵、仔鱼死亡率,对污水排海污染造成的鱼卵、仔鱼进行了评估。

1.4.1 调查采样 调查数据选自“908”专项项目中国海洋大学的拖网调查数据。游泳动物调查网口宽度为 47 m。每站拖网时间为 1 h,平均拖速为 3 kn。采用保温箱和冰进行样品的保存。鱼卵、仔稚鱼调查采用口径为 80 cm、长为 270 cm、筛绢孔径为 0.505 mm 的大型浮游生物网进行水平拖曳取样,每次拖网 10 min,拖网速度约为 2 kn。样品采用 5%福尔马林溶液固定,带回实验室进行鉴定和分析。在调查海区共布设 16 个站位,站位设置见图 1。游泳动物资源密度计算采用公式如下:

$$D = \bar{C} / (a \times q)$$

式中, D 为游泳动物资源密度(kg/km^2); \bar{C} 为平均每小时拖网渔获量($\text{kg}/\text{net}\cdot\text{h}$); a 为每小时的拖网面积($\text{km}^2/\text{net}\cdot\text{h}$); q 为可捕系数。可捕系数依据《渔业污染事故经济损失计算方法》(GB/T21678-2008)。

鱼卵、仔稚鱼密度的计算采用滤水体积法。计算公式如下:

$$V = \frac{N}{S \times L}$$

式中, V 为鱼卵、仔稚鱼分布密度(粒/ m^3 , 尾/ m^3); N 为平均每网鱼卵、仔稚鱼数量(粒/尾); S 为网口面积(m^2); L 为水平拖网距离, 垂直拖网为绳长(m)。

1.4.2 游泳动物经济损失 根据《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》(DB37/T 1448-2009)对山东近海 4 个海域的划分, 即山东半岛北部海域、山东半岛南部海域、莱州湾及渤海湾南部海域和海州湾海域。“世纪之光”轮的溢油地点属于山东半岛北部海域, 取山东半岛北部海域浮游动物的单位生物量为 $510 \text{ kg}/\text{km}^2$ 。参照“908”专项项目中国海洋大学于 2006 年 7 月 30 日~8 月 30 日的拖网调查数据, 鱼类、甲壳类和头足类的单位生物量分别为 2684.721 、 25.121 和 $53.334 \text{ kg}/\text{km}^2$ 。计算公式如下:

游泳动物损失量=事发前渔业资源密度 \times 污染面积 \times 损失率

游泳动物直接经济损失=当地水产市场价格 \times 渔业资源损失量

1.4.3 鱼卵、仔稚鱼经济损失 参照中国海洋大学的拖网调查数据, 鱼卵的单位生物量为 $0.0306 \text{ 粒}/\text{m}^3$, 仔鱼的单位生物量为 $0.0274 \text{ 尾}/\text{m}^3$, 参照类似事故中污染海区密度, 鱼卵的单位生物量为 $0.0029 \text{ 粒}/\text{m}^3$, 仔鱼的单位生物量为 0。根据《建设项目对海洋生物资源影响评价技术规程》(SC/T 9110-2007)中对于污染事故中鱼卵和仔稚鱼折算成鱼苗的折算比率, 鱼卵生长成商品鱼苗的成活率按照 1%计算, 仔稚鱼生长成商品鱼苗的成活率按照 5%计算。

运用计算公式:

鱼卵、仔稚鱼损失量=(对照海区密度-污染海区密度) \times 污染面积

鱼卵、仔稚鱼直接经济损失=当地商品苗市场价格 \times 损失量

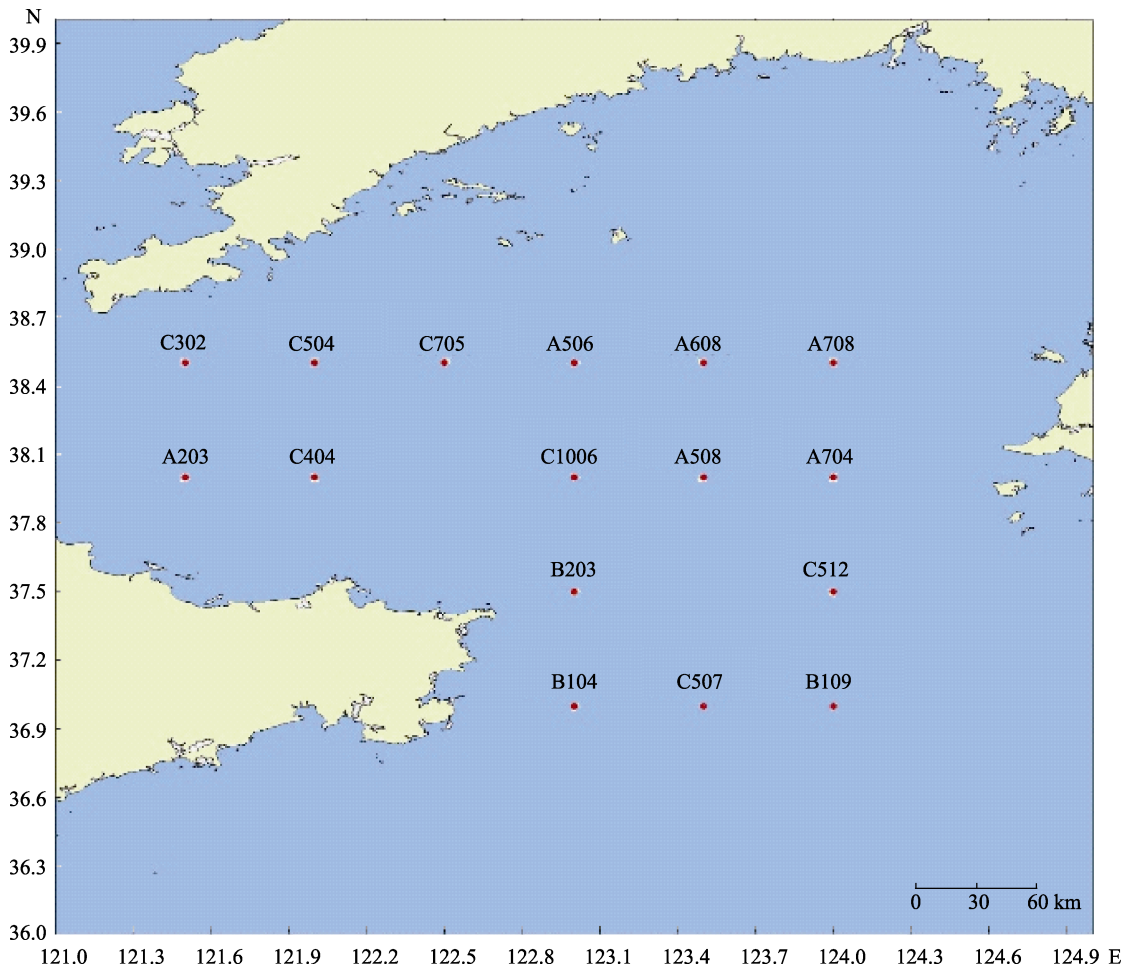


图 1 调查站位分布

Fig.1 Survey station distribution

2 结果与分析

2.1 案例概况

2010年5月2日05:23, 香港籍货轮“世纪之光”(Bright Century)轮与利比亚籍货轮“海盛”(Sea Success)轮在山东威海成山头以东海域(37°38.45'N, 123°7.54'E 附近)发生碰撞(图2), 导致“世纪之光”轮沉没。事故造成“世纪之光”轮大量燃料油外泄, 对事故海域产生了污染。15:30左右观测到黑色油污(呈灰、蓝、褐色)从沉船处间断性的泄漏至海面, 推测为重质原油。事发时, 该轮上存有油类污染物为546.4 m³。沉船点实际水深为65 m, 溢油区域平均水深为60 m。

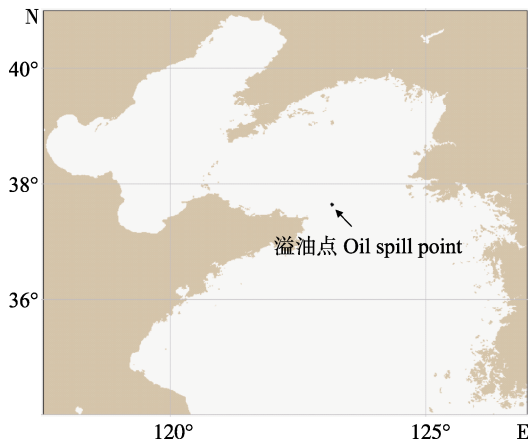


图2 “世纪之光”轮溢油点
Fig.2 Oil spill point of “Century Light”

2.2 水动力模型的建立与验证

溢油模型的流场由FVCOM模拟获得。模型设置初始时间为2010年4月30日15:30, 模拟时间为6 d, 将模拟后4 d的输出结果进行分析。模型网格覆盖范

围为117.5°~127°N, 34°~41°E, 其中, 网格顶点个数为9814个, 网格个数为18700个, AB之间的直线为开边界线, 考虑到开边界的影响, 设置59个开边界点。开边界点的时间和水位由美国俄勒冈大学提供的4个分潮(M2, S2, K1, O1)调和得到, 网格划分见图3。插值水深数据后, 最大水深为111.4 m, 最小水深为1 m。

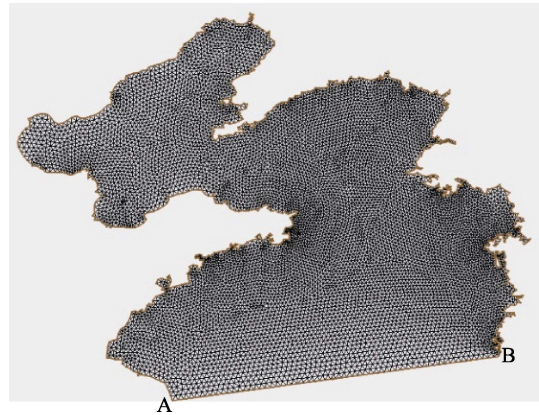


图3 黄、渤海海域网格划分

Fig.3 Mesh division of the Yellow Sea and Bohai Sea

经过4 d模拟得到流速流场数据。末时刻的水深数据、流场数据、水位起伏数据见图4。从图4可以看出, 末时刻最大水深为111.4 m, 最小水深为1 m, 平均水深为35.24 m; u 向流速在5.49 ~ -2.56 m/s之间, 平均 u 向流速为0.01 m/s, v 向流速在2.56 ~ -2.88 m/s之间, 平均 v 向流速为-0.10 m/s。

将FVCOM模拟末时刻的潮流与国家海洋信息中心编辑的2010年《潮汐表》第1册鸭绿江口至长江口数据相对比, 验证点见图5。从图5可以看出, 验证点选择离事故发生较近的A点, 选取模拟最后1 d

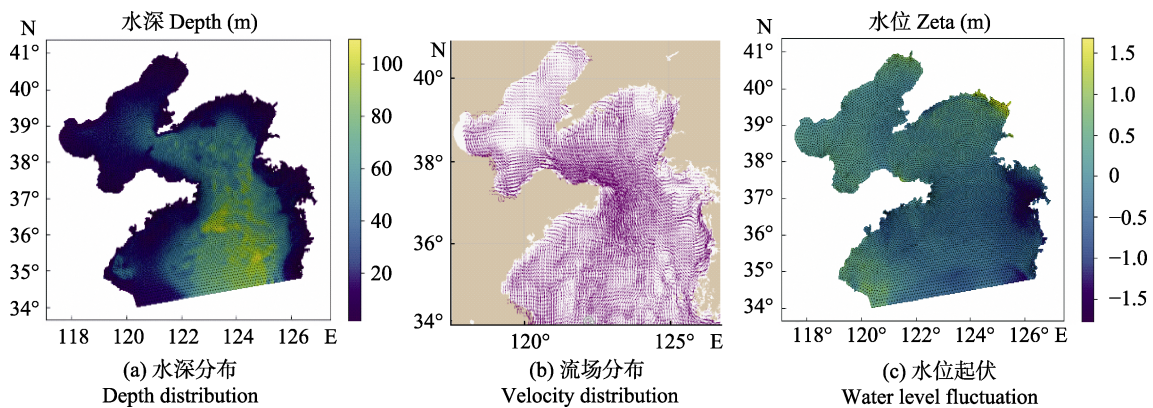


图4 第4天水深流场分布和水位起伏

Fig.4 Water depth distribution velocity distribution and water level fluctuation on the fourth day

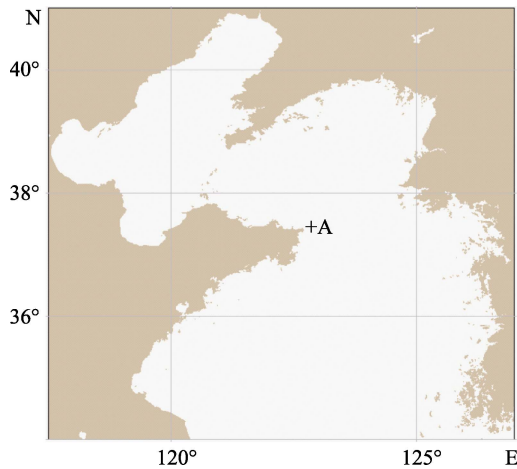


图5 潮流验证点

Fig.5 Current verification point

内数据进行比较。验证点的信息见表1。从表1可以看出, FVCOM的模拟结果与《潮汐表》的数据比较接近, 普遍略高于《潮汐表》, 说明了FVCOM模拟潮流的可靠性。

2.3 溢油模型参数的设置与分析

采用GNOME模型的诊断模式, FVCOM模型得到的流场、风场采用美国国家环境预报中心(NCEP)的环境预报系统再分析资料(CFSR), 设置GNOME的参数。“世纪之光”轮溢油点开始扩散时间为2010年5月2日15:30, 油的类型为重质原油, 重质原油密度约为 0.92 g/cm^3 , 溢油量约为503 t, 用1000个“Splots”来表示, 油的扩散系数为 $105 \text{ cm}^2/\text{s}$, 油膜再漂浮期为1 h; 流场扩散不确定比例设置为水平、垂直各10%; 步长为15 min。钱琴等(2018)研究表明, 在模拟湄公湾溢油事故发生12 h内溢油扩散最快, 并模拟12 h来预测溢油影响范围; 李怀明等(2014)模拟山东蓬莱19-3事故时, 模拟72 h时与实际溢油范围接近; 杨红等(2013)在模拟长江口锚地设置模型模拟时间为4 d内, 对漂移轨迹和溢油量变化进行分析。参考其模拟

时间及遥感影像提取油膜的清晰程度确定模拟时间为4 d。GNOME模型输出结果包括最佳轨迹预测和最小遗憾预测。分别输出24、48、72、96 h的油粒子分布见图6。

从4 d的模拟结果来看, 溢油扩散主要受风场和流场的影响, 其中, 流场占主导作用。在这4 d中, 油膜面积逐渐扩大。将模拟第21、96小时的溢油轨迹数据通过GNOME Import Tool vs 4.0软件导入Arcgis中。根据Galt等(1996)提出将某个时刻的油粒子空间位置信息转化成相对油浓度分布的方法。把油粒子的分布空间使用泰森分析法, 将其转化为泰森多边形, 每个泰森多边形中只有1个油粒子, 根据油粒子所占的泰森多边形的面积来计算油粒子的相对浓度(即单位面积内的油粒子个数)。多边形的面积越小, 说明该区域油粒子越密集, 其密度也越大; 相反油粒子越疏散, 其密度也越小。此分析最佳预测区域时, 将大于最大密度的16%的区域定义为重油密度区域, 将密度大于最大密度4%且小于最大密度16%的区域定义为中油密度区域, 将密度大于最大密度1%且小于最大密度4%的区域定义为轻油浓度区域。Galt等(1996)在分析存在不确定性因素的最小遗憾预测轨迹时, 将密度大于最大密度1‰的区域定义为90%置信的溢油范围。根据这种方法分别得到21、96 h不同油密度区域分布图和90%置信区间最小遗憾预测的溢油范围(图7和图8)。

从图7a和图8a可以看出, 黑色为重油密度区域, 深灰色为中油密度区域, 浅灰色为轻油浓度区域。从图7b可以看出, 粉红色为90%置信区间溢油污染区域。其中, 21 h重油密度区域面积为 0.05 km^2 , 中油密度区域面积为 0.67 km^2 , 轻油浓度区域面积为 1.13 km^2 , 总污染面积为 1.85 km^2 ; 90%置信区间区域面积为 314.89 km^2 。从图8b可以看出, 96 h重油密度区域面积为 3.37 km^2 , 中油密度区域面积为 11.63 km^2 , 轻油浓度区域面积为 9.89 km^2 , 总污染面积为 24.89 km^2 ;

表1 FVCOM潮流验证

Tab.1 FVCOM Current verification

验证点 Point	站位名称 Name	站位坐标 Coordinate	验证时刻 Time	流速		流向	
				Velocity of flow (m/s)		Flow direction (°)	
				潮汐表 Tide table	模拟值 Analog value	潮汐表 Tide table	模拟值 Analog value
A	成山角 Chengshanjiao	37°25.10'N, 122°44.00'E	05:20	0.67	0.71	163	163
			11:43	0.57	0.54	343	340
			17:51	0.46	0.51	163	165
			23:58	0.57	0.58	343	345

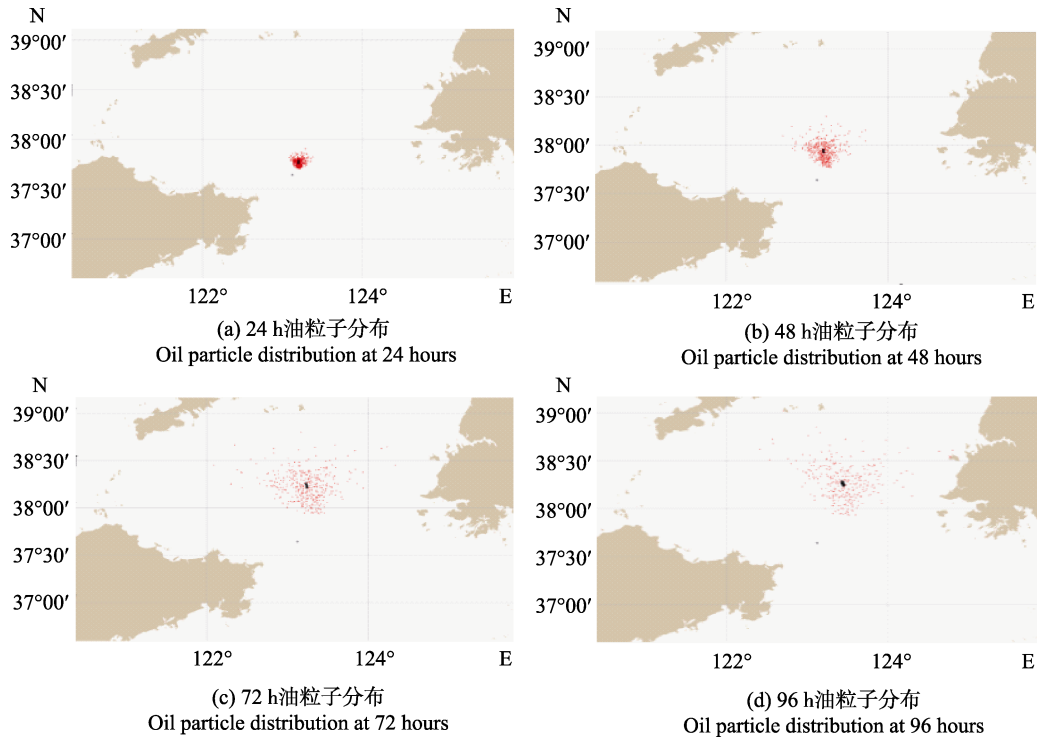


图 6 96 h 内油粒子分布
Fig.6 Oil particle distribution within 96 hours

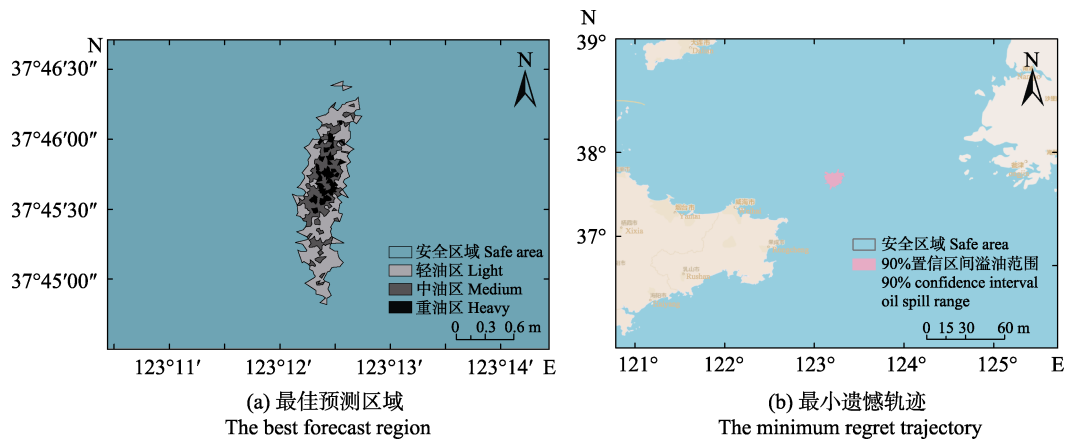


图 7 21 h 最佳预测区域和最小遗憾轨迹
Fig.7 The smaller best guess area and the minimum regret trajectory in 21 hours

90%置信区间区域面积为 41575.56 km²。

2.4 MODIS 遥感验证

由于在“世纪之光”轮溢油发生之后的几天里云较多，云层较厚，采用由 NASA 提供的 2010 年 5 月 3 日 04:55 的 MODIS L1B 数据。使用 ENVI 5.3 软件对数据进行预处理，包括“蝴蝶结”现象去除、几何校正、大气校正等。通过直方图均衡化和高斯对比度拉伸处理，调节图像灰度值、对比度。根据侯懿峰 (2012) 研究结果可以看出，在平均反射率上，轻油种

大于洁净海水，轻油种在 MODIS 大部分通道中，遥感影像表现为较亮区域；而平均反射率上重油种(重柴油、大庆原油等)大于洁净海水，重油种在遥感影像中为较暗区域。“世纪之光”轮溢油属于重油种，在遥感影像中为较暗区域，即为溢油区域。提取油膜信息导入 Arcgis 中处理。遥感数据与 GNOME 的模拟结果相对照见图 9a。

从图 9b 可以看出，黑色的点状轨迹为 GNOME 模拟的最佳预测轨迹点，红色点为 GNOME 最小遗憾轨迹点，蓝色区域为从遥感 MODIS 数据中提取的油

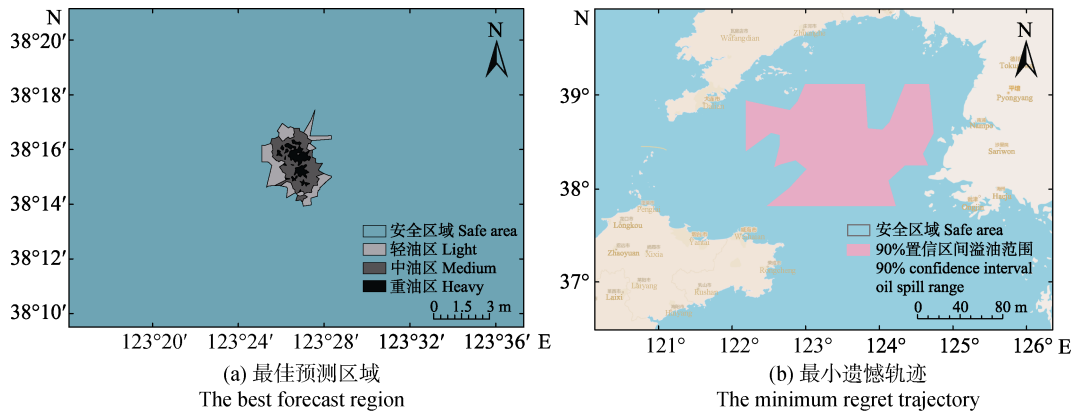


图 8 96 h 最佳预测区域和最小遗憾轨迹

Fig.8 The smaller best guess area and the minimum regret trajectory in 96 hours

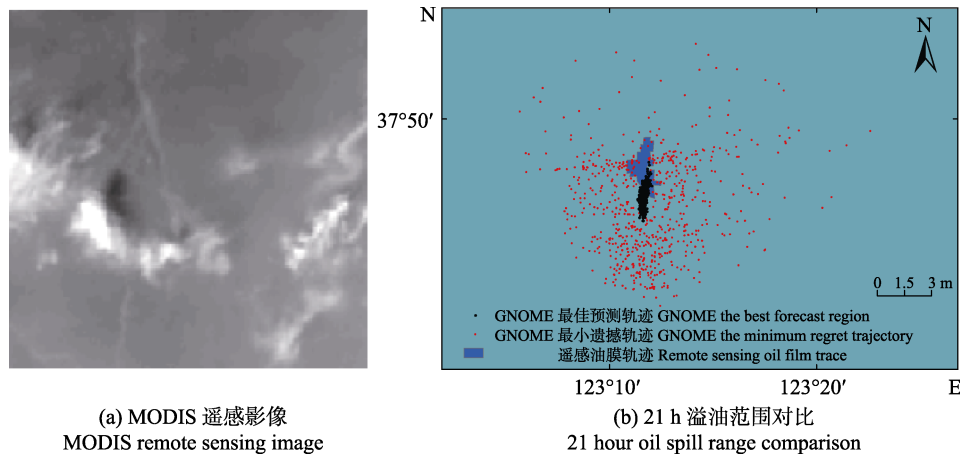


图 9 MODIS 遥感影像和溢油范围对比

Fig.9 MODIS remote sensing image and oil spill range comparison

膜轨迹。与 GNOME 模拟结果相比, 遥感提取的油膜面积比最佳预测轨迹要大, 与最佳预测轨迹的位置相吻合, 但又略有不同, 说明实际油膜在扩散漂移过程中, 受到了很多不确定因素的影响, 导致它并不能达到最佳的预测轨迹位置; 但其处在 GNOME 的最小遗憾轨迹范围之内, 说明 GNOME 的模拟结果比较准确可靠, 可以反映溢油事故发生后油膜扩散漂移的走向。

2.5 渔业资源损失

根据 GNOME 模拟 4 d 的溢油范围以及《渔业水质标准》(GB11607-1989)中对油类污染物浓度要求, 确定第 4 天油类污染物超过 0.05 mg/L 的污染范围为 24.89 km², 污染水深按照 1.5 m 计算。

根据游泳生物对污染物的回避反应, 参照《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》对油污染的要求, 鱼类损害系数为 0.2~0.4, 无脊椎动物损害系数为 0.3~0.6, 浮游动物损害系数为 0.5~0.8, 底栖

天然动物损害系数为 0.2~0.8。由于此次污染事故比较严重, 取鱼类损害系数为 0.4, 无脊椎动物(甲壳类、头足类)损害系数为 0.6, 浮游动物损害系数为 0.8。根据中国海洋大学的拖网调查数据, 渔获物种类共 13 种, 包括日本鳀(*Engraulis japonicus*)、鲈鱼(*Scomber japonicus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)、黄条鲷(*Seriola aureovittata*)、太平洋鲱鱼(*Clupea pallasii*)等。其中, 鱼类 11 种, 分布隶属于 5 目 11 科 11 属, 占渔获种类的 84.62%; 甲壳类 1 种, 为太平洋磷虾(*Euphausia pacifica*), 没有蟹类, 占渔获种类数的 7.69%; 头足类 1 种, 为太平洋褶柔鱼(*Todarodes pacificus*), 占渔获种类数的 7.69%。根据 2010 年山东威海市各种类的市场价格, 经济鱼类平均市场价格为 18 元/kg; 甲壳类市场价格为 18 元/kg; 头足类市场价格为 25 元/kg。鱼卵、仔鱼经济损失计算过程、渔业资源直接经济损失计算过程见表 2 和表 3。

表2 鱼卵、仔鱼经济损失评估

Tab.2 Economic loss assessment of fish eggs and larvae

项目 Items	鱼卵 Fish eggs	仔鱼 Fish larvae
单位生物量 Unit biomass	0.0277 (cell/m ³)	0.0274(ind./m ³)
损害系数 Impairment ratio	1	1
单位受损生物量 Unit biomass of the impaired	0.0277 (cell/m ³)	0.0274 (ind./m ³)
污染体积 Contaminated volume (km ³)	0.037	0.037
转化率 Conversion rate (%)	1	5
受损生物量 Biomass of the impaired (ind.)	10249	50690
单价 Price (yuan/ind.)	1.0	1.0
经济损失 Economic losses (yuan)	10249	50690
损失总计 Total loss (yuan)	61000	

表3 直接经济损失评估

Tab.3 Assessment of direct economic losses

项目 Items	鱼类 Fish	甲壳类 Crustacean	头足类 Cephalopod	浮游动物 Zooplankton
单位生物量 Unit biomass (kg/km ²)	2684.721	25.121	53.334	510
损害系数 Impairment ratio	0.400	0.600	0.600	0.8
单位受损生物量 Unit biomass of the impaired (kg/km ²)	1073.888	15.073	32.000	408
污染面积 Contaminated area (km ²)	24.890	24.890	24.890	24.89
转化率 Conversion rate (%)	100.000	100.000	100.000	10
受损生物量 Biomass of the impaired (kg)	26729.070	375.170	796.480	1015.51
单价 Price (yuan/kg)	18.000	18.000	25.000	5
直接经济损失 Direct economic loss (yuan)	481123.260	6753.060	19912.000	5077.55
损失总计 Total loss (yuan)	512900.00			

从表2和表3可以看出,此次事故对鱼卵、仔鱼的经济损失为6.1万元,渔业资源4d内的直接损失为51.29万元。根据《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》,渔业资源的恢复费用一般不低于直接经济损失3倍的原则。由于此次污染事故的严重性,渔业资源的恢复费用取直接经济损失的3倍,即153.87万元。该事故4d内对渔业资源造成的损失共计211.26万元。

3 结论

通过采用FVCOM模型得到的流场、美国国家环境预报中心(NCEP)的环境预报系统再分析资料(CFSR)的风场,在GNOME模型中分别模拟出24、48、72、96h的溢油轨迹以及油粒子分布情况。MODIS遥感油膜位置与GNOME模拟结果比较接近。采用GNOME溢油模型可以较好的模拟油粒子的运动情况。在实际溢油处理中,可以参考最佳预测轨迹和最小遗憾轨迹进行预测和评估。将数值模拟的溢油面积

与渔业资源评价方法相结合,对4d内造成的渔业资源损失进行评估。

由于风场数据采用的是3h的再分析数据,给GNOME溢油模拟带了一定的误差,可以采用更高分辨率的数据来提高模拟质量。由于该事件发生期间的MODIS遥感数据云层较厚,对于油膜提取存在一定的难度,不能很好的反映油膜的实际范围。通过GNOME与MODIS比较来看,溢油扩散实际开始时间与观测时间存在误差,实际海况不确定等因素的影响,以及采用风场数据的分辨率不够高,实际溢油轨迹并没有达到最佳预测区域水平,但会在最小遗憾范围之内,与最佳预测位置相近。根据模型的特征与风场数据精度的限制只进行了4d的溢油模拟,得出了4d内对渔业资源造成了损失。由于4d之后污染范围仍然在扩大,损失也将增大。本研究仅通过这种方法对溢油损失评估提供一种思路和参考。可以通过进一步的数据精确性和数据连续性,对长时间的溢油进行模拟并得出溢油损失。

参 考 文 献

- Alan B, Tomasz D, Kieran L. The oil spill model OILTRANS and its application to the Celtic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(11): 2489–2501
- ASCE Task Committee on modeling of oil spills of the water resources engineering division. State-of-the-art review of modeling transport and fate of oil spills. *Journal of Hydraulic Engineering*, 1996, 122(11): 594–609
- Blokker PC. Spreading and evaporation of petroleum products on water. Proc. of the Fourth International Harbour Conference. Antwerp Belgium, 1964, 911–919
- Chen BC, Wei H. Simulation of the tide and current in the Bohai Bay with FVCOM. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2013, 28(4): 40–43, 69 [陈波昌, 魏皓. FVCOM 模型在渤海湾潮流潮汐模拟中的应用. 天津科技大学学报, 2013, 28(4): 40–43, 69]
- Ding DS, Ma SS, Chen BJ, *et al.* Evaluation of the natural fishery resources loss caused by an oil spill accident in the central Bohai. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 36–42 [丁东生, 马绍赛, 陈碧鹃, 等. 基于欧拉—拉格朗日方法的某溢油事故天然渔业资源损失评估方法案例研究. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 36–42]
- Fay JA. The spread of oil slicks on a calm sea. *Oil on the sea*, Plenum. New York, 1969, 53–64
- Galt JA, Payton DL. Digital distribution standard for NOAA trajectory analysis information. Hazardous Materials Response and Assessment Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 1996
- Guo WJ. Study on the three-dimensional oil spill numerical model and its application in the coastal area. Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2011 [郭为军. 三维溢油数值模式研究及其在近海的应用. 大连理工大学博士研究生学位论文, 2011]
- Guo WJ. Numerical simulation of oil spill based on POM. Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2007 [郭为军. 基于 POM 的溢油数值模拟研究. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Hou YF. The research on MODIS data processing and marine oil spill classification. Master's Thesis of Dalian Maritime University, 2012 [侯懿峰. MODIS 数据解析及海面溢油分类研究. 大连海事大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Leech M, Walker M. OSIS: A windows 3 oil spill information system. Proceedings of 16th Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar, 1993, 549–572
- Lehr WJ, Overstreet R. ADIOS-automated data inquiry for oil spills. Proceedings of the Fifteenth Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar, 1992, 31–35
- Li HM, Lou AG, Wang J, *et al.* A numerical simulation of the oil spill accident at Penglai 19–3 oil field. *Marine Sciences*, 2014, 38(6): 70–77 [李怀明, 娄安刚, 王璟, 等. 蓬莱 19–3 油田事故溢油数值模拟. 海洋科学, 2014, 38(6): 70–77]
- Mark R, Oistien J, Brandivik PJ, *et al.* Oil spill modeling towards the close of 20th century: Overview of the state of the art. *Spill Science and Technology Bulletin*, 1999, 5(1): 3–16
- Qian Q, Zhao DB, Ji HD. Numerical simulation of oil spill based on GNOME and EFDC models—A case study of Meizhou Bay. *China Water Transport*, 2018, 18(5): 73–75 [钱琴, 赵东波, 姬厚德. 基于 GNOME 和 EFDC 模型的溢油数值模拟研究—以湄洲湾为例. 中国水运(下半月), 2018, 18(5): 73–75]
- Qu B, Paul SA, Christopher TM. Application of fractional Brownian motion particle tracking model to coastal contaminant dispersion. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2009, 40(12): 1517–1523 [瞿波, Paul SA, Christopher TM. 加速分数型布朗运动粒子追踪模型在水面污染扩散中的应用. 水利学报, 2009, 40(12): 1517–1523]
- Shen HT, Yapa PD, Petroski ME. A simulation model for oil slick transport in lakes. *Water Resources Research*, 1987, 23(10): 1949–1957
- Shen XQ, Yuan Q. The identification and assessment of environmental pollution damage to fisheries. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2014, 4(3): 1–5 [沈新强, 袁骥. 环境污染对渔业损害的鉴定与评估中国. 渔业质量与标准, 2014, 4(3): 1–5]
- Shen YM, Ni HQ, Zhao WQ, *et al.* The two-fluid model of turbulent buoyant recirculating oil-water two-phase flow. *Acta Mechanica Sinica*, 1992, 24(5): 546–555 [沈永明, 倪浩清, 赵文谦, 等. 油-水两相湍浮力回流双流体模型. 力学学报, 1992, 24(5): 546–555]
- Song GJ, Li A, Wu JH, *et al.* Influence of 19–3 oil spill accident on phytoplankton community in the Liaodong Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 60–66 [宋广军, 李爱, 吴金浩, 等. 19–3 油田溢油对辽东湾浮游植物群落的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 60–66]
- Stiver W, Mackay D. Evaporation rate of spills of hydrocarbons and petroleum mixtures. *Environmental Science and Technology*, 1984, 18(11): 834–840
- Sun J, Yu JQ, Huang LW. Oil spilled information management system of China Zhoushan harbor based on OILMAP. *Computer Simulation*, 2002, 19(4): 76–78 [孙俊, 俞济清, 黄立文. 基于 OILMAP 的中国舟山港溢油管理信息系统. 计算机仿真, 2002, 19(4): 76–78]
- Wang DS, Yang XQ, Shen HD. A two-layer mathematical model for oil slick transport in river. *Journal of Hydraulic Engineering*, 1996(8): 71–76 [汪德胜, 杨小庆, 沈洪道. 油在河流中传输的双层数学模型. 水利学报, 1996(8): 71–76]
- Webb L, Taranto R, Hashimoto E. Operational oil spill drift forecasting. Proceedings of 7th navy symposium of military oceanography, Annapolis, Maryland, 1970
- Yang H, Liu CX, Li RG, *et al.* Numerical simulation of oil-spill

- in the south channel of the estuary Yangtze River estuary. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(3): 345–351 [杨红, 刘成秀, 李曰嵩, 等. 长江口南港水道溢油数值模拟. *海洋通报*, 2013, 32(3): 345–351]
- Ya HZ, Chen XY, Dong DX. Quantitative analysis of the fishery resources damage caused by sewage marine disposal engineering. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2014, 30(3): 161–164, 169 [牙韩争, 陈宪云, 董德信. 污水排海工程渔业资源损害定量分析. *广西科学院学报*, 2014, 30(3): 161–164, 169]
- Zhang CX. Study on numerical simulation of oil spill in Yueqing day. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [张彩霞. 乐清湾溢油数值模拟研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

(编辑 陈 严)

Oil Spill Pollution and Fishery Resource Loss Assessment Based on GNOME

BI Yanjun¹, LIU Xintian², SONG Xiefa^{1①}, DONG Dengpan¹

(1. Department of Fisheries, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003;
2. Weihai Fisheries Technology Extension Station, Weihai 264200)

Abstract By using the GNOME model of oil spillage, the drift trajectory and diffusion distribution of the “Century Light” oil spill were simulated. First, the FVCOM hydrodynamic model was used to simulate the tidal field, which was broadly consistent with the results of the tide tables. The wind field was determined by using the Climate Forecast System Reanalysis Data (CFSR) of the National Center for Environmental Prediction (NCEP). The GNOME oil spill model was used for numerical simulation, and Tyson’s method was used for the analysis of the contaminated area. The “minimum regret” trajectory and the best forecast region were obtained through numerical simulation. The comparison of the simulation results after 21 hours with the MODIS remote sensing monitoring data showed that the drift position was basically consistent. This paper describes the assessment criteria for various fishery resources and methods for determining marine ecological damage and loss compensation assessment. Combining the simulation results with the trawl survey data, the direct economic loss of swimming animals was calculated to be 61000 yuan, with the direct loss of fishery resources, within 4 days, reaching a value of 511900 yuan. The oil loss from the “Century Light” event reached a value of 2112600 yuan within 4 days. In this paper, the method of numerical simulation was related to the assessment of fishery resources, and the loss of fishery resources was estimated without on-site observation. The GNOME oil spill model can be applied to similar oil spill trajectories and for rapid prediction of flooding, to provide a method and reference for emergency response to oil spill accidents. The combination of numerical simulation of oil spills and on-site observations will be an important reference method for new ideas in future calculations of fishery resource losses and fishing losses, leading to more comprehensive and scientific handling of oil spills.

Key words GNOME; Oil spill; Fishery resources; Loss assessment

① Corresponding author: SONG Xiefa, E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190319003

http://www.yykxjz.cn/

黄书杰, 徐东, 王东升, 张现盛, 叶乃好. 海洋酸化对颗石藻生理特性的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 11–24
Huang SJ, Xu D, Wang DS, Zhang XS, Ye NH. Effects of ocean acidification on physiological characteristics of coccolithophores. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 11–24

海洋酸化对颗石藻生理特性的影响*



黄书杰^{1,2,3,4} 徐东⁴ 王东升⁴ 张现盛⁴ 叶乃好^{4①}

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. 上海海洋大学 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306;
3. 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 上海 201306;
4. 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)

摘要 CO₂ 浓度升高引起的海洋酸化对海洋生物尤其是钙化生物颗石藻产生了很大的影响。然而, 有关颗石藻对 CO₂ 浓度升高响应的研究多集中在单一的品系上, 并且在种内或者种间产生了差异甚至相互矛盾的结果。本研究中, 分别以赫氏颗石藻(*Emiliania huxleyi*)和大洋球石藻(*Gephyrocapsa oceanica*) 2 种颗石藻的钙化和非钙化的 4 个品系藻种为研究对象, 设置了 400、750、1000、2000 μatm 共 4 个 CO₂ 浓度梯度, 同时进行分批充气培养, 系统研究了海洋酸化对颗石藻的生长光合、氮源吸收、元素组成和钙化效率等生理影响。结果显示, 随着 CO₂ 浓度升高至 2000 μatm, 不同的颗石藻并未有一致的反应。除了非钙化的 *E. huxleyi* (N-E) 外, 其他 3 个品系颗石藻的生长和颗粒有机碳产率都对 CO₂ 增加表现出积极的响应; 随着 CO₂ 浓度的升高, 4 种品系颗石藻的光合参数 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 和叶绿素含量呈整体下降趋势; *E. huxleyi* CS369 (C-E) 和 *G. oceanica* (C-G) 在第 7 天的钙化效率分别下降了 35.4% 和 68.9%; 此外, 4 种品系颗石藻的颗粒有机氮产率都出现增加趋势, 而 POC/PON 和 PIC/POC 均呈现下降趋势。本研究确定了海洋酸化对颗石藻的不同生理影响, 这种差异影响可能会导致未来海洋生物多样性的改变和其他生态系统进程的变化。

关键词 海洋酸化; 颗石藻; 特异性; 生物多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0011-14

浮游植物在海洋食物网和生物地球化学循环中起着至关重要的作用(Falkowski, 2012)。颗石藻作为一种单细胞定鞭藻类, 其细胞表面覆盖着细胞内产生

的方解石小板, 是目前海洋中数量最多、分布最广的钙化浮游生物类群之一(Langer *et al*, 2009; Langer, 2013; Lohbeck *et al*, 2014; Young *et al*, 2014)。此外,

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900703; 2018YFD0901503-8)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019006)、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渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T01)和山东省自然科学基金(ZR2017MD025)共同资助 [This work was supported by the National Key R&D Program of China (2018YFD0900703, 2018YFD0901503-8), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022019006), and Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (2018-MFS-T01), and Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2017MD025)]. 黄书杰, E-mail: huangshujie1221@163.com

① 通讯作者: 叶乃好, 研究员, E-mail: yenh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-19, 收修改稿日期: 2019-04-11

颗石藻参与形成的碳酸盐泵,在碳生物地球化学循环中发挥着重要作用;颗石藻能够形成大规模的赤潮,这些特征被认为对全球气候变化有反馈作用(Hutchins, 2011; Riebesell *et al*, 2011; Jin *et al*, 2013; Beaufort *et al*, 2014)。然而,大气 CO₂ 浓度的增加引起的海洋酸化正在导致海洋表层 pH 值下降(预计到 2100 年和 2300 年分别减少 0.5 和 0.7 个单位)(Caldeira *et al*, 2003; IPCC, 2008; Ross *et al*, 2011),同时改变碳酸盐系统(Beaufort *et al*, 2010)。表层海水的这些变化对颗石藻和其他钙化藻种产生了巨大的影响,预计将影响整个群落和生态系统,甚至破坏整个海洋环境(Turley *et al*, 2010; Hoppe *et al*, 2011; Sinutok *et al*, 2011; Lohbeck *et al*, 2012; Meier *et al*, 2014)。

过去十年间,许多有关实验室培养和大型半封闭野外培养(中试实验)的研究,都集中在单种颗石藻对海洋酸化的响应,这产生了不一致甚至相互矛盾的结果(Young *et al*, 2014)。Riebesell 等(2000)发现,随着 CO₂ 浓度的增加,颗石藻的钙化作用明显减弱,同时伴随着颗粒有机碳(POC)的增加。随后对单一藻种赫氏颗石藻(*Emiliania huxleyi*)的研究也表明,海洋酸化导致该物种的钙化效率降低,但 POC 产量发生不均一(增加、减少或不受影响)变化(Zondervan *et al*, 2002; Sciandra *et al*, 2003; Delille *et al*, 2005; Feng *et al*, 2008; Müller *et al*, 2010; Hoppe *et al*, 2011)。许多其他关于 *E. huxley* 藻株应对海洋酸化的研究也显示相互矛盾的结果,例如,颗石藻钙化率的不断增加(Iglesias-Rodriguez *et al*, 2008; Shi *et al*, 2009; Jones *et al*, 2013)或不敏感变化(Langer *et al*, 2009; De Bodt *et al*, 2010; Fiorini *et al*, 2011b)。

此外,前人研究的 3 种钙化颗石藻(*Gephyrocapsa oceanica*, *Caldiscus leptoporus*, *Coccolithus braarudii*),都对 CO₂ 浓度升高表现出不同的响应模式。例如,CO₂ 浓度升高使 *G. oceanica* PC7/1 的钙化效率大幅下降 44.7% (Riebesell *et al*, 2000), *Coccolithus braarudii* 4762 藻株的钙化率则表现出轻微增加(Rickaby *et al*, 2010),而 *Calcidiscus leptoporus* AC370 藻株反应不敏感(Fiorini *et al*, 2011b)。鉴于这种矛盾的结果,已经出现了一些同时测试不同颗石藻品系或种类的研究(Langer *et al*, 2006、2009; Fiorini *et al*, 2011b)。Langer 等(2009)指出,先前海洋酸化研究中使用的不同赫氏颗石藻品系的敏感性在本质上是不同的,这可能是由于存在特异性反应的遗传基础所致。

过去有关海洋酸化对颗石藻钙化作用影响的研究结果是不一致的,利用这些研究结果,在日益酸化的海洋环境中,准确预测未来颗石藻的命运仍然存在着问题。此外,基于短期实验的海洋表层优势种赫氏

颗石藻对海洋酸化的响应也得到了深入的研究,文献范围也在迅速扩大。Langer 等(2006)指出,单一品系颗石藻得到的实验结果,可能会对很好适应当前 CO₂ 条件的不同颗石藻在应对未来可能发生的海洋酸化的响应研究产生偏差,而且实验结果存在着缺乏普遍有效性的问题。此外,由于非钙化的颗石藻藻种在海洋生态系统中发挥着重要的生态作用,非钙化藻株的研究不应该被忽视,并且最近受到越来越多的关注(Kottmeier *et al*, 2014)。因此,当下需要同时研究更多不同的颗石藻品系,并研究 CO₂ 浓度升高对颗石藻的长期生物学效应。

本研究将 CO₂ 浓度从 400 μatm 升高到 2000 μatm ,来分别模拟当今和未来海洋酸化条件。同时,利用颗石藻的 2 个优势种赫氏颗石藻和大洋球石藻,包括非钙化的和钙化的品系,进行一系列实验。通过测定颗石藻的细胞密度、藻体光合参数、氮吸收速率、颗粒无机碳(PIC)产量、颗粒有机碳(POC)产量、颗粒有机氮(PON)以及它们之间的比率等生理参数,以分析不同品系颗石藻在不同 CO₂ 浓度下的潜在生理变化。此外,拟合了 4 个品系颗石藻相对于 CO₂ 变化的氮吸收速率响应曲线,并应用响应曲线中的动力学常数进一步分析 4 种品系颗石藻之间的本质响应差异。这些结果旨在了解类似条件下海洋酸化对不同颗石藻的差异影响,有助于评估未来环境条件下生物多样性和其他生态进程的改变。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和培养条件

实验所用的钙化和非钙化的赫氏颗石藻(*E. huxleyi*, 简写为 N-E; *E. huxleyi* CS369, 简写为 C-E)以及钙化和非钙化的大洋球石藻(*G. oceanica* NIES-1318, 简写为 N-G; *G. oceanica*, 简写为 C-G)均来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所微藻培养中心。藻细胞在天然过滤海水(0.22 μm)培养基中培养,海水中硝酸盐和磷酸盐的浓度分别为 882 $\mu\text{mol/L}$ 和 36.2 $\mu\text{mol/L}$,根据 f/2 培养基向海水中添加金属和维生素(Guillard *et al*, 1962)。细胞培养在含 1 L 培养基的 2 L 三角烧瓶中,放置在植物培养箱中,培养温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,盐度为 32。培养光源为白色荧光灯,光强为 300 $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$,光暗比为 16 h/8 h,实验采用处于指数生长期的颗石藻。

1.2 实验内容及方法

1.2.1 实验设置 采用与 Xu 等(2014)类似的方法,在植物培养箱(GXZ, 瑞华, 武汉)中,将空气与

CO₂ 混合, 向 4 种品系颗石藻泵入不同 CO₂ 分压的空气, 设 3 个重复的 1000 ml 培养物进行培养。在准备阶段, 在上述条件下, 4 种品系颗石藻被分别培养到指数生长期。在培养基中用含有不同 CO₂ 分压的空气连续充气, 以提供 400、750、1000 和 2000 μatm 的 CO₂, 各项初始值见表 1。待持续充气 48 h 稳定后, 进行下一步实验。每次实验中, 每个空气-CO₂ 混合物均设 3 份平行样, 以不添加细胞的实验体系作为空白对照, 分别监测细胞密度和 pH 值。在取样点分别测定叶绿素含量、PIC、POC、DIC 和碱度。

1.2.2 碳酸盐体系分析 培养基 pH 值采用 pH 计检测(Orion ROSS, Thermo Electron Corp., 美国)。总碱度(TA)用 Whatman GF/F 膜过滤, 储存在密封的 100 ml 三角烧瓶中, 放置在-20℃, 使用 848 自动滴定仪(Metrohm, Riverview, FL, 美国)获得总碱度值。利用 CO₂SYST 包获得海水中碳酸盐体系的 pH、温度、盐度和 TA, 其中碱度根据 Pelletier 等(2007)提供的方法计算。

1.2.3 生长测定 在光学显微镜(Nikon, 日本)下用血细胞计数器手动计数, 获得准确的细胞数以估算微藻的生长情况。利用如下公式测定比生长速率(μ):

$$\mu = (\ln C_1 - \ln C_0) / (t_1 - t_0)$$

式中, C_0 和 C_1 分别是初始时间 t_0 和随后时间 t_1 的藻细胞浓度。

1.2.4 叶绿素荧光参数的测定及色素分析 使用 Dual-PAM-100(Walz, Effeltrich, 德国)测定颗石藻的叶绿素荧光参数。测量前将样品暗适应 15 min, 在弱光下测定初始荧光(F_0)。暗适应后的样品在饱和脉冲光下获得最大荧光值(F_m)。代表被照亮后样品的 F_m 产量, F_t 是实时荧光产量。根据公式 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 计算最大 PS II 量子产额(F_v/F_m)。有效 PS II 量子产率计算: $Y(II) = (F'_m - F_t)/F'_m$ 。

为了确定色素含量, 样品被过滤收集到 GF/F 过滤膜(25 mm)上, 然后在 4℃ 的黑暗条件下, 用 10 ml 的 90% 丙酮提取 24 h, 7000 g 离心 10 min 后, 上清液用于室温下色素含量分析。叶绿素含量采用 Jeffrey 等(1975)的方法测定。

1.2.5 氮吸收速率的测定 每个实验体系收集 5 ml 水样, 迅速用醋酸纤维素膜过滤, 置于聚乙烯离心管中, 冷冻保存于-80℃。营养盐分析前, 将样品解冻至室温, 用营养盐自动分析仪(Bran and Luebbe AA3, 德国)对硝酸盐浓度进行光度分析。氮吸收速率计算公式: $NUR = (C_0 - C_1) V / N t$, NUR 为氮吸收速率 (pmol of nitrate-N/cell·d), C_0 和 C_1 分别为实验开始和第 7 天硝酸盐浓度 (pmol/L); V 为水的体积(L); N 为

细胞数; t 为时间间隔(d)。此外, 使用米氏方程曲线 (Michaelis *et al*, 1913; Hutchins *et al*, 2013) 拟合每个 CO₂ 浓度下的平行样品关于氮吸收的 CO₂ 响应曲线。使用 Origin Pro 软件进行动力学常数和曲线相关系数的计算。

1.2.6 藻体中碳和氮元素的含量分析 将样品过滤到灼烧过(500℃, 5 h)的 GF/F 膜(25 mm), 保存在-20℃直到分析。在分析之前, 颗粒有机碳的滤膜用浓盐酸熏 24 h, 除去无机碳, 再次干燥。然后将过滤膜装好进行后续分析。POC、PON、TPC 浓度由 Vario EL III 自动元素分析仪(Elemntar Analysensysteme Co., 德国)依次测定。通过 TPC 与 POC 的差异, 计算 PIC 浓度, POC、PIC 或 PON 产量计算公式如下:

$P = \text{比生长速率}(\mu \text{d}^{-1}) \times \text{细胞中 POC、PIC 或 PON 含量}(\text{pg/cell})$ 。

1.2.7 数据分析 实验数据的统计分析采用 SPSS 17.0 软件, 运用单因素方差分析(One-way ANOVA)来分析各处理之间差异的显著性, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 实验中碳酸盐体系的变化

本实验采用充气法模拟海水酸化, 检测不同处理条件下的海水碳酸盐系统参数的变化, 包括 pH、DIC、HCO₃⁻、CO₃²⁻ 和 CO₂。图 1 和表 1 为不同颗石藻的海水 pH 值随 CO₂ 浓度的变化情况。浓度为 400、750、1000 和 2000 μatm 的 CO₂ 对应的 pH 值分别为 8.06±0.02、7.79±0.01、7.65±0.02 和 7.48±0.02。因为海水中含有引起碱度变化的缓冲液, 本研究设定的实验条件与预期的海洋酸化条件并不完全相同。有些实验测量需要大量的生物量, 因此, 需要较大的细胞密度, 从而导致碳酸盐体系的变化。尽管存在这些变化, 但在整个实验过程中, 培养藻的 4 种梯度的 pH 值始终保持着明显的差异, 使研究结果具有重要意义。

2.2 海洋酸化对颗石藻生长的影响

实验室条件下, 不同 CO₂ 分压对 4 种品系颗石藻生长的影响如图 2 所示。所有处理的藻细胞浓度随着培养时间的延长逐渐升高并达到最大值, 随后, 藻细胞浓度逐渐下降直至实验结束。CO₂ 分压对每种颗石藻的细胞浓度均有显著影响。随着 CO₂ 浓度逐渐增加, C-E、N-E 和 N-G 均显示出积极响应, 然而对于 N-E, CO₂ 分压达到 2000 μatm 时, N-E 的生长被抑制。所有处理的藻细胞在前 7 d 均呈指数级生长, 其

表1 初始碳酸盐系统参数
Tab.1 The data of the original carbonated system

Pumping CO ₂ levels	pH	TA(μmol/L)	TCO ₂ (μmol/L)	DIC (μmol/L)	CO ₃ ²⁻ (μmol/L)	HCO ₃ ⁻ (μmol/L)	Omega calcite
400 μatm	8.06±0.02	2586.71±11.34	21.46±1.21	2444.99±18.35	163.09±5.85	2260.45±23.01	3.46±0.12
750 μatm	7.79±0.01	2606.56±15.24	42.73±1.30	2555.49±17.86	93.69±1.46	2419.06±18.02	1.99±0.03
1000 μatm	7.65±0.02	2636.73±16.94	60.92±3.34	2627.51±22.85	70.08±2.61	2496.51±22.11	1.49±0.06
2000 μatm	7.48±0.02	2787.55±8.26	96.91±4.91	2833.42±15.22	50.97±2.11	2685.53±12.42	1.08±0.04

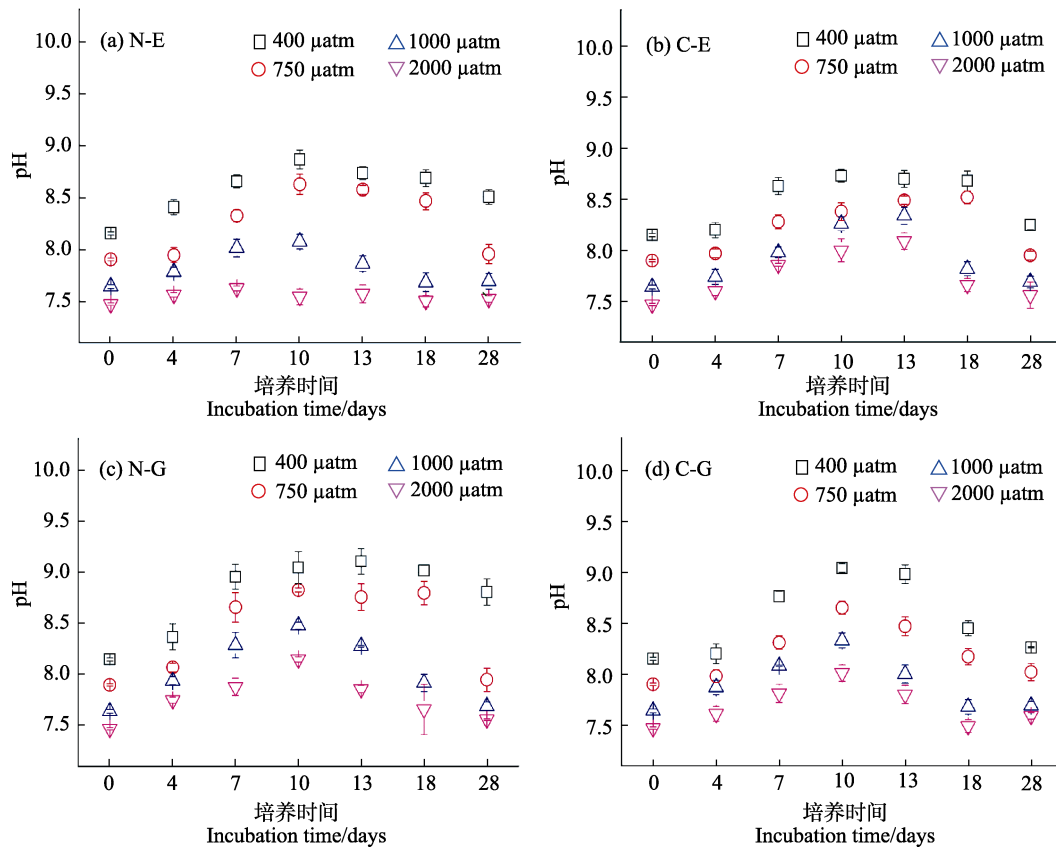


图1 4种品系颗石藻在不同的CO₂浓度下随着培养时间改变的海水pH值变化

Fig.1 Changes of seawater pH of the four strains of coccolithopsis with different incubation time at different CO₂ concentrations [N-E: *E. huxleyi* (a); C-E: *E. huxleyi* CS369 (b); N-G: *G. oceanica* NIES-1318 (c); C-G: *G. oceanica* (d)]

特定生长速率如图 2e~h 所示。CO₂ 浓度持续增加至 2000 μatm，比生长速率分别增大 53% (C-E)，36% (N-G) 和 30% (C-G)。然而，对于 N-E，当 CO₂ 浓度达到 1000 μatm，比生长率增加约 26%。当 CO₂ 连续升至 2000 μatm 时，与对照组相比，海洋酸化导致 N-E 的比生长率下降 14%。

2.3 海洋酸化对颗石藻光合特性的影响

图 3 为海洋酸化对颗石藻 F_v/F_m 和 Y(II) 在内的光系统参数变化的影响。当 CO₂ 升高至 2000 μatm 时，所有处理的 F_v/F_m 和 Y(II) 均显示出负面影响，但响应幅度在 4 种品系颗石藻中不同。随着培养时间的延长，除了 CO₂ 浓度达到 2000 μatm 时，C-E 的参数 F_v/F_m

在第 10 天达到最大值，N-E 一直下降之外，4 种品系颗石藻的光合系统参数在第 7 天达到最大值，随后下降直至实验结束。随着 CO₂ 分压增加到 2000 μatm，对于 N-E、C-E、N-G 和 C-G，海洋酸化对 F_v/F_m 的显著抑制作用分别发生在第 7、4、13 和 10 天，而对 Y(II) 的抑制作用分别发生在第 4、13、13 和 10 天。实验结束后，与对照组相比，当 CO₂ 分压升高至 2000 μatm， F_v/F_m 被抑制，分别下降 60%、45%、55% 和 46%；Y(II) 也被抑制，分别下降 75%、69%、76% 和 39%。此外，与 N-E 和 N-G 的最大 Y(II) 值相比 [低于 400 μatm 时分别为 (0.32±1.90)% 和 (0.34±2.60)%]，C-E 和 C-G 的最大 Y(II) 值 [低于 400 μatm 时分别为 (0.39±3.10)% 和 (0.48±2.30)%] 显著较高，而 F_v/F_m 无显著差异。

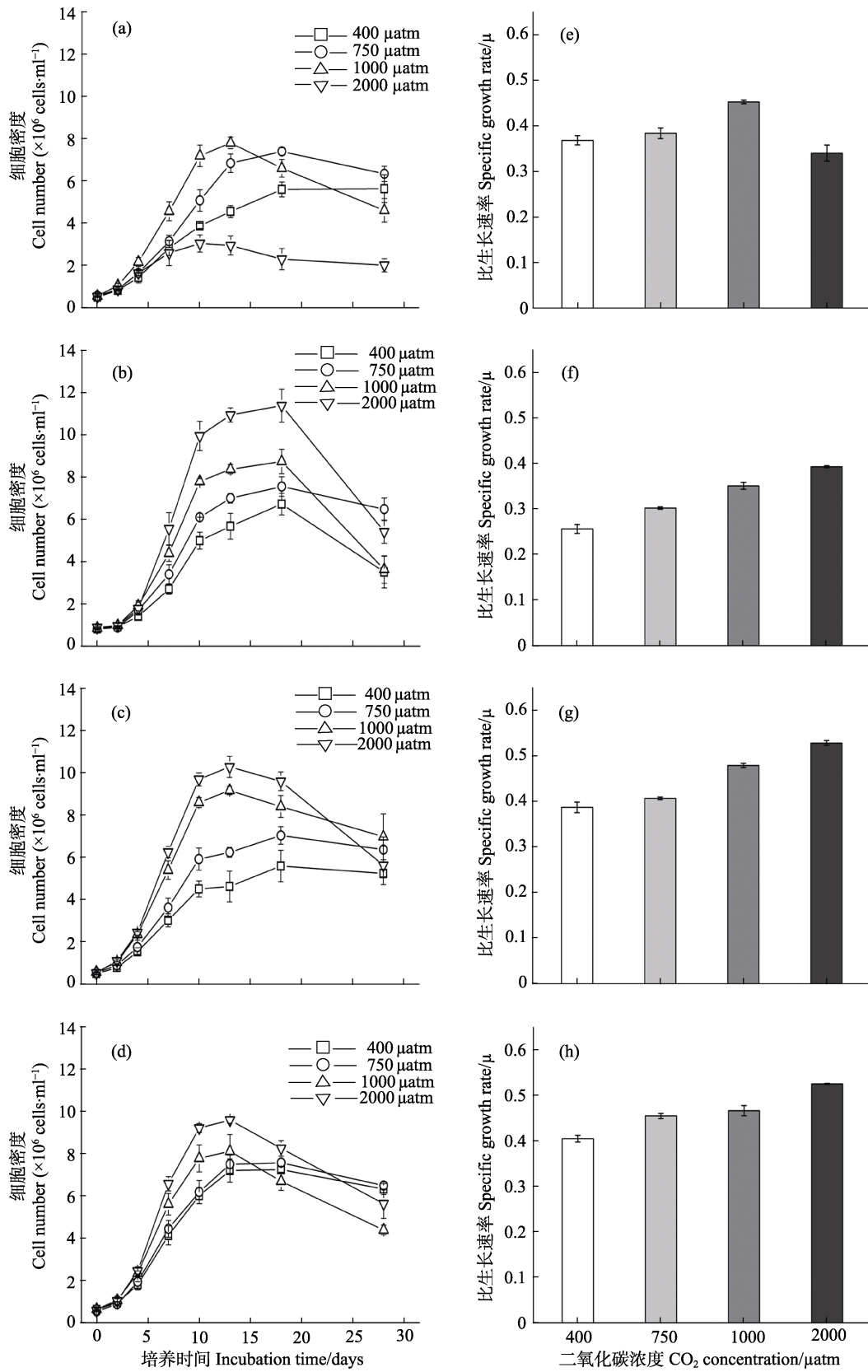


图 2 不同 CO₂ 浓度下 4 种品系颗石藻的生长曲线(a~d)和比生长速率(e~h)

Fig.2 The growth curves (a~d) and specific growth rates (e~h) of the four strains *E. huxleyi* (a, e), *E. huxleyi* CS369 (b, f), *G. oceanica* NIES-1318 (c, g), and *G. oceanica* (d, h) for different CO₂ concentrations

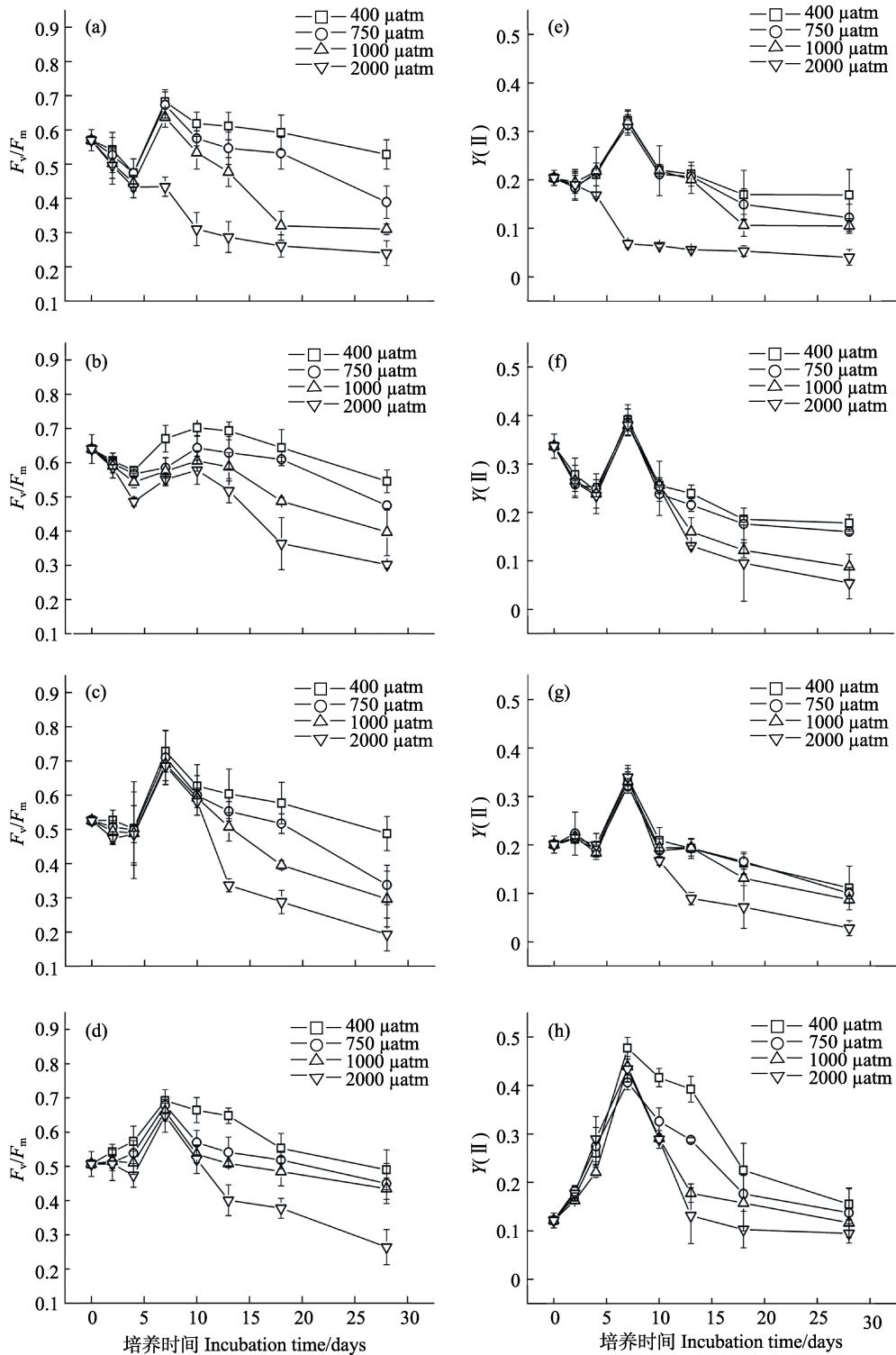


图 3 培养过程 CO_2 浓度升高对 4 种品系颗石藻的光合参数 F_v/F_m (a~d) 和 $Y(\text{II})$ (e~f) 的影响

Fig.3 The effect of ocean acidification by increasing CO_2 concentrations on the changes of F_v/F_m (a~d) and $Y(\text{II})$ (e~f) in the photosystem activity parameter during growth of the four species *E. huxleyi* (a, e), *E. huxleyi* CS369 (b, f), *G. oceanica* NIES-1318 (c, g), and *G. oceanica* (d, h) for different CO_2 concentrations

当 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 升高至 $2000 \mu\text{atm}$ 对不同品系颗石藻细胞内叶绿素含量的影响见图 4。细胞叶绿素 *a* 含量在第 20 天(N-E、C-E 和 N-G)和第 7 天(C-G)达到最大值, 在初始值出现微小变化后, 叶绿

素 *a* 含量逐渐下降, 直至实验结束(图 4a~d)。然而, 随着时间的推移, 叶绿素 *c* 呈现出整体稳定下降的趋势(图 4e~f)。然而, 随着 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 增加至 $1000 \mu\text{atm}$, 每种颗石藻叶绿素含量以同样模式下

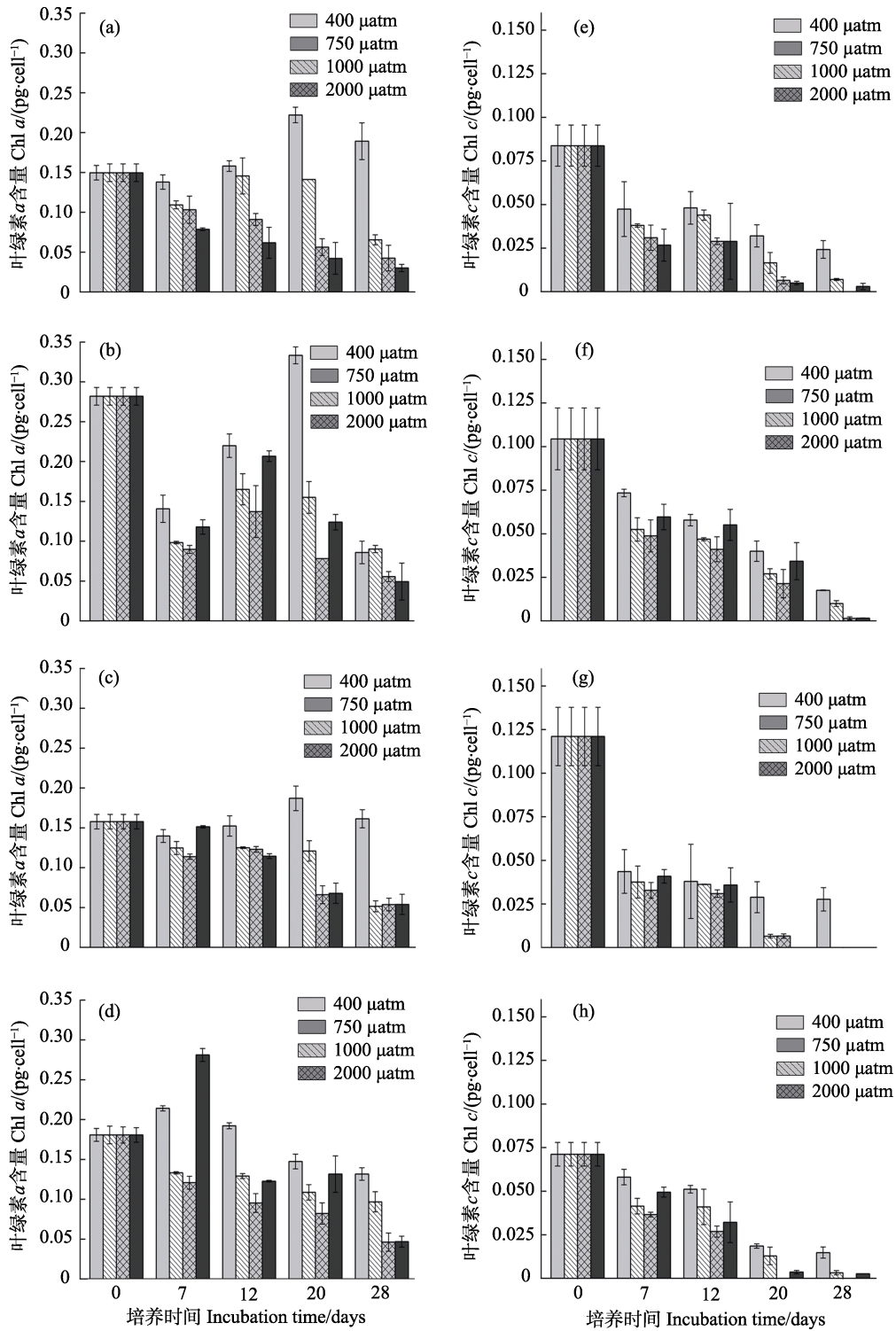


图 4 升高的 CO₂ 对 4 种品系颗石藻叶绿素含量的影响

Fig.4 The change of chlorophyll content of the four strains

a, e: *E. huxleyi*; b, f: *E. huxleyi* CS369; c, g: *G. oceanica* NIES-1318; d, h: *G. oceanica*, at elevated CO₂ conditions

降(除了个别点以不同的方式呈现)。然而, 当 CO₂ 浓度达到 2000 μatm 时, 测定的结果表现出不同的反应。与 1000 μatm 相比, 当 CO₂ 浓度为 2000 μatm 时, 在每个采样点, 随着培养时间的延长, N-E 的叶绿素 a 和 c 的含量降低。然而, 对于藻株 C-E、N-G 和 C-G,

随着 CO₂ 浓度增加到 1000 μatm, 在每个采样点叶绿素含量趋向于增加。

2.4 海洋酸化对颗石藻氮吸收速率的影响

海洋酸化对 4 种品系颗石藻氮吸收速率的影响

如图5所示。随着CO₂从400 μatm升高至2000 μatm, 4种品系颗石藻的氮吸收速率均增加, 分别增加了48.2%(N-E)、33.9%(C-E)、41.6%(N-G)和34.3%(C-G)。氮吸收速率的最大变异值(48.2%, N-E)比最小变异值(33.9%, C-E)增大了近1.5倍。此外, 4种品系颗石藻的

氮吸收速率相对于CO₂增加的响应根据米氏方程曲线拟合, 由响应曲线得到2个半饱和常数(K_m , μatm CO₂)和最大CO₂饱和率(V_{max} , pmol N/cell·d)得到。藻体N-E中, 最大 K_m 和 V_{max} 值分别是307.2 μatm和24.1 pmol N/cell·d, 分别大于C-E最低值约1.7倍和1.3倍。

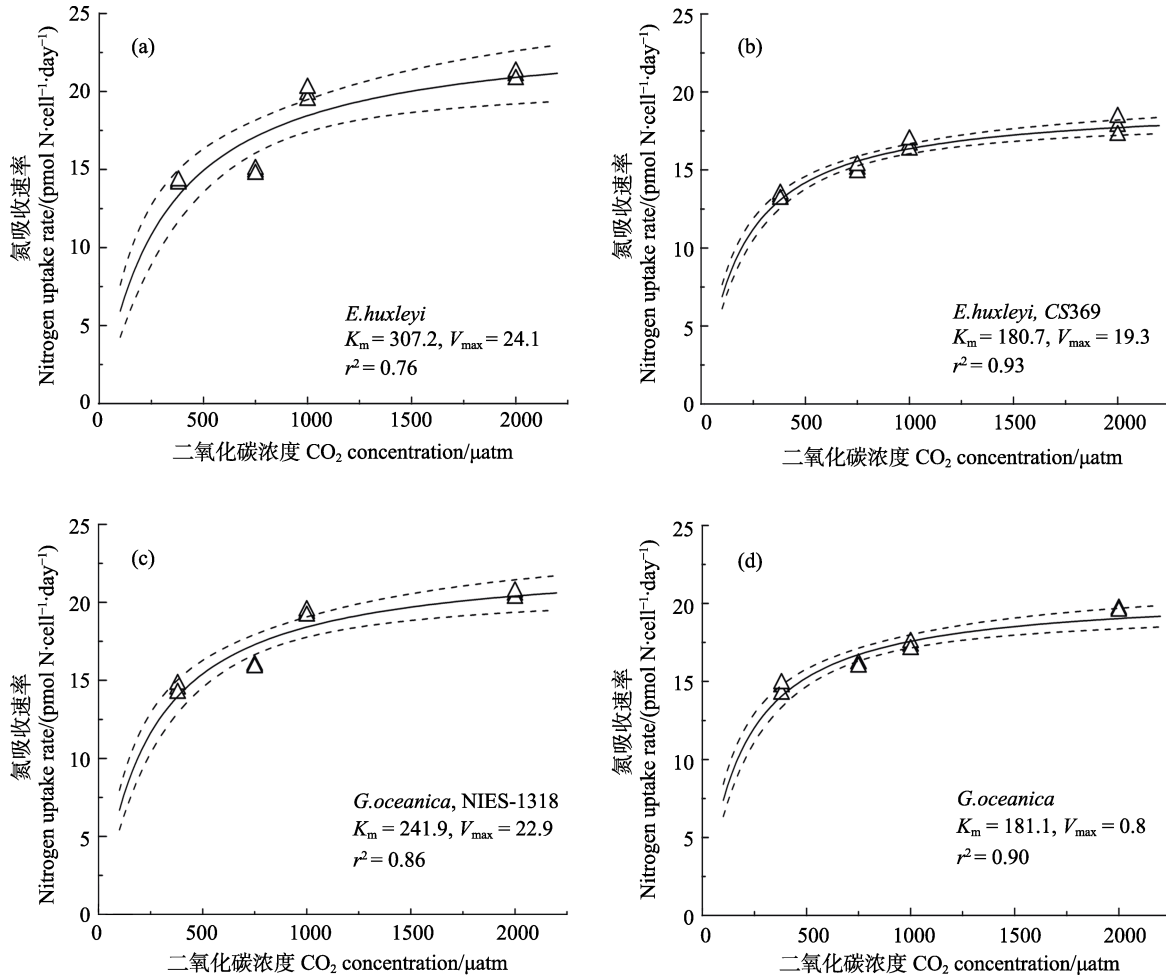


图5 CO₂升高对4种品系颗石藻氮吸收速率的影响

Fig.5 Nitrogen uptake rate response curves relative to CO₂ changing concentrations for four *E. huxleyi* and *G. oceanica* strains
a: *E. huxleyi*; b: *E. huxleyi* CS369; c: *G. oceanica* NIES-1318; d: *G. oceanica*

2.5 海洋酸化对颗石藻元素组成及钙化速率的影响

图6为CO₂升高对第7天的4种品系颗石藻的POC和PON的产生情况。当CO₂达到2000 μatm时, 显著刺激颗石藻产生POC和PON(除了N-E)。N-E颗石藻有机碳生产率的变化是巨大的, 在1000 μatm CO₂浓度条件下, 表现出明显的增加, 但在2000 μatm时, 表现出大幅下降。与对照组相比, C-E、N-G和C-G藻种的POC产量分别增长约101%、35%和49%, 其中C-E品系POC产率变化分别为N-G、C-G品种的2.9倍、2.1倍。此外, 在此范围内, PON较对照

组分别增加233%(N-E)、289%(C-E)、148%(N-G)和129%(C-G), 增幅较大。然而, 随着CO₂由400 μatm升高至2000 μatm, 4个藻种的颗粒有机碳和氮的变化导致颗粒有机碳与颗粒有机氮的比值(POC/PON)分别减少76.6%(N-E)、48.3%(C-E)、45.7%(N-G)和34.9%(C-G)。此外, 与400 μatm CO₂相比, 2000 μatm CO₂对颗粒有机碳的产率有负面的影响, 2个钙化品系C-E和C-G的钙化率呈现更大程度的降低, 分别为35.4%和68.9%。当CO₂浓度增大到2000 μatm, C-G比C-E呈现更高的PIC还原力。同时, 这2种藻的PIC/POC值也分别下降67.9%和79.2%。

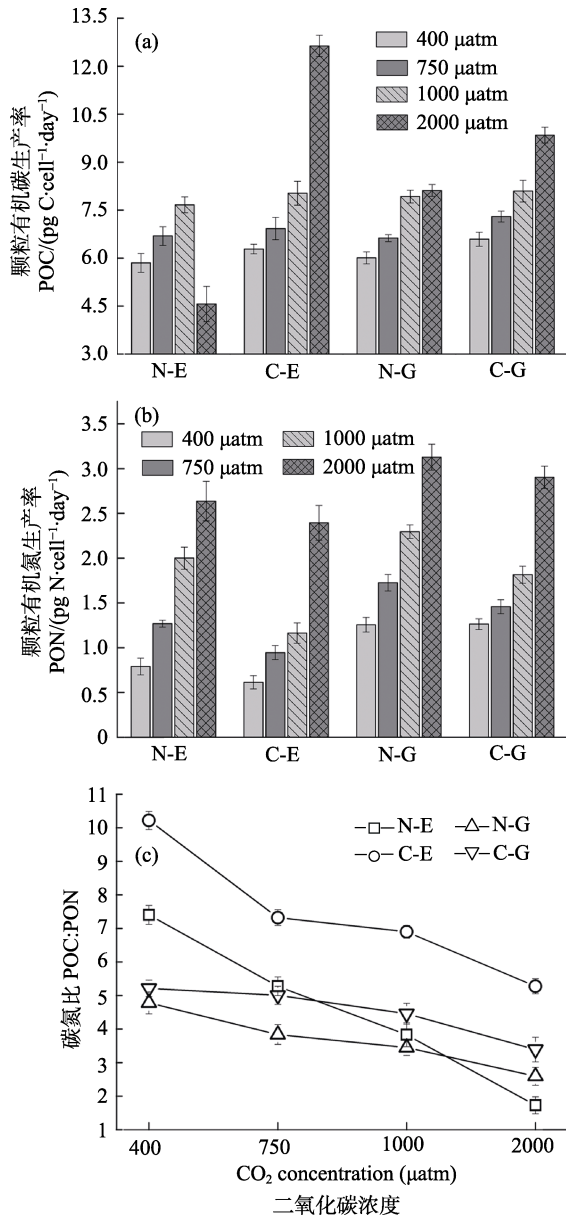


图 6 海水酸化对 4 种品系颗石藻颗粒有机碳和颗粒无机碳的生产率及碳氮比的影响

Fig.6 Effect of seawater acidification by elevated CO₂ concentrations (400, 750, 1000, and 2000 μatm) on POC (a), PON production (b) and POC:PON (c) of the four species (*E. huxleyi*, *E. huxleyi* CS369, *G. oceanica* NIES-1318, and *G. oceanica*)

3 讨论

本研究首次在实验中使用了非钙化品系和钙化品系的 2 种颗石藻, 研究了它们对 CO₂ 升高的响应。同时, 利用氮吸收率拟合的 CO₂ 响应曲线, 获得的动力常数来分析不同颗石藻的遗传变异性。当 CO₂ 浓度升高到 2000 μatm 时, 与其他 3 个藻种不同程度的积极响应相比, N-E 被严重抑制。本结果表明, 海洋酸

化对颗石藻产生生理影响, 不同颗石藻对海洋酸化具有特异响应, 最近的研究表明, 不同的浮游植物对 CO₂ 浓度升高的响应存在种间异质性(马莎等, 2019), 这与本研究结果类似。作者推测, 海洋酸化可能导致未来海洋生物多样性、营养相互作用关系和其他生态系统进程的变化。

3.1 海洋酸化对不同颗石藻生长和光合系统参数的影响

研究表明, 与对照组相比, 除了 N-E, 高 CO₂ 浓度(增加到 2000 μatm)促进藻细胞的生长(图 2)。而 N-E 的生长在 CO₂ 浓度为 2000 μatm 时下降, 其特定生长率在第 7 天显著降低了 7.61%。然而, 在 CO₂ 浓度升高至 1000 μatm 之前, N-E 的生长保持增长状态(图 2a 和 2e)。Fiorini 等(2011b)也得到了类似的结果, 富含 CO₂ (750 μatm) 的水中, 颗石藻藻状细胞的生长呈现增长趋势。

前人的研究表明, 由于细胞外碳酸酐酶的活性较低, 导致其 CO₂ 浓缩机制(CCM)效率相对较低(Herfort *et al*, 2002; Trimborn *et al*, 2007; Rokitta *et al*, 2012a; Jin *et al*, 2013), 所以, 目前海洋中的颗石藻具有碳限制性。因此, 酸化的海水可利用 CO₂ 含量的增加可能会加速 Rubisco 附近 CO₂ 的积累, 以弥补碳供应不足, 进一步促进颗石藻的羧化作用和生长作用(伴随着 POC 的增加) (Barcelose *et al*, 2010; Reinfelder, 2011; Jin *et al*, 2013; Kottmeier *et al*, 2014)。本研究中, 观察到 4 种品系颗石藻在高 CO₂ 条件下的生长情况, N-E 在 1000 μatm 增长 23%, 另外 3 种藻在 2000 μatm 时分别增长 53%(C-E)、36%(N-G)和 30%(C-G)(图 2)。然而, 每个品系对 CO₂ 升高的反应能力和策略不同。此外, 对于 N-E 来说, 在 2000 μatm 条件下, 几乎处于白化状态。

研究表明, 细胞外 pH 值的变化可以通过破坏恒定膜电位平衡和生理参数来影响藻细胞的活性(Langer *et al*, 2006; Taylor *et al*, 2011; Rokitta *et al*, 2012b)。相比于其他 3 种品系颗石藻, 由于 pH 值下降及超过耐受能力(7.48, 2000 μatm), N-E 更加敏感而呈负反应。因为颗石藻是一种丰富的藻种, 具有独特的生理和形态特征(Winter *et al*, 1994; Raven *et al*, 2012), 推测颗石藻对 CO₂ 增加的特异性反应具有遗传基础。Read 等(2013)报道了第一次解析的基因组(来自 *E. huxleyi* CCMP1516)在复合种内的变异性支持了颗石藻在不同生境中的繁荣发展。结合本实验结果, 猜想颗石藻固有的遗传特异性可能导致其对海洋酸化产生特异性反应。

然而,由于光合系统参数和色素含量分析的藻类光合作用(与生长紧密相关)能力随着 CO_2 增加产生多种负反应,尤其 N-E 几乎丧失光合能力(图 3 和 4)。这些涉及到光系统活动的结果表明,由于 pH 值下降(CO_2 升高)对细胞离子平衡的影响,藻细胞仍然处于光合不健康状态(Langer *et al.*, 2006),诱导了叶绿素含量降低(图 4)。特别是当 CO_2 浓度达到 $2000 \mu\text{atm}$, 超过可调节的范围,与其他 3 种品系颗石藻相比,NE 的 F_v/F_m 和叶绿素 *a* 的含量被严重影响(图 3a 和 4a)。与 CO_2 升高对生长的不同反应相类似,不同藻类光合作用对 CO_2 升高响应也具有特异性。对于整个生态系统来说,一部分的微小变化可能会影响整个生态系统,颗石藻对海洋酸化的特异反应可能会影响生物多样性和其他生态过程(Orr *et al.*, 2005; Hendriks *et al.*, 2010)。

3.2 海洋酸化对颗石藻氮吸收速率的影响

考虑到海洋酸化对营养盐吸收的影响,本研究在第 7 天取样测试了不同 CO_2 水平下各品系藻株的氮吸收速率,并拟合了每种颗石藻应对 CO_2 变化的氮吸收速率响应曲线,以供进一步分析。结果表明,当 CO_2 浓度升高至 $2000 \mu\text{atm}$ 时,所有品系的氮吸收速率增加(图 5)。非钙化藻株 N-E 和 N-G 的氮吸收速率显著的增加了 41.6% 和 48.2%(图 5a 和 c),而钙化藻株 C-E 和 C-G 分别在氮吸收速率提高了 33.9% 和 34.3%。Jin 等(2013)的研究表明, CO_2 增加导致颗石藻对无机氮的吸收增强,硅藻硝酸盐还原酶基因上调。此外,各品系藻种之间也存在差异。

先前的研究表明,在海洋酸化条件下,颗石藻细胞具有能量再分配的过程(Raven, 2011; Beaufort *et al.*, 2011),导致额外的 ATP 释放优先支持额外的氮吸收以合成更多的蛋白质(Jin *et al.*, 2013)。然而,与非钙化细胞相比,钙化细胞需要更多的能量来转运钙化作用中的氢离子到酸性环境中(Suffrian *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011; Beaufort *et al.*, 2011; Stojkovic *et al.*, 2013)。 CO_2 升高到 $2000 \mu\text{atm}$ 时,钙化品系藻株的氮吸收速率显著低于非钙化藻株。此外,本研究在 CO_2 升高下测定 PON 产量也间接证实了氮吸收的能量再分配偏好(图 6b)。

藻氮吸收速率相对 CO_2 变化的响应曲线,证实了 CO_2 对这些颗石藻的影响行为。由响应曲线推导出的动力学常数(K_m)表示酶对底物的亲和力, K_m 值越大,亲和力越小(Michaelis *et al.*, 1913)。最近, Hutchins 等(2013)通过分析不同的动力学常数,证实了固氮作用与 CO_2 浓度之间的品系特异性差异。在这项研究

中,相比其他 3 种藻株, N-E 显示出最高 K_m 值,即 NO_3^- 还原酶的亲和力最低(图 5)。这一结果与其他测量参数,如生长速率、光合活动等反映出相同的趋势,这表明 CO_2 浓度升高严重抑制了 N-E 的生命活动。

3.3 海洋酸化对不同颗石藻元素组成的影响

浮游植物的化学元素组成会对营养相互作用关系有一定影响,并最终对海洋营养元素的生物地球化学产生影响,因为海洋浮游动物的膳食价值随 POC 与 PON 的比值(C : N)变化而变化(Hutchins *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2013)。本研究测量了不同品系颗石藻的 C : N 比例,以评估生物有机体的元素组成是否受到 CO_2 浓度的影响,并探讨了影响的程度。结果显示,在 $2000 \mu\text{atm}$ CO_2 浓度下,4 种品系颗石藻的元素组成均发生变化,C : N 分别降低 76%(N-E)、48%(C-E)、45%(N-G)和 35%(C-G)(图 6)。N-E 相对其他 3 种颗石藻的影响较大,C-G 的影响最小。在之前的研究中, Fiorini 等(2011a)和 Rickaby 等(2010)的研究表明,当 CO_2 浓度增强时,颗石藻发生了相似的变化。当 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 持续上升到 $2000 \mu\text{atm}$ 时,POC(除了在 $2000 \mu\text{atm}$ 下的 N-E)和 PON 的产率增加(图 6)。

研究还发现,与对照组相比, PON 的增加量比 POC 要高。前面已经讨论过,由于 CO_2 的升高,能量的重新分配导致了更多的氮吸收,增加了 PON 产量。尽管不同颗石藻的品系之间存在差异,这种偏好优势使得 PON 产量超过 POC 产量,导致 C : N 下降的幅度不同(图 6)。与 Riebesell 等(2011)之前的研究结果类似,C : N 比值随着 CO_2 浓度的变化具有高度的物种特异性。此外,这种变异比例可能是不同品系藻株间遗传差异的体现。此外,也存在与目前的研究结果相反的结果,随着 CO_2 浓度的升高,细胞 C : N 比值增加(Feng *et al.*, 2010; Kottmeier *et al.*, 2014)。

产生矛盾结果的原因可能是实验设置的不同,如温度、光照强度、藻种的选择等。此外,最终结果表现出一种非常有趣的现象,非钙化藻的 C : N 比值比钙化藻高。这种现象的原因尚不清楚,但很可能与颗石藻钙化作用有关。这些结果表明, CO_2 浓度的增加影响了颗石藻 C : N 比值,并且对不同颗石藻产生了不同的影响。此外,它还将进一步影响浮游植物的捕食选择压力,并对许多生物地球化学循环过程产生影响(特别是碳输出通量)(Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2008)。

3.4 海洋酸化对颗石藻钙化效率的影响

在过去几年里,颗石藻 PIC 生产效率(钙化率)已

被广泛用于颗石藻的研究,以预测海洋酸化的生物学影响。结果表明,当藻细胞生长在高于当前 CO_2 水平时(400 μatm),主要反应是钙化率下降或者至少减少 PIC/POC 的值(Zon-dervan *et al.*, 2001; Langer *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2010; Hoppe *et al.*, 2011)。本研究中,关于 PIC 的响应与上述的趋势是一致的。同时,当 CO_2 浓度由 400 μatm 升高到 2000 μatm 时,钙化赫氏颗石藻和钙化大洋球藻在第 7 天的钙化率分别下降 35.4%和 68.9%(图 7)。相比大洋球藻,赫氏颗石藻更容易受海洋酸化的影响,从而导致生态不平衡的因素。但对于实验中所用的非钙化种,由于失去了表面覆盖的钙化外壳, PIC 的产量几乎可以忽略不计。

最近各种生物体的研究显示,钙化很大程度上是由饱和碳酸钙而不是单靠 pH 值控制(Langer *et al.*, 2006; Trimborn, 2007)。海水中的饱和碳酸钙由(DIC)和 pH 值共同控制(Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2008)。当表层海水过饱和和碳酸钙由于海洋酸化或其他自然过程条件下饱和程度下降时,分布在贝壳和骨骼中的碳酸盐矿物开始溶解(Feely *et al.*, 2009)。该研究表明,当 CO_2 浓度由 400 μatm 升高到 2000 μatm ,钙离子的饱和度降低,但依然处于溶解发生的阈值。结果明确表明,与对照组相比, PIC 的产量(钙化效率)最终有所下降(图 7)。

Langer 等(2009)的研究结果也出现同样的现象,虽然钙离子的饱和度大于 1,但颗粒无机碳的溶解仍然发生。为了解释这一现象,我们发现 400 μatm 和 2000 μatm CO_2 在第 7 天的 pH 值介于 8.81~7.62 之间(表 1 和图 1),并且与空白对照相比,细胞的生理状态和 pH 值有一定的变化。这些变化影响了藻细胞的光合作用,这意味着颗石藻细胞不完全适应改变后的 pH 条件。Bach 等(2011)认为,钙化作用对 pH 值降低具有特异性反应。在 CO_2 升高的情况下,颗石藻的钙化作用是一个严格控制的生物进程(Mackinder *et al.*, 2010),将受到 pH 水平下降的影响。

最近,大量的生理和分子研究证据表明,当使用 HCO_3^- 进行钙化作用(产生 H^+ ,并保持细胞 pH 稳态接近中性)时, H^+ 必须通过膜离子通道被清除(Suffrian *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011)或者在颗石藻细胞中被总和(Fabry *et al.*, 2008; Rokitta *et al.*, 2012; Stojkovic *et al.*, 2013)。为了维持合适的跨质膜电位差和 H^+ 射流, H^+ 输运过程中需要能量(Raven, 2011)。当 CO_2 升高导致水体 pH 值和/或 $[\text{CO}_3^{2-}]$ 水平降低时,单位钙化输入的能量可能更大,从而导致钙化率降低(Raven *et al.*, 2011; Beaufort *et al.*, 2011)。通过研究 CO_2 增加对颗石藻钙化的不利影响,颗石藻的钙化作用与生物

地球化学循环密切相关,虽然我们对钙化作用的降低给出了合理的解释,但这种解释只是事实的一小部分。目前,海洋酸化对钙化颗石藻影响的原因仍然需要进一步的探索。

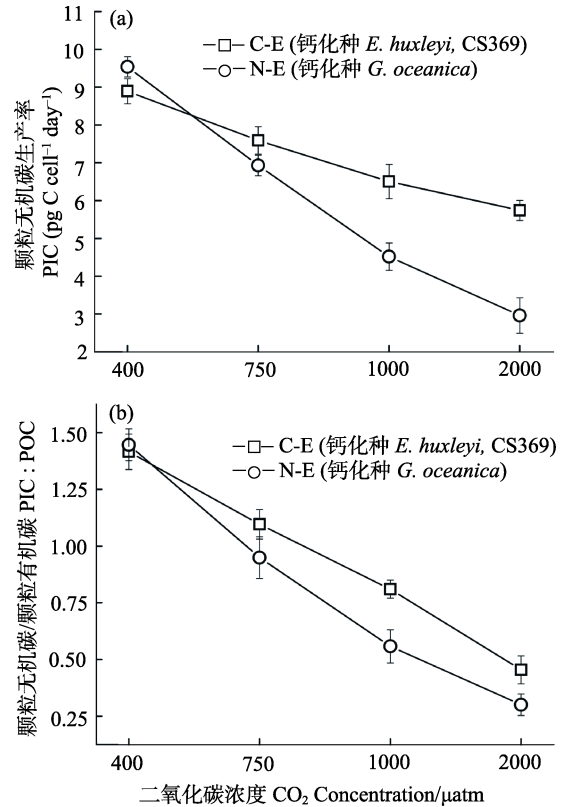


图 7 海水酸化第 7 天对钙化颗石藻的颗粒无机碳生产率以及颗粒无机碳与颗粒有机碳的比值的影响
Fig.7 Effect of seawater acidification by elevated CO_2 concentrations(400, 750, 1000, and 2000 μatm) on PIC production (a) and PIC/POC (b) of the calcifying species (*E. huxleyi* CS369 and *G. oceanica*) on the 7th day

本研究表明,不同颗石藻在应对海洋酸化威胁时表现出了特异的生理响应,随着 CO_2 浓度的逐渐增加,不同颗石藻在维持稳定的原始状态都发生了不同程度的改变。因此,物种分布和丰度的潜在变化可以通过海洋食物网的多种营养水平传递。虽然海洋酸化对生态系统长期影响的研究还处于起步阶段,但这些结果可能指示出在海洋酸化条件下生物多样性、营养相互作用关系、生物地球化学循环和其他生态系统进程的变化。

参 考 文 献

Anderson TR, Hessen DO, Mitra A, *et al.* Sensitivity of secondary production and export flux to choice of trophic transfer formulation in marine ecosystem models. *Journal of*

- Marine Systems, 2013, 125: 41–53
- Bach LT, Riebesell U, Schulz KG. Distinguishing between the effects of ocean acidification and ocean carbonation in the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(6): 2040–2050
- Barcelose RJ, Müller MN, Riebesell U. Short-term response of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* to an abrupt change in seawater carbon dioxide concentrations. *Biogeosciences*, 2010, 7(1): 177–186
- Beaufort L, Barbarin N, Gally Y. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 633–642
- Beaufort L, Probert I, Garidelthoron TD, *et al.* Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature*, 2011, 476(7358): 80–83
- Caldeira K, Wickett ME. Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 2003, 425(6956): 365–366
- De Bodt C, van Oostende N, Harlay J, *et al.* Individual and interacting effects of pCO₂ and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification: Study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. *Biogeosciences*, 2010, 7(5): 1401–1412
- Delille B, Harlay J, Zondervan I, *et al.* Response of primary production and calcification to changes of pCO₂ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Global Biogeochemical Cycles*, 2005, 19(2): GB2023
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, *et al.* Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 2008, 65(3): 414–432
- Falkowski P. Ocean Science: The power of plankton. *Nature*, 2012, 483(7387): S17–20
- Feely RA, Doney SC, Cooley SR. Ocean acidification: Present conditions and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography*, 2009, 22(4): 36–47
- Feng Y, Warner ME, Zhang Y, *et al.* Interactive effects of increased pCO₂, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *European Journal of Phycology*, 2008, 43(1): 87–98
- Fiorini S, Middelburg JJ, Gattuso JP. Effects of elevated CO₂ partial pressure and temperature on the coccolithophore *Syracosphaera pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*, 2011, 64(3): 221–232
- Fiorini S, Middelburg JJ, Gattuso JP. Testing the effects of elevated pCO₂ on coccolithophores (Prymnesiophyceae): Comparison between haploid and diploid life stages. *Journal of Phycology*, 2011, 47(6): 1281–1291
- Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M. Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2010, 86(2): 157–164
- Herfort L, Thake B, Roberts J. Acquisition and use of bicarbonate by *Emiliana huxleyi*. *New Phytologist*, 2002, 156(3): 427–436
- Hoppe CJM, Langer G, Rost B. *Emiliana huxleyi* shows identical responses to elevated pCO₂ in TA and DIC manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 406(1): 54–62
- Hutchins DA, Fu FX, Webb EA, *et al.* Taxon-specific response of marine nitrogen fixers to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 790–795
- Hutchins DA, Mulholland MR, Fu F. Nutrient cycles and marine microbes in a CO₂-enriched ocean. *Oceanography*, 2009, 22(4): 128–145
- Hutchins DA. Oceanography: Forecasting the rain ratio. *Nature*, 2011, 476(7358): 41–42
- Iglesias-Rodriguez MD, Halloran PR, Rickaby REM, *et al.* Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science*, 2008, 320(5874): 336–340
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Summary for policy makers in climate change 2007: The physical sciences basis, working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, edited by: Solomon *et al.* Cambridge University Press, Cambridge, 2007, 1–996
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). The fourth assessment report of the IPCC. Cambridge University Press, 2008
- Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Der Pflanzen*, 1975, 167(2): 191–194
- Jin P, Gao K, Beardall J. Evolutionary responses of a coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* to ocean acidification. *Evolution*, 2013, 67(7): 1869–1878
- Jones BM, Iglesias-Rodriguez MD, Skipp PJ, *et al.* Responses of the *Emiliana huxleyi* proteome to ocean acidification. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1–13
- Kottmeier DM, Rokitta SD, Tortell PD, *et al.* Strong shift from HCO₃⁻ to CO₂ uptake in *Emiliana huxleyi* with acidification: New approach unravels acclimation versus short-term pH effects. *Photosynthesis Research*, 2014, 121(2–3): 265–275
- Langer G, Geisen M, Baumann KH, *et al.* Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 2006, 7(9): 1–12
- Langer G, Nehrke G, Probert I, *et al.* Strain-specific responses of *Emiliana huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences*, 2009, 6(11): 2637–2646
- Langer G. Palaeontology: Plankton in a greenhouse world. *Nature Geoscience*, 2013, 6(3): 164–165
- Lohbeck KT, Riebesell U, Reusch TBH. Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 2012, 5(5): 346–351
- Lohbeck KT, Riebesell U, Reusch TBH. Gene expression changes in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* after 500 generations of selection to ocean acidification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014,

- 281(1786): 20140003
- Ma S, Zhang JH, Liu Y, *et al.* The response of different types of phytoplankton to the elevated CO₂ concentration. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 27–35 [马莎, 张继红, 刘毅, 等. 不同种类浮游植物对 CO₂ 浓度升高的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 27–35]
- Mackinder L, Wheeler G, Schroeder D, *et al.* Molecular mechanisms underlying calcification in coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27(6–7): 585–595
- Meier KJS, Beaufort L, Heussner S, *et al.* The role of ocean acidification in *Emiliana huxleyi* coccolith thinning in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences Discussions*, 2014(11): 2857–2869
- Michaelis L, Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 1913, 49: 333–369
- Müller, MN Schulz KG, Riebesell U. Effects of long-term high CO₂ exposure on two species of coccolithophores. *Biogeosciences*, 2010, 7(3): 1109–1116
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, *et al.* Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 2005, 437(7059): 681–686
- Pelletier G, Lewis E, Wallace D. CO2Sys. xls: A calculator for the CO₂ system in seawater for microsoft excel/VBA. Washington State Department of Ecology/Brookhaven National Laboratory, Olympia, WA/Upton, NY, USA, 2007
- Raven JA, Crawford K. Environmental controls on coccolithophore calcification. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, 470: 137–166
- Raven JA. Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO₂. *Biology and Environment- Proceedings of the Royal Irish Academy*, 2011, 111(1): 1–17
- Read BA, Kegel J, Klute MJ, *et al.* Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*, 2013, 499(7457): 209–213
- Reinfelder JR. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3(1): 291–315
- Rickaby REM, Henderiks J, Young JN. Perturbing phytoplankton: Response and isotopic fractionation with changing carbonate chemistry in two coccolithophore species. *Climate of the Past*, 2010, 6(6): 771–785
- Riebesell U, Tortell PD. Effects of ocean acidification on pelagic organisms and ecosystems. *Ocean Acidification*, 2011: 99–121
- Riebesell U, Zondervan I, Rost B, *et al.* Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 2000, 407(6802): 364–367
- Rokitta SD, John U, Björn R. Ocean acidification affects redox-balance and ion-homeostasis in the life-cycle stages of *Emiliana huxleyi*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52212
- Rokitta SD, Rost B. Effects of CO₂ and their modulation by light in the life-cycle stages of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57(2): 607–618
- Ross PM, Parker L, O'Connor WA, *et al.* The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water*, 2011, 3(4): 1005–1030
- Sciandra A, Harlay J, Lefèvre D, *et al.* Response of coccolithophorid *Emiliana huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 261: 111–122
- Shi D, Xu Y, Morel FMM. Effects of the pH/pCO₂ control method on medium chemistry and phytoplankton growth. *Biogeosciences*, 2009, 6(7): 1199–1207
- Sinutok S, Hill R, Doblin MA, *et al.* Warmer more acidic conditions cause decreased productivity and calcification in subtropical coral reef sediment-dwelling calcifiers. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(4): 1200–1212
- Stojkovic S, Beardall J, Matear R. CO₂-concentrating mechanisms in three southern hemisphere strains of *Emiliana huxleyi*. *Journal of Phycology*, 2013, 49(4): 670–679
- Suffrian K, Schulz KG, Gutowska MA, *et al.* Cellular pH measurements in *Emiliana huxleyi* reveal pronounced membrane proton permeability. *New Phytologist*, 2011, 190(3): 595–608
- Taylor AR, Chrachri A, Wheeler G, *et al.* A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PLoS Biology*, 2011, 9(6): 14–16
- Trimborn S, Langer G, Rost B, *et al.* Effect of varying calcium concentrations and light intensities on calcification and photosynthesis in *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52(5): 2285–2293
- Turley C, Eby M, Ridgwell AJ, *et al.* The societal challenge of ocean acidification. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(6): 787–792
- Winter A, Henderiks J, Beaufort L, *et al.* Poleward expansion of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Journal of Plankton Research*, 2014, 36(2): 316–325
- Winter A, Siesser WG. Coccolithophores. *Coccolithophores*, 1994(95): 252
- Xu D, Wang Y, Fan X, *et al.* Long-term experiment on physiological responses to synergetic effects of ocean acidification and photoperiod in the Antarctic sea ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(14): 7738–7746
- Young JR, Poulton AJ, Tyrrell T. Morphology of *Emiliana huxleyi* coccoliths on the northwestern European shelf—Is there an influence of carbonate chemistry? *Biogeosciences*, 2014, 11(17): 4771–4782
- Zondervan I, Rost B, Riebesell U. Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 272(1): 55–70

Effects of Ocean Acidification on Physiological Characteristics of Coccolithophores

HUANG Shujie^{1,2,3,4}, XU Dong⁴, WANG Dongsheng⁴, ZHANG Xiansheng⁴, YE Naihao⁴^①

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306; 4. 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)

Abstract Ocean acidification caused by increasing amounts of carbon dioxide has a great impact on marine organisms, especially calcified coccolithophores. However, culture experiments examining the response of coccolithophores to elevated CO₂ pa have mostly been based on investigations of a single strain and have yielded differences and even contradictory results from experiments between and even within species. Here, four strains of the coccolithophores, which contained naked and calcifying strains, were investigated simultaneously for the first time. Four carbon dioxide concentration gradients (400 μatm, 750 μatm, 1000 μatm, and 2000 μatm) were set up to systematically study the effects of ocean acidification on growth, photosynthesis, nitrogen source absorption, element composition and calcification efficiency of four coccolithophore species by batch aeration culture. The results did not show a uniform response from the different strains to elevated CO₂ concentrations up to 2000 μatm, and the naked strain *Emiliana huxleyi* (N-E) was seriously suppressed, which was in sharp contrast to the positive response of the other three algae to the different levels. On the other hand, photosynthetic parameters F_v/F_m , Y(II) and pigment show overall downward trend for all four strains, and calcification efficiency of C-E and C-G decrease 35.4% and 68.9% respectively, on the seventh day. In addition, the four coccolithophore strains of particulate organic nitrogen production show an increasing trend and the resulting POC/PON and PIC/POC decline. We determined that the responses of coccolithophores to ocean acidification are specific, and this variation may cause changes to biodiversity and other ecosystem processes in the ocean of the future.

Key words Ocean acidification; Coccolithophores; Specific; Biodiversity

① Corresponding author: YE Naihao, E-mail: yenh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190311002

http://www.yykxjz.cn/

袁艳敏, 刘福利, 杜欣欣, 梁洲瑞, 汪文俊, 孙修涛. 极北海带对氮、磷吸收和砷、镉、铅吸附的研究. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 25-31

Yuan YM, Liu FL, Du XX, Liang ZR, Wang WJ, Sun XT. Study on the assimilation of nitrogen and phosphorus and on the sorption of heavy metals in *Laminaria hyperborea*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 25-31

极北海带对氮、磷吸收和砷、镉、铅吸附的研究*

袁艳敏^{1,2} 刘福利^{2,3①} 杜欣欣⁴ 梁洲瑞^{2,3} 汪文俊^{2,3} 孙修涛^{2,3}

(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. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 青岛 266109)



摘要 极北海带(*Laminaria hyperborea*)分布于大西洋东北海域,有很高的经济和生态价值,有望成为我国海藻资源增值的对象。本研究通过分析极北海带在不同温度下对 N、P 营养盐的吸收,以及对不同重金属离子的吸附,研究其对富营养化和重金属的去除能力。结果显示,1)温度为 9°C~13°C 时,极北海带对 N、P 的吸收率均最高,其中 72 h 后其对 P 的吸收率达到了 95%~98%,对氨氮的吸收率为 96%,对硝酸氮的吸收率约为 42%,表明其对 N、P 有显著的去作用。2)极北海带对 As⁵⁺的富集量为 168.33 mg/kg,藻体表面和内部 As⁵⁺含量无显著差异,分别占藻体 As⁵⁺总量的 55%和 45%,As⁵⁺处理 6 d 后极北海带的相对生长速率为-0.92%/d,极北海带生长不正常。极北海带对 Cd²⁺的吸附量为 15 mg/kg,且 91%的 Cd²⁺位于藻体表面,仅 9%的 Cd²⁺位于藻体内部,相对生长速率为 5.78%/d,说明其对极北海带生长有抑制。极北海带对 Pb²⁺的吸附量为 320 mg/kg,其中 96.5%的 Pb²⁺被吸附于藻体表面,3.5%的 Pb²⁺位于藻体内部,其相对生长速率为 6.73%/d,表明 Pb²⁺对极北海带的生长无显著影响。

关键词 极北海带; 富营养化; 温度; 重金属; 生物修复

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0025-07

当前,我国近海海水富营养化和重金属污染问题日益严重,大型藻类是重要的初级生产者,具有吸收利用水体营养盐和增加溶解氧、吸附重金属离子的功能,可用于海洋生态系统富营养化和重金属污染的生物修复。

海水中营养盐存在的主要形式是氨氮、硝氮和活性磷,其中氨氮在动物养殖水体中含量较高(胡海燕等,2003),而硝氮是水体中无机氮的主要存在形式,且极易被藻类和植物利用,无机正磷酸盐为大部分海藻的主要P源。海藻吸收N、P营养盐已有不少研究

* 青岛市民生科技计划项目(17-3-3-65-nsh)、现代农业产业技术体系藻类体系离岸式养殖岗位专项(CARS-50)和农业农村部农业国际合作交流项目“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作共同资助 [This work was supported by Qingdao Science and Technology Project of People's Livelihood(17-3-3-65-nsh), China Agriculture Research System(CARS-50), and Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries Along the Belt and Road]. 袁艳敏, E-mail: yuanyym2991@163.com

① 通讯作者: 刘福利, 副研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-11, 收修改稿日期: 2019-04-01

(韩婷婷等, 2018; 包杰等, 2008; Liu *et al.*, 2016; 李恒等, 2013)。刘静雯等(2001)研究了细基江蓠繁枝变型(*Gracilari tenuistipitata* var. *liui*)、孔石莼(*Ulva pertusa*)和蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*)在不同温度和盐度下对氨氮的吸收情况; 徐智广等(2011)以龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)为材料, 研究温度、光照强度和硝氮浓度下龙须菜对无机磷吸收的影响。在海藻对各种重金属去除效果方面, 朱明等(2011)、郭赣林等(2011)证实了浒苔(*Enteromorpha prolifera*)对重金属Cu、Cd、Pb均有去除效果, 可用于含Cu²⁺和Pb²⁺废水的生物修复; 黄鹤忠(2013)也发现江蓠对Cu、Cd、Ni、Pb等也有较好的去除效果。因此, 开发新型经济海藻, 用于去除N、P等富营养盐和吸附重金属离子, 对当前近海富营养化和重金属污染的修复有重要参考依据。

极北海带(*Laminaria hyperborea*)属于褐藻纲(Phaeophyceae)、海带目(Laminariales)、海带科(Laminariaceae)、海带属(*Laminaria*), 广泛分布于大西洋东北海域、底质类型为岩礁的潮下带, 其自然分布海域南到葡萄牙北至挪威、俄罗斯(Kain, 1967、1971; Bekkby *et al.*, 2009)。极北海带藻体较大, 藻体明显分为叶(呈掌状, 完整藻体一般分叉形成30片叶)、柄和固着器, 柄和叶的最大长度一般分别为1~3 m和1~2 m(Kain, 1971)。因此, 多年生的极北海带可为其他海洋生物提供索饵场、产卵场或栖息地, 在维护多样性、海洋生物修复等方面有重要价值, 尤其是其极耐低光, 光补偿点可低至4.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, 适应在较深的水域生长(梁洲瑞等, 2018)。当前, 我国正在积极推进海洋牧场建设, 海藻场是关键的组成部分, 由于我国近海透明度普遍较低, 投放的人工鱼礁水层较深, 由于光照限制很难增殖起规模化的“海藻森林”, 而极北海带的“个体大、多年生、耐低光”的三大特征, 可作为构建海藻场的优良藻种。本研究以极北海带为对象, 分析其对N、P吸收和对砷、Cd²⁺、铅吸附的能力, 评价其在海洋生物修复方面的潜力, 为近海生态环境修复和海洋牧场建设提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用极北海带幼苗通过配子体克隆技术培育约3个月左右获得, 叶片长度约为5~10 cm, 极北海带配子体来源于法国布列塔尼半岛海区。幼苗培养条件: 温度为11℃~13℃, 光合有效照射度

(Photosynthetically active radiation, PAR)为40~50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, 光周期为12 L:12 D, 天然海水经过滤、高压灭菌冷却后, 作为培养液, 添加营养盐(PO₄³⁻-P: 0.4 mg/L, NO₃⁻-N: 4 mg/L)。

1.2 实验方法

1.2.1 极北海带对N、P的吸收 实验在1 L的玻璃瓶中进行, 分别在5℃、9℃、13℃和17℃下充气培养, 每个玻璃瓶中分别添加1 L培养液、PO₄³⁻-P (0.3 mg/L)、NO₃⁻-N (3 mg/L)、NH₄⁺-N (3 mg/L)、(1.00±0.05) g的极北海带叶片, 其他培养条件: 光合有效照射度为40~50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为12 L:12 D, 每个温度组3个平行。实验开始后分别在0、24、48和72 h取水样冻存, 使用Nitrate Test in Seawater (Spectroquant, 德国)测定水样中的NO₃⁻-N, Ammonium Cell Test (Spectroquant, 德国)测定水样中的NH₄⁺-N, Phosphate Test (Spectroquant, 德国)测定水样中的PO₄³⁻-P, 测定操作按照说明书进行, 计算各时间点水样中营养盐的百分含量, 营养盐百分含量=各时间点的营养盐浓度×体积/(初始营养盐浓度×体积)

1.2.2 极北海带对As⁵⁺、Cd²⁺、Pb²⁺离子的吸附 海藻吸附重金属, 一部分吸附在藻体表面, 一般是可逆的, 能与强络合剂EDTA(乙二胺四乙酸)形成稳定的络合物, 进而从藻体表面解吸附(雷鸣等, 2008); 一部分吸收进藻体里, 一般不可逆。基于上述理论, 设置以下4个实验。(1)每个瓶子称量(2.00±0.05) g的极北海带叶片(海带大小均匀, 长度5 cm×10 cm, 选取的海带假根尽量小), 记录该重量数值。培养条件: 1 L海水, 温度13℃, 光照60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, 硝酸氮3 mg/L, 磷酸盐0.3 mg/L。(2)对照组不加重金属, 处理组添加单一重金属离子, 分别加Cd²⁺ 0.1 mg/L, Pb²⁺ 0.5 mg/L, As⁵⁺ 0.5 mg/L, 培养液中重金属离子浓度以实际测定为主, 每组均为3个重复。培养液中重金属离子的最终浓度是按照第四类海水标准(GB3097-1997)重金属离子浓度的10倍计算得到的。(3)实验在GXZ智能光照培养箱中进行, 各组在培养0、2、4、6 d后, 取25 ml海水保存。第4天取海水保存后, 不更换培养液, 但在瓶子中补充一定量(N 1 mg/L, P 0.1 mg/L)的营养盐继续培养海带。(4)培养6 d后, 分别把极北海带取出, 用蒸馏水冲洗3次。吸干极北海带表面的水分, 称鲜重, 记录该重量数值, 计算各处理条件下极北海带6 d的相对生长速率。每组极北海带分成2份(每份1 g以上)。其中1份放进0.1 mol/L的EDTA钠盐溶液中浸泡30 min, 使表面的重金属离子被吸附下来, 然后

用蒸馏水把极北海带冲洗干净,用来测定藻体内重金属离子的含量。另外1份不经EDTA钠盐溶液的浸泡,用来测定藻体内外重金属离子的总量。将2份极北海带分别包进锡箔纸或离心管中,放入鼓风干燥箱,60℃下烘干24 h或更长时间,直至恒重后分开保存在自封袋中待检测。

相对生长率(RGR, %/d)采用以下公式计算:

$$RGR = [\ln(W_t/W_0)/t] \times 100\%$$

式中, W_0 为起始时的鲜重, W_t 为 t d 后的鲜重, t 为时间, 本实验 t 为 6 d。

水样中重金属含量的测定采用 US EPA 200.7: 2001, 藻体中 As^{5+} 的测定采用 GB 5009.11-2014 第一法, Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 分别采用 GB 5009.15-2014、GB 5009.12-2010 规定的方法测定。

1.3 数据处理

采用 SPSS 18.0 数据统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、Duncan 多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异, 使用 Excel 软件绘制图形。

2 实验结果

2.1 不同温度下极北海带对 N、P 的吸收

如图 1a 所示, 温度显著影响极北海带对 P 的吸收, 其中, 24 h 时 9℃、13℃、17℃ 培养液中 P 营养盐含量显著低于 5℃ ($P < 0.05$), 且 13℃ 组的 P 含量显

著低于 9℃ 组 ($P < 0.05$), 其他组无显著性差异 ($P > 0.05$)。48 h 和 72 h 时 9℃、13℃ 组的 P 含量显著低于 5℃、17℃ 组 ($P < 0.05$), 且 17℃ 组显著低于 5℃ 组 ($P < 0.05$), 9℃、13℃ 组的 P 含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。各温度组的 P 含量在 48 和 72 h 时无显著性差异 ($P > 0.05$), 但均显著低于 0 和 24 h ($P < 0.05$)。总的来说, 温度为 9℃~13℃ 时, 极北海带对 P 的吸收率较高, 达到了 95%~98%。

如图 1b 所示, 同一时间点各温度下硝酸氮含量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。各温度组不同时间点的分析结果如下: 温度在 5℃ 和 9℃ 下各时间点间均有显著性差异 ($P < 0.05$)。温度在 13℃ 和 17℃ 时, 0 h 时硝酸氮含量均显著高于其他 3 个时间点 ($P < 0.05$), 24 h 时显著高于 72 h ($P < 0.05$), 其他各点间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。温度对极北海带吸收硝酸氮无显著性影响, 相对而言, 9℃~13℃ 为其适宜温度, 吸收率约为 42%。

图 1c 为相同营养盐、不同温度条件下培养液中氨氮含量的变化情况。同一温度不同时间点间培养液中的氨氮含量均有显著性差异 ($P < 0.05$)。各时间点不同温度下的分析结果如下: 24 h 时 5℃ 培养液中氨氮含量显著高于 17℃ ($P < 0.05$), 其他温度间无显著性差异 ($P > 0.05$)。48 h 时 5℃ 下氨氮含量显著高于其他 3 个温度 ($P < 0.05$), 72 h 时 5℃ 和 17℃ 氨氮含量显著高于 9℃、13℃ ($P < 0.05$), 其他无显著性差异 ($P > 0.05$)。9℃~13℃ 为极北海带吸收氨氮的适宜温度, 吸收率达到了 96%。综合图 1b 和图 1c 可知, 同等条件下极北海带优先吸收利用氨氮。

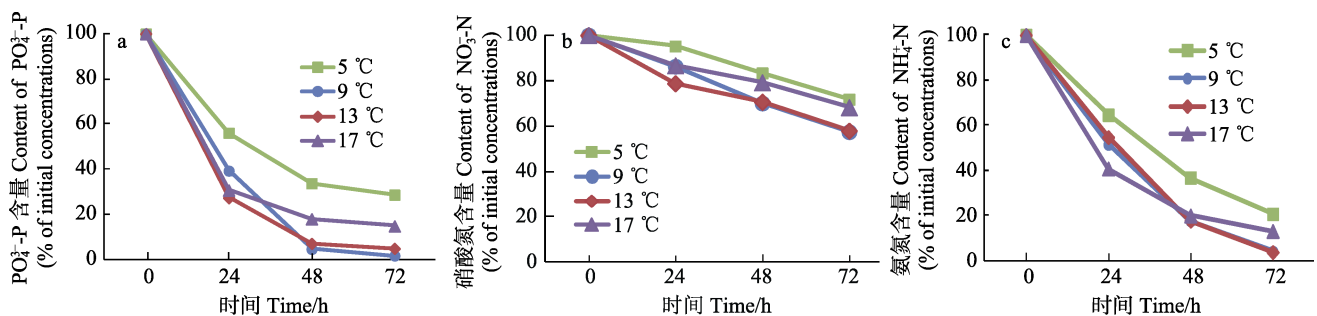


图1 不同温度、不同时间下培养液中磷(a)、硝酸氮(b)、氨氮(c)的百分含量
Fig.1 Percentage of phosphorus (a), nitrate nitrogen (b) and ammonia nitrogen (c) in culture medium at different temperatures and different times

2.2 极北海带对 As^{5+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 离子的吸附

As^{5+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 对极北海带相对生长速率的影响如图2所示, 其中, As^{5+} 对极北海带生长的抑制作用最显著 ($P < 0.05$), 处理 6 d 后, 极北海带的相对生长速率为 -0.92%/d, 质量低于初始时的质量, 极北海带在

0.46 mg/L 的 As^{5+} 离子溶液中不能正常生长。0.06 mg/L Cd^{2+} 处理 6 d 后, 极北海带的相对生长速率为 5.78%/d, 显著低于对照组 7.59%/d ($P < 0.05$), 说明, 此 Cd^{2+} 对极北海带生长有显著的抑制作用。极北海带在 0.09 mg/L 的 Pb^{2+} 溶液中的相对生长速率为 6.73%/d, 此浓度的 Pb^{2+} 溶液对极北海带的生长无显著影响 ($P > 0.05$)。

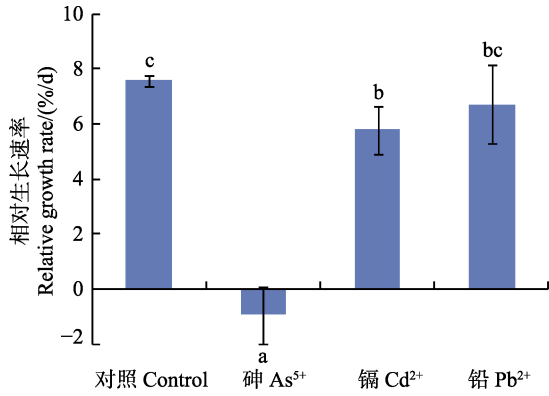


图2 As⁵⁺、Cd²⁺、Pb²⁺处理6 d后极北海带的相对生长速率
Fig.2 Relative growth rate of *L. hyperborea* treated with arsenic, cadmium and lead ions for 6 days

不同字母表示差异性显著，下同
Different letters denoted significant differences.
The same as below

培养液和藻体 As⁵⁺含量变化如图3所示。图3a为培养液中 As⁵⁺含量变化，0 h时培养液中 As⁵⁺含量显著高于2 d($P < 0.05$)，极北海带在2 d内对 As⁵⁺进行了

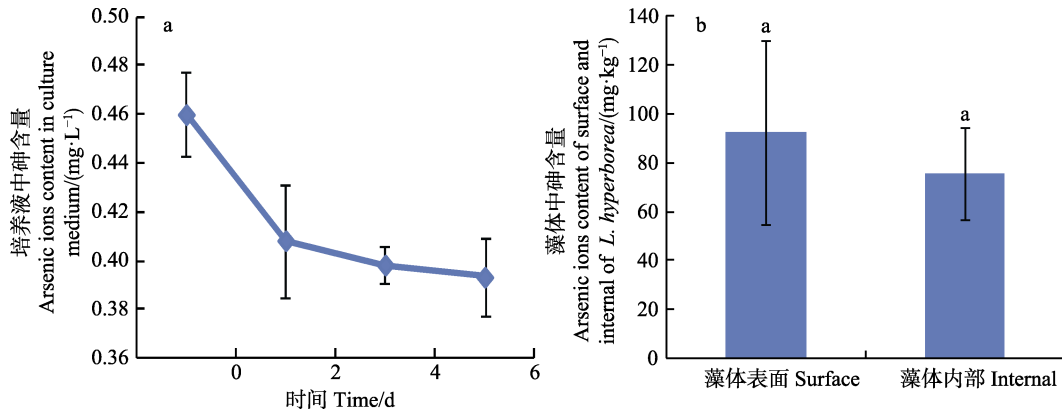


图3 不同时间下培养液 As⁵⁺离子含量(a)和培养6 d后极北海带藻体内外 As⁵⁺离子含量(b)
Fig.3 The arsenic ions content in culture medium at different time and the arsenic ions content of surface and internal of *L. hyperborea* after 6 days

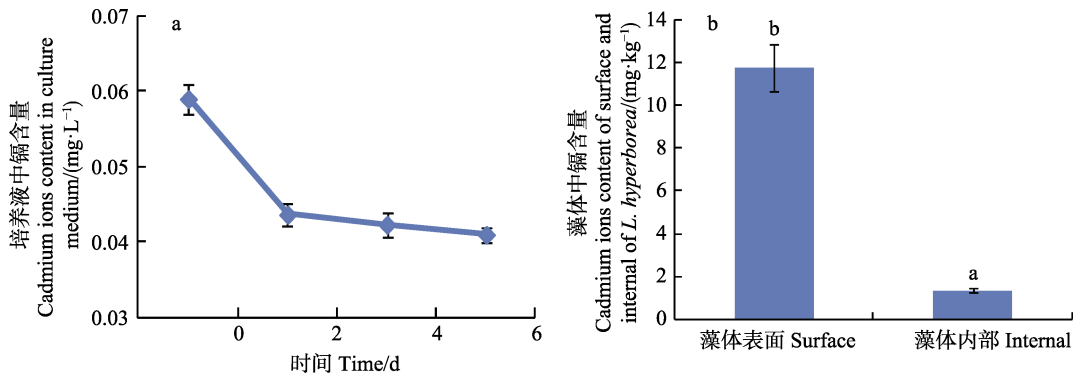


图4 不同时间下培养液 Cd²⁺含量(a)和培养6 d后极北海带藻体内外 Cd²⁺含量(b)
Fig.4 The cadmium ions content in culture medium at different time and the cadmium ions content of surface and internal of *L. hyperborea* after 6 days

较多的吸收，大量的 As⁵⁺对极北海带藻体造成了一定的损害，2 d后吸收效果不显著($P > 0.05$)，说明极北海带对 As⁵⁺的吸收在2 d接近饱和。图3b为 As⁵⁺在极北海带藻体的含量分布，藻体表面吸附的 As⁵⁺和藻体内部吸收的 As⁵⁺含量无显著差异($P > 0.05$)，分别占 As⁵⁺总量的55%和45%。极北海带在此浓度的 As⁵⁺溶液中不能正常生长，As⁵⁺能对藻体造成伤害(图2)。

培养液和藻体 Cd²⁺含量变化如图4所示，图4a为培养液中 Cd²⁺含量变化，0 h时培养液中 Cd²⁺含量显著高于2、4和6 d($P < 0.05$)，且后3个时间点间无显著性差异($P > 0.05$)，说明极北海带对 Cd²⁺的吸收在2 d接近饱和。图4b为极北海带藻体内外 Cd²⁺含量分布，其中，91%的 Cd²⁺位于藻体表面，9%的 Cd²⁺位于藻体内部。极北海带对 Cd²⁺的吸附主要在2 d内，且主要是通过物理吸附而存在于藻体表面，通过生物吸收进入藻体内部的量很少，但依然会显著抑制极北海带的正常生长($P < 0.05$ ，图2)。

培养液和藻体 Pb²⁺含量变化如图5所示，图5a为

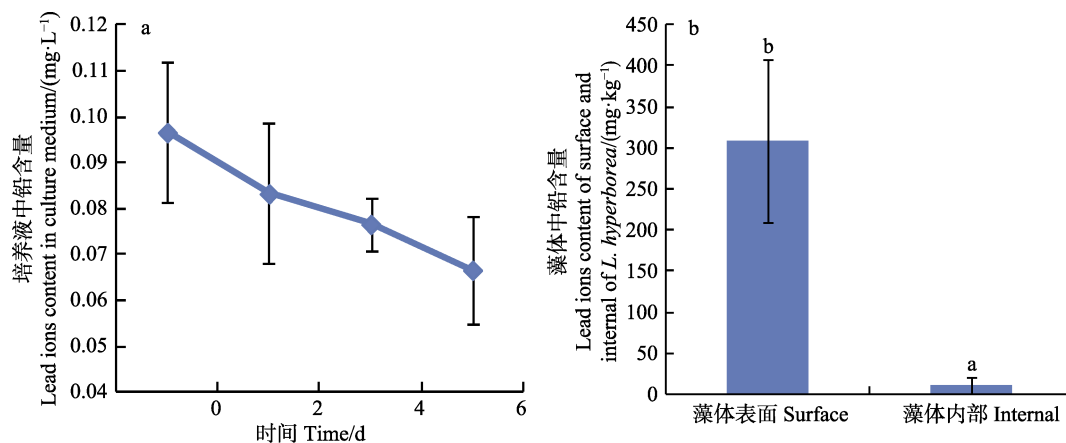


图5 不同时间下培养液 Pb^{2+} 含量(a)和培养 6 d 后极北海带藻体内外 Pb^{2+} 含量(b)

Fig.5 The lead ions content in culture medium at different time and the lead ions content of surface and internal of *L. hyperborea* after 6 days

培养液 Pb^{2+} 含量变化, 其中, 0 h 时培养液 Pb^{2+} 含量显著高于 6 d ($P < 0.05$), 其他各时间点间无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明极北海带对 Pb^{2+} 的吸收不同于对 As^{5+} 和 Cd^{2+} 的吸收, 其吸收过程相对平缓, 而非 2 d 内即接近吸收的饱和值。图 5b 为 Pb^{2+} 在极北海带藻体的分布情况, 其中, 96.5% 的 Pb^{2+} 被吸附于藻体表面, 3.5% 的 Pb^{2+} 位于极北海带藻体内部。培养液中的 Pb^{2+} 主要被吸附在藻体表面, 且在实验阶段内吸附速率趋于稳定持续, 0.1 mg/L 的 Pb^{2+} 浓度对极北海带的生长状态影响不显著 ($P > 0.05$, 图 2)。

3 讨论

N、P 等是大型海藻生长所必需的营养元素, 影响海藻的生长和光合作用等生理活动 (Lapointe, 1987), 温度对海藻呼吸作用及光合作用有影响 (凌晶宇等, 2016; 姚海芹等, 2016)。本研究中, 极北海带在温度为 9℃~13℃ 时, 对 P、氨氮和硝酸氮的吸收率均最高; 梁洲瑞等 (2018) 研究了不同温度对极北海带幼苗生长及光合特性的影响, 证实在 9℃~15℃ 时极北海带幼苗的相对生长速率、光系统 II 最大荧光产量 (F_v/F_m)、光合作用和呼吸作用速率等均高于其他温度, 本研究中, 极北海带在温度为 9℃~13℃ 时具有最大的 N、P 营养吸收率, 这说明 9℃~15℃ 是极北海带幼苗生长的最适温度范围。王翔宇等 (2011) 研究了 6 种大型海藻吸收 N、P 营养盐的能力, 其中, 日本马泽藻 (*Mazzaella japonica*) 对活性磷和氨氮的吸收率最高, 分别为 90.8% 和 98%, 本研究中, 适宜温度范围内极北海带对活性磷和氨氮的吸收率分别为 95%~98% 和 96%, 稍高于日本马泽藻; 而其对硝酸氮的吸收率较低 (42%), 低于孔石莼 (82%) 和日本马泽

藻 (76.9%)。

海带对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 As^{5+} 等重金属离子均有较好的富集作用, 肖君等 (2010) 证实海带对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的吸附量大于很多其他藻类吸附剂, 可用于重金属化水质的改善。本研究中, 极北海带 2、4 和 6 d 对 0.06 mg/L Cd^{2+} 的吸收率分别为 26.0%、28.2% 和 30.5%; 在 2 d 内的吸附速率较高, 吸附量较多, 占总吸附量的 85.2%, 此后吸附速率减慢, 吸附量也较少; 极北海带对 Cd^{2+} 的富集量为 15 mg/kg, 富集后的 Cd^{2+} 主要分布在极北海带藻体表面, 占吸附总量的 91%。0.1 mg/L Pb^{2+} 溶液中, 极北海带 2、4 和 6 d 的吸收率分别为 13.8%、20.7% 和 31.0%, 吸收速率较稳定, 藻体对 Pb^{2+} 的富集量为 320 mg/kg, 被富集的 Pb^{2+} 主要分布在藻体表面, 占总吸附量的 96.5%。推测, 极北海带对 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的富集主要是其细胞表面的吸附作用, 相对而言, Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对极北海带生长的影响较小。海藻中砷大多以有机态存在, 无机态砷含量较少, 但在海水中, 砷大多以有毒的砷盐的形式存在 (范晓等, 1997; Andreae *et al.*, 1978)。聂新华等 (2013) 研究表明, 威海市俚岛和崮山海带养殖区中的海带对无机砷的富集量分别为 0.20 和 0.24 mg/kg, 远低于本研究中极北海带对 As^{5+} 的富集量 (168.33 mg/kg), 其原因可能是本研究中的培养液砷浓度远高于自然海区的砷浓度。

综上所述, 极北海带对 N、P 营养盐具有较强的吸收能力, 72 h 对 P 的吸收率达到了 95%~98%, 对氨氮的吸收率为 96%, 对硝酸氮的吸收率约为 42%, 在一定程度上吸附 As^{5+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 重金属离子。同时, 极北海带还具有“多年生、个体大、耐低光”的特征, 可形成“海底森林”, 因此有望成为我国海洋

藻场建设和生态修复的潜力藻种。

参 考 文 献

- Andreae MO. Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae. *Deep-Sea Research*, 1978, 25(4): 391–402
- Bao J, Tian XL, Dong SL, *et al.* Effect of temperature, salinity and light intensity on nitrogen and phosphorus uptake by *Sargassum thunbergii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 293–300 [包杰, 田相利, 董双林, 等. 温度、盐度和光照强度对鼠尾藻氮、磷吸收的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 293–300]
- Bekkby T, Rinde E, Erikstad L, *et al.* Spatial predictive distribution modelling of the kelp species *Laminaria hyperborea*. *Ices Journal of Marine Science*, 2009, 66(10): 2106–2115
- Fan X, Sun B. Studies on chemical forms and metabolic mechanism of arsenic in seaweeds. *Marine Sciences*, 1997, 21(3): 30–33 [范晓, 孙彪. 海藻中砷的化学形态及代谢机制. *海洋科学*, 1997, 21(3): 30–33]
- Guo GL, Zhu M, Xu JT, *et al.* Biosorption of Cu^{2+} and Cd^{2+} by *Enteromorpha prolifera* and their physiological responses. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(6): 850–837 [郭赣林, 朱明, 徐军田, 等. 浒苔对重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 的生物吸附及其生理反应. *海洋环境科学*, 2011, 30(6): 850–852]
- Han TT, Qi ZH, Huang HH, *et al.* Effects of enrichment with three nitrogen sources on growth and biochemical composition of *Sargassum hemiphyllum* seedlings. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 159–166 [韩婷婷, 齐占会, 黄洪辉, 等. 3 种氮源富加对半叶马尾藻幼苗生长和生化组成的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 159–166]
- Hu HY, Lu JW, Yang HS. Ecological function of macroalgae in fish culture system. *Marine Sciences*, 2003, 27(2): 19–21 [胡海燕, 卢继武, 杨红生. 大型藻类对海水鱼类养殖水体的生态调控. *海洋科学*, 2003, 27(2): 19–21]
- Huang HZ. The bioremoval of nitrogen, phosphorus, cadmium, chromium, copper and nickel by *Gracilaria* and its physiological and biochemical responses. Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2013 [黄鹤忠. 江蓠对 N、P 和重金属 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 污染的去除此效及其生理生化响应. 扬州大学博士研究生学位论文, 2013]
- Kain JM. Populations of *Laminaria hyperborea* at various latitudes. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1967, 15(1–4): 489–499
- Kain JM. Synopsis of biological data on *Laminaria hyperborea*. FAO Fisheries Synopsis No. 87, 1971
- Lapointe BE. Phosphorus- and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: An experimental field study. *Marine Biology*, 1987, 93(4): 561–568
- Lei M, Tanaka M, Liao BH, *et al.* Treatment of heavy metals from wastewater containing EDTA with sulfide precipitation. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(1): 150–154 [雷鸣, 田中干也, 廖柏寒, 等. 硫化物沉淀法处理含 EDTA 的重金属废水. *环境科学研究*, 2008, 21(1): 150–154]
- Li H, Li MZ, Cao J, *et al.* Effects of temperature on nitrogen uptake and growth in several species of macroalgae. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 159–165 [李恒, 李美真, 曹婧, 等. 温度对几种大型海藻硝氮吸收及其生长的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 159–165]
- Liang ZR, Liu FL, Yuan YM, *et al.* Effect of different temperatures on growth and photosynthetic characteristic of *Laminaria hyperborea* young seedling. *Marine sciences*, 2018, 42(4): 71–78 [梁洲瑞, 刘福利, 袁艳敏, 等. 不同温度对极北海带幼苗生长及光合特性的影响. *海洋科学*, 2018, 42(4): 71–78]
- Ling JY, Liang ZR, Wang FJ, *et al.* Effects of high temperature on the antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters of *Saccharina japonica*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 120–125 [凌晶宇, 梁洲瑞, 王飞久, 等. 高温对海带(*Saccharina japonica*)抗氧化酶及叶绿素荧光参数的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 120–125]
- Liu H, Fang W, Wang Q, *et al.* A comparative study of the nutrient uptake and growth capacities of seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Gracilaria lichenoides*. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 1–7
- Liu JW, Dong SL, Ma S. Effects of temperature and salinity on growth of *G. tenuistipitata* var. *liui*, *U. pertusa*, *G. filicina* and $\text{NH}_4\text{-N}$ uptake of *G. tenuistipitata* var. *liui*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, 23(2): 109–116 [刘静雯, 董双林, 马牲. 温度和盐度对几种大型海藻生长率和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸收的影响. *海洋学报*, 2001, 23(2): 109–116]
- Nie XH, Zhang XC, Liu ZY. Distribution characteristics and enrichment regularity of arsenic in kelp. *Agro-Environment and Development*, 2013, 30(4): 58–61 [聂新华, 张学超, 刘缙延. 海带中砷的分布特征及富集规律研究. *农业资源与环境学报*, 2013, 30(4): 58–61]
- Wang XY, Zhan DM, Li MZ, *et al.* Preliminary studies on the nitrogen and phosphorus absorption capability of macroalgae. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 67–71 [王翔宇, 詹冬梅, 李美真, 等. 大型海藻吸收氮磷营养盐能力的初步研究. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 67–71]
- Xiao J, Miyamoto C, Yu KF, *et al.* Biosorption of Cd^{2+} , Pb^{2+} onto *Laminaria japonica*. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(2): 226–230 [肖君, 宫本周宪, 于克锋, 等. 海带对镉、铅的吸附作用及其机理. *环境化学*, 2010, 29(2): 226–230]
- Xu ZG, Zou DH, Gao KS, *et al.* Effects of temperature, irradiance level and nitrate concentration on the uptake of inorganic phosphorus in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1023–1029 [徐智广, 邹定辉, 高坤山, 等. 不同温度、光照强度和硝氮浓度下龙须菜对无机磷吸收的影响. *水产*

- 学报, 2011, 35(7): 1023–1029]
- Yao HQ, Liang ZR, Liu FL, *et al.* Preliminary studies on the photosynthetic and respiration rate of young sporophyte of a new *Saccharina* variety “Haitian No.1” using liquid-phase oxygen measurement system. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 140–147 [姚海芹, 梁洲瑞, 刘福利, 等. 利用液相氧电极技术研究“海天1号”海带(*Saccharina japonica*)幼孢子体光合及呼吸速率. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 140–147]
- Zhu M, Guo GL, Liu ZP, *et al.* Bioabsorption of Pb^{2+} and physiological responses in green alga *Enteromorpha prolifera*. *Fisheries Science*, 2011, 30(11): 681–684 [朱明, 郭赣林, 刘兆普, 等. 浒苔对重金属 Pb^{2+} 的生物吸附及其生理反应. *水产科学*, 2011, 30(11): 681–684]

(编辑 马瑾艳)

Study on the Assimilation of Nitrogen and Phosphorus and on the Sorption of Heavy Metals in *Laminaria hyperborea*

YUAN Yanmin^{1,2}, LIU Fuli^{2,3①}, DU Xinxin⁴, LIANG Zhouhui^{2,3}, WANG Wenjun^{2,3}, SUN Xiutao^{2,3}

(1. College of Fisheries 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; 4. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract *Laminaria hyperborea* is an economically and ecologically important kelp. It can grow lushly in the subtidal zone and from the seaweed forest, playing a significant ecological function. In this study, the absorption rates of nitrogen and phosphorus of *L. hyperborea* was determined at different temperatures (5°C, 9°C, 13°C, 17°C), as well as relative growth rate (RGR) and accumulation of selected heavy metal ions (arsenic ions As^{5+} , cadmium ions Cd^{2+} , lead ions Pb^{2+}), aiming to evaluate whether *L. hyperborea* is a potentially feasible candidate species for marine bioremediation. The main results are as follows: (1) the experimental specimens illustrated maximum absorption rates of nitrogen and phosphorus at 9°C~13°C after 72 h. The maximum absorption rates of phosphorus, ammonia nitrogen and nitrogen nitrate were 95%~98%, 96% and 42% respectively, indicating that the removal of nitrogen nitrate, ammonia nitrogen, and phosphorus by *L. hyperborea* from seawater is significant. (2) The total arsenic ions content accumulated in the *L. hyperborea* was 168.33 mg/kg, there was no significant difference between the surface (55%) and inner (45%) of the algae; the relative growth rate was -0.92%/d when *L. hyperborea* were treated with arsenic ions for 6 days. The total cadmium ions content accumulated in *L. hyperborea* was 15 mg/kg, and the surface content (91%) was significantly higher compared to the inner content (9%); the relative growth rate of those individuals who were treated with Cd^{2+} enriched solution for 6 days was 5.78%/d (lower than the control). The total lead ion content accumulated in the *L. hyperborea* was 320 mg/kg. The surface concentration (96.5%) was significantly higher compared to that of the inner concentration (3.5%) of the algae; the relative growth rate of those individuals who were treated in Pb^{2+} enriched solution for 6 days was 6.73%/d, which had no significant difference with control condition. The results suggested *L. hyperborea* could be an ideal candidate in marine bioremediation.

Key words *Laminaria hyperborea*; Eutrophication; Temperature; Heavy metal ions; Bioremediation

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190322001

http://www.yykxjz.cn/

李磊, 平仙隐, 宋炜, 蒋玫, 黄艇, 王鲁民. 基于 IBR 模型的 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的毒性效应研究. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 32-39

Li L, Ping XY, Song W, Jiang M, Huang T, Wang LM. Toxic effects of copper ion in *Mytilus coruscus*: An integrated biomarker approach. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 32-39

基于 IBR 模型的 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的毒性效应研究*



李磊¹ 平仙隐¹ 宋炜¹ 蒋玫¹ 黄艇² 王鲁民^{1①}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;

2. 美国国际铜专业协会上海代表处 上海 200020)

摘要 为了研究 Cu^{2+} 对厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 的毒性效应, 开展了厚壳贻贝幼体在 Cu^{2+} 水溶液中的 96 h 急性毒性效应实验及 7 d 胁迫实验, 将厚壳贻贝内脏团、鳃组织中的超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、脂质过氧化水平 (Lipid peroxidation, LPO) 以及金属硫蛋白 (Metallothioneins, MT) 作为生物标志物, 应用综合生物标志物响应 (Integrated biomarker response, IBR) 指数整合 4 种生物标志物。结果显示, Cu^{2+} 对厚壳贻贝幼体的 96 h 半致死浓度为 1.55 mg/L, 内脏团、鳃组织各个生物标志物指标呈现出不同的变化趋势, 内脏团、鳃组织 SOD、CAT 活性以及鳃组织 MT 含量均呈先上升后下降的趋势, 内脏团组织 MT 含量及内脏团、鳃组织 MDA 含量均呈持续上升的趋势。IBR 值呈先上升后下降的趋势, 内脏团组织 IBR 值高于鳃组织。研究表明, 生物标志物的变化与 Cu^{2+} 暴露浓度有关, IBR 分析可以辨别不同暴露浓度之间的差异, 可以作为量化污染物暴露效应的有效工具。

关键词 厚壳贻贝; 铜离子; 毒性效应; IBR 模型

中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0032-08

人类对重金属的开发利用历史悠久, 随着现代工业的发展, 大量的重金属被排入水体环境中, 由于重金属不能被生物降解, 因此, 已经成为一类典型的传统环境污染物, 主要包括铅 (Pb)、镉 (Cd)、铬 (Cr)、汞 (Hg)、类金属砷 (As) 等毒性较强的重金属, 也包括铜 (Cu)、锌 (Zn)、镍 (Ni) 等有一定毒性的一般重金属 (Bhuyan *et al*, 2017; Järup, 2003)。重金属通过生物富集在海洋生物体内累积并最终通过食物链途径转移

到人体体内, 危害人类健康 (Apeti *et al*, 2005; 孙元芹等, 2013)。Cu 是一种存在于各种岩石和矿物中的微量金属元素, 由于其使用广泛, 不能被生物降解, 易在生物体内积累且对水生生物具有致毒效应毒性而受到广泛关注 (Sloman *et al*, 2005)。水体中溶解态 Cu^{2+} 对海洋鱼类 (Johnson *et al*, 2007; Monteiro *et al*, 2009)、微藻 (Cid *et al*, 1995)、甲壳类 (Hansen *et al*, 1992; Young *et al*, 1979)、无脊椎动物 (Iwinski *et al*,

* 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2017HY-ZD0606)、现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-47-G25) 和中国水产科学研究院科技创新团队项目 (2020TD14) 共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2017HY-ZD0606), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-47-G25), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2020TD14)]. 李磊, E-mail: zheyilee@126.com

① 通讯作者: 王鲁民, 研究员, E-mail: lmwang@eastfishery.ac.cn

收稿日期: 2019-03-22, 收修改稿日期: 2019-04-12

2016)、贝类(Chang *et al.*, 1996)等会产生氧化应激、DNA 损伤、细胞凋亡、蛋白质变性等各类毒性效应。

相比较其他海洋生物,海洋贝类由于其滤食性特点,更容易从周围环境中富集 Cu^{2+} 等重金属,常被用作重金属污染的指示生物,因此,研究重金属对海洋贝类的毒性效应有重要的现实意义(Nsofor *et al.*, 2014)。厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)主要分布于中国的渤海、黄东海等地,日本、朝鲜部分区域也有分布,属于滤食性附着生活的双壳贝类。国内外学者利用分子生物标志物研究了 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的毒性效应, Xu 等(2016)、Li 等(2012)、Wu 等(2017)、王昊盛等(2017)、刘慧慧等(2014)从不同角度研究了厚壳贻贝不同组织酶活性及相关基因表达对 Cu^{2+} 暴露胁迫的响应。张翼飞(2017)研究了 Cu^{2+} 和苯并芘(BaP)对厚壳贻贝的联合毒性效应。但各类生物标志物对 Cu^{2+} 的敏感程度不同,诱导程度、变化趋势也存在差异,单独依据个别生物标志物对 Cu^{2+} 暴露的响应不能有效的评估 Cu^{2+} 的毒性效应,需要一种能够评估生物标志物整体变化的方法。综合生物标志物响应(Integrated biomarker response, IBR)指数能够综合所有的生物标志物对污染物的响应,转换成“压力指数”值,已经应用于评估各类污染物的生物毒性效应研究中(Kim *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2013)。

本研究通过 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的暴露实验,比较分析了厚壳贻贝的鳃、内脏团组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、脂质过氧化水平(Lipid peroxidation, LPO)、金属硫蛋白(Metallothioneins, MT)含量等生物标志物在不同 Cu^{2+} 暴露下的变化及相关关系,应用 IBR 指数评价组织对 Cu^{2+} 暴露的响应差异,探讨 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的致毒机理及其生理响应,为基于双壳贝类的重金属污染监测预警提供更多的技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

厚壳贻贝取自浙江省嵊泗县枸杞岛养殖区,平均体重为(6.06±0.34) g,参考养殖区水环境条件并使用海水晶(溶解于纯净水中, Cu^{2+} 浓度为 1.3×10^{-3} mg/L)、纯净水配制实验用海水(盐度为 32.5, pH 为 8.10),水质指标符合《渔业水质标准》(国家环境保护局, 1989)的要求。实验容器为 10 L 的玻璃容器。 Cu^{2+} 实验母液为 100 mg/ml 的 Cu^{2+} 标准溶液(中国标准物质网),实验时稀释到所需浓度。厚壳贻贝在实验开始前暂养 3 d,每天投喂角毛藻(*Chaetoceros gracilis*),每 24 h 100%换水 1 次,水温为(19.0±0.3)°C。

1.2 实验方法

1.2.1 96 h 急性毒性实验 采用半静态实验方法,先进行预实验,确定厚壳贻贝全部死亡的最低浓度(LC₀)和 96 h 全部存活的最大浓度(LC₁₀₀),在预实验的基础上,设置 6 组实验浓度(8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 mg/L,配制海水中的 Cu^{2+} 浓度极低,忽略不计),同时,设置 1 组海水对照组,每组 3 个重复,分别放置 30 个厚壳贻贝。实验期间,光照比为 12:12,水温为(19.0±0.3)°C,容器加入 5 L 海水,每 24 h 100%换水 1 次,实验期间不投喂饵料,使用微型充气泵充氧,溶解氧(DO)的范围为 7.0~7.5 mg/L。及时将死亡的厚壳贻贝捞出,死亡标准是用玻璃棒重复触碰,若厚壳贻贝没有反应确认为死亡。分别于第 24、48、72、96 小时记录厚壳贻贝的死亡情况。

利用 SPSS16.0 软件进行数据处理,采用概率单位算法计算 96 h LC₅₀,根据公式: $SC=96 \text{ h LC}_{50} \times 0.1$,计算 Cu^{2+} 的安全浓度。

1.2.2 7 d 毒性实验 根据 96 h 急性毒性实验结果(96 h LC₅₀=1.55 mg/L),设置 0.04、0.08、0.16 mg/L 共 3 组实验浓度(1/10 急性毒性实验浓度),实验进行 7 d 时,实验条件与 96 h 急性毒性实验相同,实验前与第 0、1、3、7 天分别采集 8 个样品,取鳃、内脏团组织,保存在液氮中。

1.3 毒理学指标的测定

使用超纯水(Millipore, 美国)配制与厚壳贻贝生理盐度相同的冰水,取约 0.5 g 鳃、内脏团样品置于 4.5 ml 生理盐水中,在 15000 r/min 条件下,使用自动匀浆机(Ika T10b, 德国)匀浆,匀浆样品在 4°C、1431 r/min 条件下,离心 20 min,取上清液(Lowe *et al.*, 1995),使用南京建成生物工程研究所试剂盒测定 SOD、CAT 酶活性及 MDA 含量(代表 LPO 水平)。

将鳃、内脏团样品按照 1:4 的比例(体重/体积比)加入 Tris-HCl 缓冲液(pH 为 8.3),冰浴条件下匀浆,然后将匀浆液在 0°C、10000 r/min 下离心 30 min,取上清液,采用镉-血红蛋白饱和法测定 MT 含量(Onosaka *et al.*, 1982)。利用原子吸收仪(SOLAARM6, Thermo Fisher Scientific, 美国)分析 Cd^{2+} 浓度,按照 1 个 MT 分子结合 6 个 Cd^{2+} 和 MT 分子量为 7000 Da 的原则(Narula *et al.*, 1995)计算 MT 的含量(μg/g)。

1.4 综合生物标志物响应指数

应用 IBR 值的计算方法并参照 Kim 等(2016)的方法。首先,计算生物标志物在各阶段的平均值(x_i)、

总平均值(\bar{x})、标准差(s), 然后, 按照下列公式对各阶段的 x_i 进行均一化处理:

$$x'_i = (x_i - \bar{x}) / s \quad (1)$$

式中, x'_i 为 x_i 均一化后的值。

各阶段生物标志物的得分 B_i 值计算公式:

$$B_i = Z + |x_{\min}| \quad (2)$$

式中, $|x_{\min}|$ 为各阶段生物标志物均一化处理后的数据最小值的绝对值, B_i 值的大小在星状图中以辐射线的长度代表, 星状图面积(即图中由相邻生物标志物的辐射线围成的三角形面积 A_i 之和)按照下列公式计算:

$$IBR = \sum_{i=1}^n A_i \quad (3)$$

$$A_i = B_i / 2 \sin \beta (B_i \cos \beta + B_{i+1} \sin \beta) \quad (4)$$

$$\beta = \arctan(B_{i+1} \sin \alpha / B_i - B_{i+1} \cos \alpha) \quad (5)$$

式中, n 为生物标志物数量; α 为相邻的 2 条辐射线夹角, $\alpha=2\pi/n$; $B_{n+1}=B_1$ 。当 $n=4$ 时, $\alpha=\pi/2$, A_i 计算公式可以简化为:

$$A_i = B_i B_{i+1} / 2$$

1.5 数据处理与分析

所有数据均以平均值 \pm 标准差(Means \pm SD)表示, 应用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析, 采用单因素方差(One-way ANOVA)对数据进行分析, 差异显著时进行 Duncan's test 多重比较, 显著性水平设为 0.05。

2 结果

2.1 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的 96 h 急性毒性实验

Cu^{2+} 浓度与厚壳贻贝的死亡率之间表现为正相关的剂量效应关系, 剂量效应关系公式为:

$$y = 0.834x + 4.634$$

相关系数 $R^2=0.958$, 96 h LC_{50} 浓度为 1.55 mg/L, 安全浓度为 0.16 mg/L。

2.2 Cu^{2+} 对厚壳贻贝鳃、内脏团组织 SOD、CAT 活性及 MDA、MT 含量的影响

2.2.1 Cu^{2+} 对厚壳贻贝鳃、内脏团组织 SOD 活性的影响 各实验组中, 厚壳贻贝鳃组织、内脏团的 SOD 活性均表现为先上升后下降的趋势(图 1)。各实验组厚壳贻贝鳃组织的 SOD 活性在第 1 天即达到最高值, 其中, 0.16、0.08 mg/L 组鳃组织的 SOD 活性均显著高于对照组($P<0.05$), 分别为对照组的 2.93、2.20 倍, 0.04 mg/L 组中鳃组织的 SOD 活性与对照组之间无显著差异($P>0.05$); 第 3 天时, 仅有 0.16 mg/L 组鳃组织的 SOD 活性显著高于对照组($P<0.05$); 第 7

天时, 3 组实验组中鳃组织的 SOD 活性与对照组间均无显著差异($P>0.05$)(图 1a)。0.16 mg/L 实验组厚壳贻贝内脏团的 SOD 活性在 3 个取样阶段均显著高于对照组($P<0.05$), 第 3 天达到峰值, 分别为对照组的 2.45、3.32、2.80 倍; 0.08 mg/L 组内脏团的 SOD 活性在第 3、7 天显著高于对照组, 分别为对照组的 2.48 和 2.11 倍; 0.04 mg/L 组鳃组织的 SOD 活性与对照组间无显著差异($P>0.05$)(图 1b)。

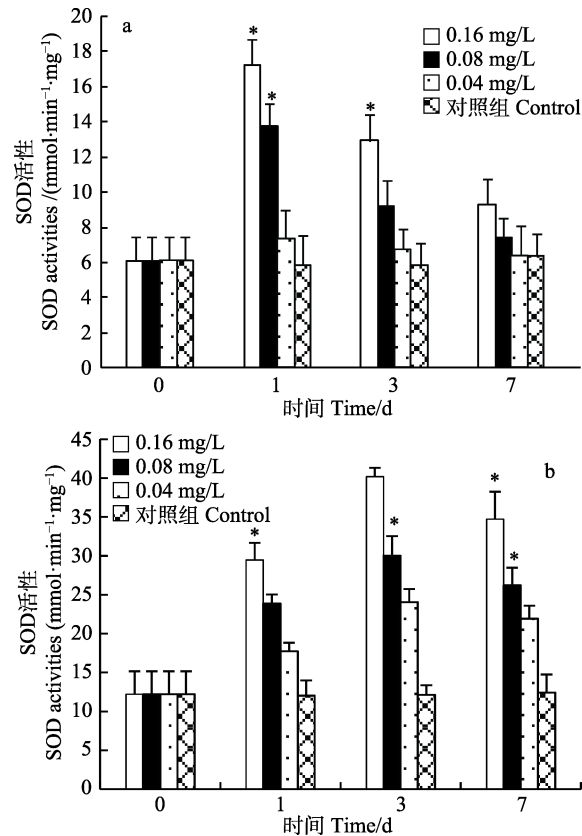


图 1 Cu^{2+} 对鳃(a)、内脏团(b)SOD 活性的影响
Fig.1 Effects of Cu^{2+} on SOD activities of gill (a) and visceral mass (b)

*为与对照组相比差异显著($P<0.05$), 下同
Single asterisk (*) indicates significant difference between treatment groups and control group ($P<0.05$), the same as below

2.2.2 Cu^{2+} 对厚壳贻贝鳃、内脏团 CAT 活性的影响 各实验组中, 厚壳贻贝鳃组织、内脏团的 CAT 活性变化呈先上升后下降的趋势(图 2)。各实验组厚壳贻贝鳃组织的 CAT 活性在第 1 天即达到最高值, 但仅有 0.16 mg/L 实验组鳃组织的 CAT 活性显著高于对照组($P<0.05$), 为对照组的 3.02 倍, 其余实验组与对照组间均无显著差异($P>0.05$)(图 2a)。各实验组厚壳贻贝内脏团的 CAT 活性也在第 1 天即达到最高值, 其中, 0.16、0.08 mg/L 实验组内脏团的 CAT 活性均显

著高于对照组($P < 0.05$), 分别为对照组的 3.50、2.65 倍; 0.04 mg/L 实验组内脏团的 SOD 活性与对照组间无显著差异($P > 0.05$)。第 3 天仅有 0.16 mg/L 实验组内脏团组织的 CAT 活性显著高于对照组($P < 0.05$), 第 7 天各实验组内脏团的 CAT 活性与对照组之间均无显著差异($P > 0.05$)(图 2b)。

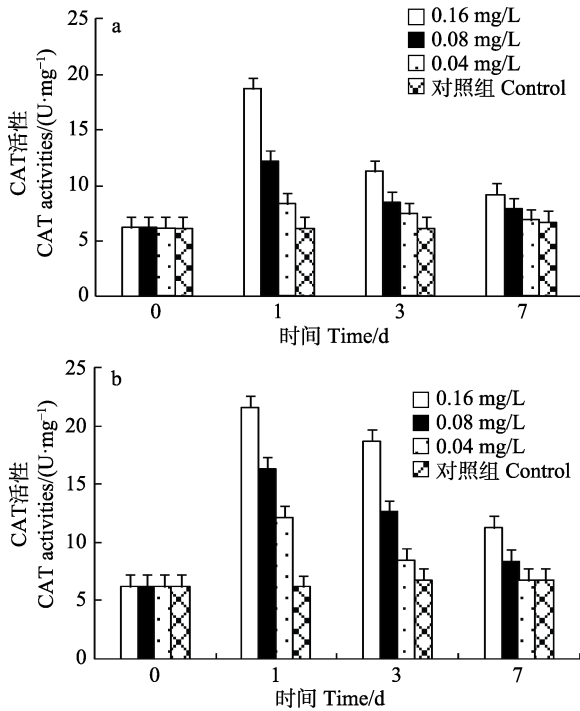


图 2 Cu^{2+} 对鳃(a)、内脏团(b)CAT 活性的影响
Fig.2 Effects of Cu^{2+} on CAT activities of gill (a) and visceral mass (b)

2.2.3 Cu^{2+} 对厚壳贻贝鳃、内脏团 MDA 含量的影响

各实验组厚壳贻贝鳃组织、内脏团的 MDA 含量均呈逐渐上升的趋势(图 3)。第 3 天开始, 0.16、0.08 mg/L 实验组鳃组织的 MDA 含量均显著高于对照组($P < 0.05$), 0.04 mg/L 实验组鳃组织的 MDA 含量与对照组间无显著差异($P > 0.05$)(图 3a)。第 1 天开始, 0.16、0.08 mg/L 实验组内脏团的 MDA 含量均显著高于对照组($P < 0.05$), 0.04 mg/L 实验组内脏团组织的 MDA 含量与对照组间无显著差异($P > 0.05$); 第 3、7 天时, 3 个实验组内脏团组织的 MDA 含量均显著高于对照组($P < 0.05$)(图 3b)。

2.2.4 Cu^{2+} 对厚壳贻贝鳃、内脏团 MT 含量的影响

各实验组厚壳贻贝鳃组织的 MT 含量变化呈先上升后下降的趋势(图 4a)。厚壳贻贝鳃组织的 MT 含量在第 1 天即达到最高值, 其中, 0.16、0.08 mg/L 实验组鳃组织的 MT 含量均显著高于对照组($P < 0.05$); 分别为对照组的 5.25、3.12 倍, 0.04 mg/L 实验组内

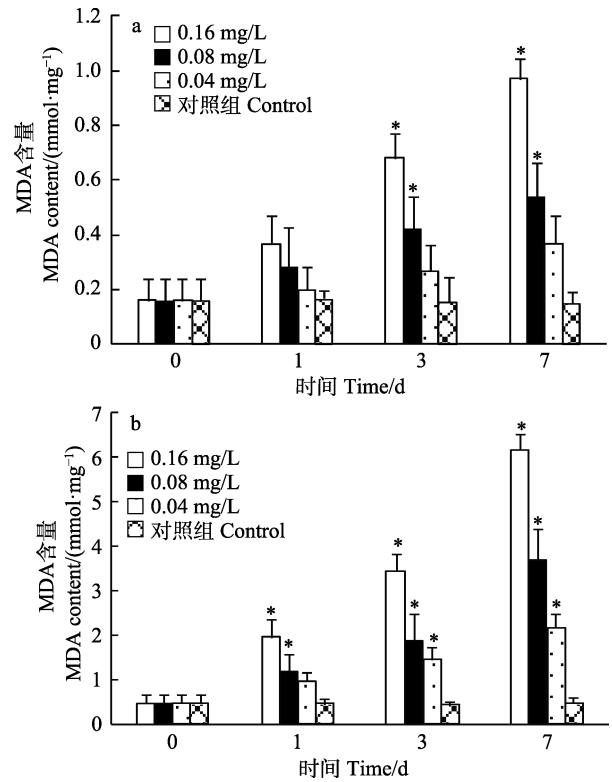


图 3 Cu^{2+} 对鳃(a)、内脏团(b)MDA 含量的影响
Fig.3 Effects of Cu^{2+} on MDA content of gill (a) and visceral mass (b)

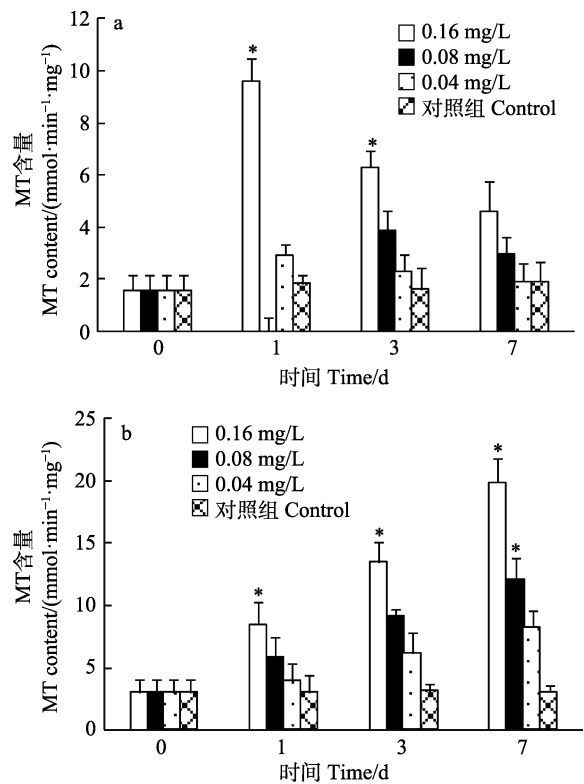


图 4 Cu^{2+} 对鳃(a)、内脏团(b)MT 含量的影响
Fig.4 Effects of Cu^{2+} on MT content of gill (a) and visceral mass (b)

鳃组织的 MT 含量与对照组间无显著差异($P>0.05$); 第 3、7 天仅有 0.16 mg/L 实验组中鳃组织的 MT 含量均显著高于对照组($P<0.05$), 其余 2 个实验组与对照组间无显著差异($P>0.05$)(图 4a)。各实验组厚壳贻贝内脏团的 MT 含量变化呈逐渐上升的趋势(图 4b)。第 1 天开始, 仅有 0.16 mg/L 实验组内脏团的 MT 含量显著高于对照组($P<0.05$), 为对照组的 2.76 倍, 其余 2 个实验组内脏团的 MT 含量与对照组间无显著差异($P>0.05$); 第 3 天时, 0.16、0.08 mg/L 实验组内脏团组织的 MT 含量均显著高于对照组($P<0.05$), 分别为对照组的 4.21、2.86 倍, 0.04 mg/L 实验组内脏团组织的 MT 含量与对照组间无显著差异($P>0.05$); 第 7 天时, 3 个实验组中内脏团组织的 MT 含量均显著高于对照组($P<0.05$)。

2.3 综合生物标志物分析

各实验组厚壳贻贝鳃组织、内脏团组织 IBR 值随暴露时间的变化见图 5。从图 5 可以看出, 1~7 d 各实验组厚壳贻贝鳃组织、内脏团组织 IBR 值均呈先上升后下降的趋势。其中, 0.16、0.08 mg/L 实验组中鳃组织均在第 3 天达到峰值, 0.04 mg/L 实验组中鳃组织在第 1 天达到峰值, IBR 峰值分别为 2.23、1.24、0.41(图 5a)。0.16、0.08、0.04 mg/L 实验组内脏团组织均在第 3 天达到峰值, IBR 峰值分别为 12.24、5.98、3.22(图 5b)。相同浓度下, 内脏团组织 IBR 值高于鳃组织, 各实验组厚壳贻贝鳃组织、内脏团组织 IBR 值均随实验浓度的下降而下降。

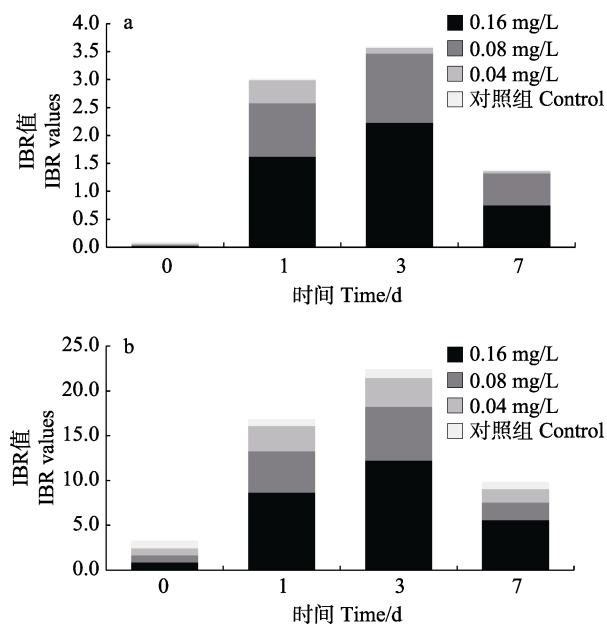


图 5 IBR 值随时间的变化

Fig.5 IBR values changes over time

3 讨论

污染物在生物体内的富集可以触发氧化还原反应产生自由基, 特别是细胞内 ROS, 如超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基及其衍生物(Oost *et al*, 2003)。一般情况下, ROS 的产生和消除处于动态平衡, 然而, 高活性中间体可攻击细胞内外的靶标, 当 ROS 累积到一定程度时, 超过抗氧化防御系统的能力时, 就会引起脂质过氧化(LPO)(Alzbeta *et al*, 2012)。SOD 能将 O_2^- 转化成 H_2O_2 , CAT 能进一步将 H_2O_2 转化成水, 是抗氧化系统的重要组成部分(Solé *et al*, 1995、2000), LPO 可用丙二醛(MDA)含量代表(Masseroli *et al*, 1990), MT (Thirumoorthy *et al*, 2007)在重金属胁迫过程中的变化是重金属污染的典型指标, 上述指标均可以作为典型的生物标志物反映污染物对生物体组织的影响。

在本研究中, 各实验组中鳃组织、内脏团组织 MDA 含量在第 1 天即开始上升(图 3)。表明 Cu^{2+} 暴露产生的 ROS 已对鳃组织、内脏团组织造成了一定的氧化损伤。第 1 天时, 各实验组鳃组织、内脏团组织 SOD 活性也开始上升, 且高浓度暴露组均显著高于对照组($P<0.05$), 此时, ROS 的大量累积诱导 SOD 活性发生代偿性上升以清除 ROS, 随后各实验组鳃组织 SOD 活性开始下降, 内脏团组织 SOD 活性在第 3 天开始下降, 表明 ROS 的大量累积超过了 SOD 清除自由基的能力, 对鳃组织、内脏团组织造成了一定的损伤, 抑制了 SOD 的活性。CAT 与 SOD 功能相关, 在抗氧化过程中仅次于 SOD 被诱导(Velisek *et al*, 2011), 各实验组中, 鳃组织、内脏团组织 CAT 活性表现出与 SOD 活性类似的剂量-效应关系, 均呈先上升后下降的变化趋势, SOD 转化功能的下降也导致了 CAT 的诱导量下降。另外研究也表明, CAT 也可以被 O_2^- 等灭活(Modesto *et al*, 2010), 这可能也是 CAT 活性下降的原因。

Zn、Cu、Cd、Hg 等重金属能诱导 MT 的合成, 并与重金属相结合, 诱导程度与重金属浓度、种类具有一定的相关性, 是生物体解毒代谢重金属的重要途径之一, MT 含量的变化可以预测机体组织受重金属胁迫的压力, 已经在众多研究中证实(Ridlington *et al*, 1979; Thirumoorthy *et al*, 2007)。 Cu^{2+} 是生物体新陈代谢必需的元素之一, 但过量的 Cu^{2+} 对生物体组织会造成损伤。在本研究中, 各实验组中鳃组织、内脏团组织 MT 含量第 1 天即开始上升, 且高浓度暴露组均显著高于对照组($P<0.05$)(图 4)。此时, 机体组织通过 MT 的合成并与 Cu^{2+} 结合, 减少 Cu^{2+} 与机体细胞中具有

高亲和力的巯基(-SH)基因非特异性结合, 最终利用溶酶体将结合物从细胞质中排出, 降低 Cu^{2+} 的毒性 (Isani *et al.*, 2000)。同时, 各实验组鳃组织、内脏团组织 MT 含量变化趋势存在差异, 鳃组织 MT 含量在第 1 天峰值后开始逐渐下降, 而内脏团组织 MT 含量呈逐渐上升趋势, 这与不同组织对重金属的富集能力及组织之间的蛋白质代谢变化差异有关, 相比较鳃组织, 内脏团组织中的蛋白质水平更高 (Legras *et al.*, 2000), 同时, 由于生物体自身的屏障属性, 不同组织间的重金属分布状况存在差异, 内脏团组织对重金属的富集能力高于鳃组织, MT 的含量与重金属含量有一定的正相关关系 (Domouhtsidou *et al.*, 2004), 上述 2 个因素共同决定了内脏团组织中 MT 的含量高于鳃组织。

使用生物标志物评估毒性物质的毒性效应及作用途径是一个常用手段, 通常情况下, 多种生物标志物会同时出现, 以解释不同的毒性效应, 但过多的生物标志物混合就使整体的毒性效应及其变化趋势难以解释。本研究中, 各浓度实验组生物标志物相比较对照组均表现出一定的变化, 从不同角度反映出 Cu^{2+} 对厚壳贻贝内脏团组织、鳃组织的影响。为了更准确地比较 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的整体胁迫压力, 使 IBR 指数可以通过量化的数值直观比较 Cu^{2+} 对厚壳贻贝不同组织的暴露毒性。在本研究中, 厚壳贻贝的鳃组织、内脏团组织表现出不同的剂量-毒性效应结果 (图 5), 对相同组织, 高浓度实验组的 IBR 值高于低浓度实验组, 而对相同实验浓度, 内脏团组织的 IBR 值高于鳃组织。这个结果不仅验证了内脏团组织的主要解毒代谢功能, 更量化了其与鳃组织的差异, 表明 IBR 可以作为一种定量评价污染物毒性效应的有效工具。

参 考 文 献

- Alzbeta S, Jana M, Josef V. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012, 33(2): 334–343
- Apeti DA, Johnson E, Robinson L. A model for bioaccumulation of metals in *Crassostrea virginica* from Apalachicola Bay, Florida. *American Journal of Environmental Sciences*, 2005, 1(3): 239–248
- Bhuyan MS, Bakar MA, Akhtar A, *et al.* Heavy metal contamination in surface water and sediment of the Meghna River, Bangladesh. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 2017, 8: 273–279
- Chang EY, Coon SL, Walch M, *et al.* Effects of hyphomonas PM-1 biofilms on the toxicity of copper and zinc to *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* larval set.
- Journal of Shellfish Research*, 1996, 15(3): 589–595
- Cid A, Herrero C, Torres E, *et al.* Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: Effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 1995, 31(2): 165–174
- Domouhtsidou GP, Dailianis S, Kaloyianni M, *et al.* Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: Combination with trace metal concentrations. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 48(5): 572–586
- Hansen JI, Mustafa T, Depledge M. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 1992, 114(2): 253–257
- Isani G, Andreani G, Kindt M, *et al.* Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cellular and Molecular Biology*, 2000, 46(2): 311–330
- Iwinski KJ, Mcqueen AD, Kinley CM, *et al.* Sediment copper concentrations, in situ benthic invertebrate abundance, and sediment toxicity: Comparison of Treated and Untreated Coves in a Southern Reservoir. *Water Air and Soil Pollution*, 2016, 227(3): 85
- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 2003, 68(1): 167–182
- Johnson A, Carew E, Sloman KA. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84(4): 431–438
- Kim JH, Kim WK. Use of the integrated biomarker response to measure the effect of short-term exposure to dibenz [a, h] anthracene in common carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2016, 96(4): 1–6
- Legras S, Mouneyrac C, Amiard JC, *et al.* Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 246(2): 259–279
- Li YF, Gu ZQ, Liu H, *et al.* Biochemical response of the mussel *Mytilus coruscus* (Mytiloidea: Mytilidae) exposed to in vivo sub-lethal copper concentrations. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(5): 738–745
- Liu HH, He JY, Zhao RT, *et al.* Molecular expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Mytilus coruscus* exposed to heavy metals. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(2): 274–280 [刘慧慧, 何建瑜, 赵荣涛, 等. 重金属胁迫下厚壳贻贝谷胱甘肽 S-转移酶基因表达分析. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 274–280]
- Lowe DM, Soverchia C, Moore MN. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, 1995, 33(2): 105–112
- Masseroli M, Galati O, Pinciroli F. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against

- membrane-damaging lipid peroxidation. *In situ* reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(1): 454–461
- Modesto KA, Martinez CBR. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 2010, 78(3): 294–299
- Monteiro SM, Dos Santos NM, Calejo M, *et al.* Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(3): 219–228
- Narula SS, Brouwer MY, Armitage IM. Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 1995, 34(2): 620–631
- Nsofor CI, Igwilo IO, Ikpeze OO, *et al.* Bioaccumulation of heavy metals in shellfish *Macrobrachium rosenbergi* in Niger River at Onitsha, Anambra State, Nigeria. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 2014, 3(1): 38–40
- Onosaka S, Cherian MG. Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1982, 63(2): 270–274
- Oost RVD, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57–149
- Ridlington JW, Fowler BA. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Chemico-Biological Interactions*, 1979, 25(2–3): 127–138
- Sloman KA, Wilson RW. Anthropogenic impacts upon behaviour and physiology. *Fish Physiology*, 2005, 24(5): 413–468
- Solé M, Porte C, Albaigés J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of the Total Environment*, 1995, 159(2–3): 147–153
- Solé M. Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2000, 19(1): 1–9
- State Environmental Protection Agency. *Fishery water quality standards*. Beijing: Chinese Specification Press, 1989 [国家环境保护局. 渔业水质标准. 北京: 中国标准出版社, 1989]
- Sun YQ, Wu ZH, Sun FX, *et al.* Accumulation and elimination of *Meretrix meretrix* to copper. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 126–132 [孙元芹, 吴志宏, 孙福新, 等. 文蛤对重金属 Cu 的富集与排出特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 126–132]
- Thirumoorthy N, Manisenthil KK, Shyam SA, *et al.* Metallothionein: An overview. *World Journal Gastroenterology*, 2007, 13(7): 993–996
- Velisek J, Stara A, Li ZH, *et al.* Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*, 2011, 310(3): 369–375
- Wang HS, Song XJ, Dong WQ, *et al.* The cDNA cloning and characterization of *Mytilus coruscus* metallothionein 10 as well as its mRNA expression under the Cu²⁺ stress. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 864–869 [王昊盛, 宋鑫金, 董文强, 等. 厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 金属硫蛋白 MT-10: cDNA 克隆、结构分析及铜离子胁迫下的表达. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4): 864–869]
- Wu J, Bao M, Ge D, *et al.* The expression of superoxide dismutase in *Mytilus coruscus* under various stressors. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 70: 361–371
- Xia B, Chen B, Sun X, *et al.* Toxicological effects of crude oil: Integrated biomarker responses in the hepatopancreas of clam *Ruditapes philippinarum*. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(12): 3631–3638
- Xu M, Jiang L, Shen KN, *et al.* Transcriptome response to copper heavy metal stress in hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*). *Genomics Data*, 2016, 7(C): 152–154
- Young JS, Gurtisen JM, Apts CW, *et al.* The relationship between the copper complexing capacity of sea water and copper toxicity in shrimp zoeae. *Marine Environmental Research*, 1979, 2(4): 265–273
- Zhang YF. Complex toxic impacts of heavy metals and benzo (a) pyrene on marine mussels. Master's Thesis of Zhejiang University, 2017 [张翼飞. 重金属与苯并芘在贻贝体内的复合毒性效应. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Zheng Q, Feng M, Dai Y. Comparative antioxidant responses in liver of *Carassius auratus* exposed to phthalates: An integrated biomarker approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(3): 741–749

(编辑 陈 严)

Toxic Effects of Copper Ion in *Mytilus coruscus*: An Integrated Biomarker Approach

LI Lei¹, PING Xianyin¹, SONG Wei¹, JIANG Mei¹, HUANG Ting², WANG Lumin^{1①}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090;
2. International Copper Association, Ltd. (ICA), Shanghai 200020)

Abstract Heavy metal contamination of the natural environment has always been a great concern, because of toxicity and non-biodegradability of the metals. Copper (Cu) is an abundant trace element found in a variety of rocks and minerals and has received much attention due to its widespread use, persistence in nature, tendency to accumulate in and toxicity to aquatic organisms. There are many documented physiological effects of waterborne Cu^{2+} exposure in a variety of shellfish species, but further research is needed to explain the relationship between Cu^{2+} and shellfish species. To study the toxicological effects of Cu^{2+} on mussel *Mytilus coruscus*, juvenile *M. coruscus* were exposed to aqueous solutions of Cu^{2+} . Ninety-six-hour acute toxicity effect experiments and 7 days stress experiments were carried out. Biomarkers including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lipid peroxidation (LPO), and metallothioneins (MT) in gill and visceral mass were determined after seven days of exposure. Integrated biomarker response (IBR) was calculated by combining multiple biomarkers into a single value in order to assess the responses of different tissues. The acute toxicity experiments showed 1.55 mg/L to be the 96 h median lethal concentration in juvenile *M. coruscus*. The 7 days stress experimental results showed that the activity of biomarkers were inhibited by all test concentrations and each index had its own variation trend. Biomarkers SOD and CAT showed activity in gill and visceral mass, MT content in the gill firstly increased and then tended to decrease later, while the MT content in visceral mass and MDA content in gill and visceral mass exhibited an upward tendency. IBR values exhibited an increase at first then tended to decrease later, the IBR value in the visceral mass was higher than that in the gill. Changes of biomarkers' activity were related to different exposure concentrations. IBR analysis allowed good discrimination between the different exposure concentrations and might be a useful tool for the quantification of various biomarker responses induced by toxic chemicals.

Key words *Mytilus coruscus*; Copper ion; Toxic effects; Integrated biomarker response model

① Corresponding author: WANG Lumin, E-mail: lmwang@eastfishery.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190314004

http://www.yykxjz.cn/

王佳浩, 刘莉莉, 蔡新晨, 陈佳滢, 杨意馨, 姜书侠. 布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应影响的数值模拟研究. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 40-48

Wang JH, Liu LL, Cai XC, Chen JY, Yang YX, Jiang SX. Numerical simulation study on influence of disposal space on effects of flow field around porous square artificial reefs. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 40-48

布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应影响的数值模拟研究*



王佳浩 刘莉莉^① 蔡新晨 陈佳滢 杨意馨 姜书侠

(浙江海洋大学水产学院 舟山 316004)

摘要 采用计算流体动力学(CFD)技术,研究了不同布设间距下,多孔方型人工鱼礁周围水流运动的规律,旨在为深入研究人工鱼礁的集鱼原理和海洋牧场建设中人工鱼礁的投放和布设提供更多参考。本研究采用了4种布设间距,分别为0.5、1、1.5和2倍鱼礁高度,基于计算机数值模拟技术,模拟了速度为0.8 m/s的水流流经2个礁体的过程,分别观察鱼礁周围水流运动情况。结果显示,多孔方型人工鱼礁内部和周围存在缓流区、背涡流区、上升流区、死水区等有显著特征的区域;多孔方型人工鱼礁上升流的最大速度与来流速度的比值约为0.95倍;多孔方型人工鱼礁周围上升流最大抬升高度与鱼礁高度之比约为2.1;多孔方型人工鱼礁的结构在一定程度上为鱼礁周围的流态多样性提供了较有利的作用;多孔方型人工鱼礁的布设间距对2个鱼礁单体间的旋涡数量和旋涡方向有较大影响,也对涡量大小和涡量分布范围产生影响。研究表明,在一定范围内,布设间距越大,涡量越大,分布范围越广,但超过一定范围后,涡量不再增大,分布范围也不再扩大;多孔方型人工鱼礁的布设间距越大,背涡流在X方向和Y方向的影响面积越大。研究结果清晰地展现了不同布设间距下的人工鱼礁的流场效应,对在特定条件下进行人工鱼礁投放和布设具有重要意义。

关键词 计算流体动力学(CFD); 多孔方型人工鱼礁; 布设间距; 上升流; 背涡流

中图分类号 S953.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-040-09

人工鱼礁是人为置于海底的构筑物,会在其布设周围的一定范围内形成上升流,将海底深层的营养物质带到表层水面,促进浮游植物生长、吸引鱼类觅食。由于其结构的复杂性,人工鱼礁还能为鱼类等提供相对安全的栖息环境和索饵繁殖场所,有利于幼鱼和繁殖期鱼类的栖息。在投放一定时间后,人工鱼礁附近会形成稳定的生态环境,有利于渔场的修复(王波等,

2004; 潘迎捷, 2007; 张永波等, 2016; Lee *et al*, 2018)。人工鱼礁的形状多种多样,有方形、三角形、圆台形、米字型、金字塔型等(郑延璇等, 2014; 赵林等, 2018; 黄远东等, 2012a、2012b; 兰孝政等, 2016)。人工鱼礁投放方式有单体布设和多体布设等。对于如何更有效地投放人工鱼礁,也是现今建设海洋牧场需要优化的问题(Lan *et al*, 2006)。

* 国家自然科学基金青年科学基金项目(41606110)和浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2018R411002)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project of China (41606110), and Science and Technology Innovation Program for College Students and New Talent Scheme in Zhejiang Province (2018R411002)]. 王佳浩, E-mail: wangjiahao2019@126.com

^① 通讯作者: 刘莉莉, E-mail: liulili2001@163.com

收稿日期: 2019-03-14, 收修改稿日期: 2019-05-13

计算流体动力学(CFD)是通过计算机数值计算和图像显示,对包含有流体流动等相关物理现象的系统进行分析。通过此种数值模拟技术,可以得到所研究流场内各个位置上的基本物理量。

目前,已有崔勇等(2011)采用数值模拟方法研究了布设间距对无孔实心方型人工鱼礁周围流场的影响;邓济通等(2013)研究了布设间距对无孔三棱柱形人工鱼礁周围流场的影响;于定勇等(2019)研究了不同开口比的方形鱼礁的水动力特性;黄远东等(2012b)研究了多孔方型人工鱼礁周围流态效应,尚未涉及布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应的影响。

为了进一步探究布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应的影响,本研究基于 FLUENT 软件的数值模拟技术,模拟 4 种布设间距下 2 个鱼礁单体周围流态,研究结果将对鱼礁的优化布置具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 礁体模型和计算区域

在进行数值模拟前,需先进行礁体模型的设计和计算网格的划分。由于方型鱼礁制作方便,透水性好,适合中下层鱼类产卵和避敌,是一种在混凝土礁体中普遍被采用的礁体类型(王磊, 2007),并已经在我国沿海海域(如江苏吕泗渔场)进行了投放。于定勇等(2019)研究发现,方型开口礁体具有抗滑移、抗倾覆

安全系数能满足工程的要求。Wang 等(2018)研究发现,方型鱼礁单侧开口数量为 4 或 9 个,开口比为 0.2 或 0.3 时,产生上升流和背涡流的效果最明显。因此,本研究礁体采用边长为 3 m,壁厚为 0.1 m 的空心多孔方型人工鱼礁。礁体的每个侧面都开有 4 个直径为 0.8 m 的圆孔,顶盖中央开有 1 个直径为 0.8 m 的圆孔(图 1)。

为适应山东省人工鱼礁建设技术规范(DB37T2090-2012),并能正确反映人工鱼礁周围流场的显示效果(Miao *et al*, 2007; 郑延璇等, 2012),本研究将整个计算域尺寸的长度设为单个礁体的 20 倍长度,宽度设为单个礁体的 10 倍长度,高度设为单个礁体的 10 倍长度,即 60 m×30 m×30 m(图 2)。其中,第 1 个圆孔方型礁的礁前计算域长度为 6 倍单体礁长度(18 m),2 个单体礁横向布设,布设间距分别为 0.5、1、1.5、2 倍鱼礁长度,礁体底部贴紧计算域,计算域侧面距 2 个鱼礁单体中心均为 15 m。

1.2 控制方程及湍流模型

由于流动分离和旋涡发展演化,使得人工鱼礁附近的流动为黏性不可压缩流体的湍流运动。因此,其控制方程采用定常、不可压缩流动下的连续性方程和 N-S 方程,而模型则选取可以有效模拟分布比较均匀、湍流结构较小的湍流模型中的 RNG k-epsilon 模型(黄远东等, 2012a; 姜少杰等, 2017)。

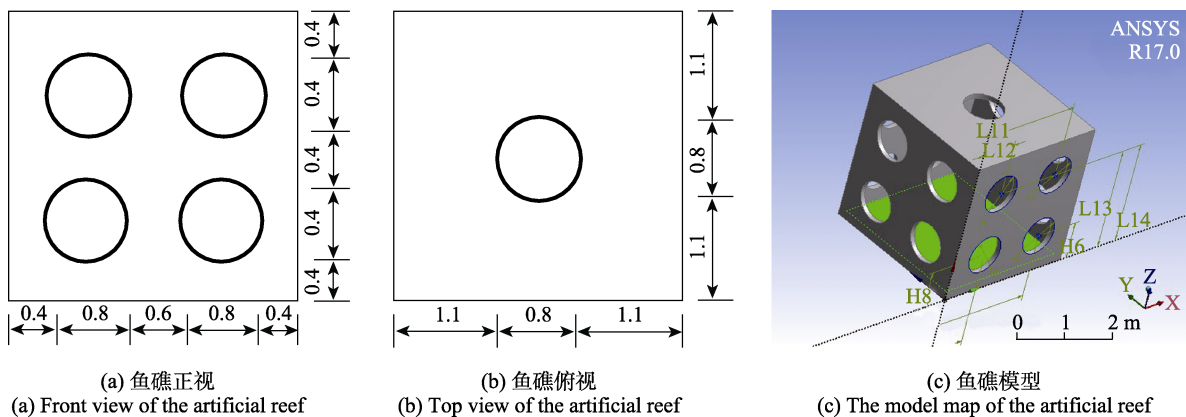


图 1 人工鱼礁礁体模型(m)
Fig.1 Geometry of the artificial reef (m)

1.3 计算区域的网格划分

在计算区域的网格划分上,采用 ANSYS Workbench Meshing 的自适应网格划分方式,划分成四面体非结构化网格。礁体附近区域自动加密,使得在数值模拟时能捕捉礁体的几何细节;在其他区域使用较大网格划分,可节约计算成本。本研究采

用的网格尺度经过 Fluent 软件中的网格独立性验证,结果表明,对于鱼礁附近的流场分辨效果良好。整个计算区域的网格单元数为 1866200,计算区域网格划分见图 3。

1.4 边界条件的设置

计算区域入口设为速度入口条件,在投放人工鱼

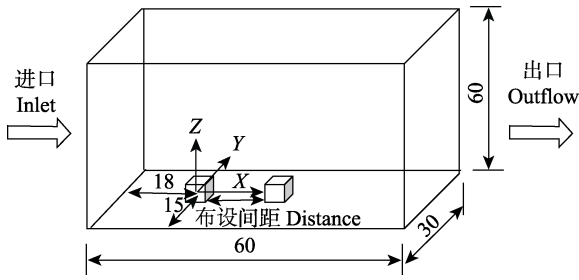


图2 计算区域(m)

Fig.2 Calculational domain (m)

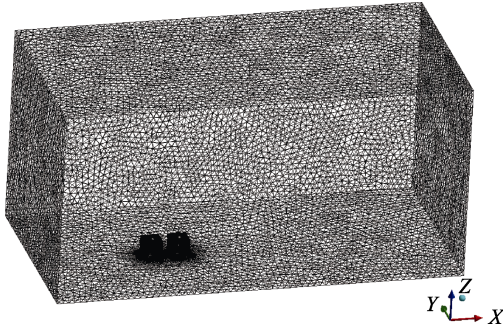


图3 网格划分

Fig.3 Mesh generation

礁的海域流速以不超过 1 m/s 为宜(刘心媚等, 2019), 并参考浙江舟山群岛海域在涨落潮时, 底层海水平均流速为 0.8 m/s 的数据(寿玮玮, 2009)。本研究选取 0.8 m/s 的来流速度进行模拟仿真; 计算区域出口设

为自由出流条件; 计算区域的两侧和顶面采用对称边界条件; 计算区域的底面和鱼礁壁面采用无滑移边界条件(黄远东等, 2012a、2012b; Liu *et al.*, 2013)。

1.5 数值算法

本研究涉及的数值模拟计算在 Ansys Fluent 17.0 平台上完成。压力与速度耦合采用 Simplec 算法, 方程离散采用 Quick 格式, 计算迭代步数为 2000 步, 计算精度残差值取 10^{-6} (姜少杰等, 2017; 邵万骏等, 2014)。

1.6 数学模型的验证

为验证 Fluent 软件模拟人工鱼礁流场效应的可行性, 需要对比在不同测点用水槽实验和数值模拟 2 种方式得到的速度。唐衍力(2013)在水槽中测量了来流速度为 0.5 m/s 时, 多孔方型鱼礁各测点的流速。礁体边长为 15 cm, 侧面分别开 4 个直径为 0.4 cm 的圆孔, 顶面开一个直径为 0.4 cm 的圆孔。本研究利用唐衍力(2013)的模型, 在鱼礁一半高度的水平断面和与水槽垂直的 C2 断面的交线上, 选择了 A3、A4、A5、A6、A3'、A4'、A5' 共 7 个测点(图 4)。利用水槽实验和数值模拟 2 种方法测出各测点的流速, 得到了 2 种方法的结果对比见图 5。从图 5 中的误差来看, 本研究所选模型能够利用 Fluent 软件进行数值模拟得到较准确的流态分布。

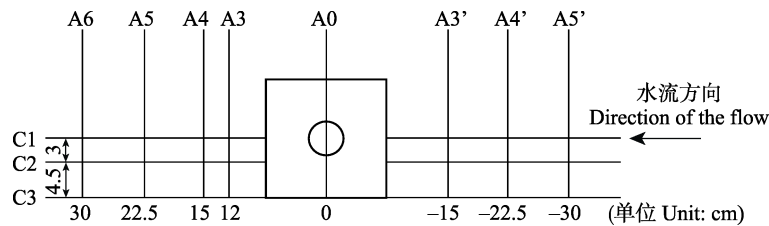


图4 测点分布

Fig.4 Distribution of measuring stations

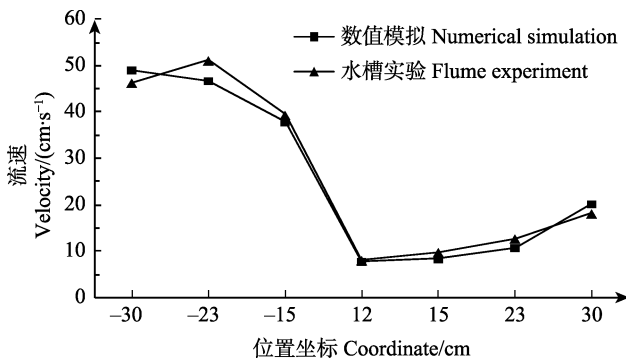


图5 测量点流速的实验值与模拟值的比较

Fig.5 Comparison of the simulated and measured velocities of the measuring stations

2 结果与讨论

2.1 多孔方型鱼礁单体周围流态变化的基本情况

唐衍力等(2017)研究表明, 6 个代表礁体(方型、框架型等)的上升流面积和背涡流面积的大小与来流速度不相关; 礁体的上升流高度与来流速度也不相关。黄远东等(2012a)研究发现, 不同来流速度工况下, 方型鱼礁上升流的最大速度与来流速度的比均约为定值, 上升流的最大高度与礁体高度的比均约为定值。本研究还参考了其他学者对其他礁体的研究均发现, 改变来流速度对相关数据影响不大, 故本研究为了减轻计算成本, 只选取恒定来流速度进行研究。为分

析鱼礁周围流场的分布情况, 选择来流速度为 0.8 m/s, 鱼礁布设间距为 6 m 的鱼礁周围流场进行分析。流场中 $Y=0$ 平面上的速度分布云图见图 6。从图 6 可以看出, 当水流经过鱼礁时, 流速变缓且越靠近鱼礁前壁面流速越小, 并在鱼礁的前方形成一片流速几乎为 0 的滞留区; 在鱼礁上方一定区域内形成上升流, 上升流会改变原来水流的运动状态和流速。在上升流区域, 水流最大速度为 1.1 m/s; 在鱼礁后方的背流面产生了背涡流, 背涡流影响区域可达 2 倍鱼礁边长。背涡流流速明显小于来流速度, 存在部分流速为 0 的区域。

流场中 $Z=3$ m 平面上的速度分布云图见图 7。从图 7 可以看出, 2 个鱼礁两侧均有侧向流存在, 第 1 个鱼礁的侧向流区域速度大于第 2 个鱼礁。

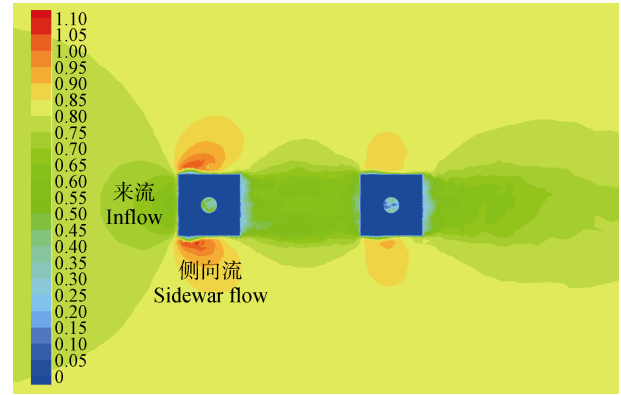


图 7 $Z=3$ m 平面上的速度分布(m/s)
Fig.7 Velocity distribution on $Z=3$ m plane (m/s)

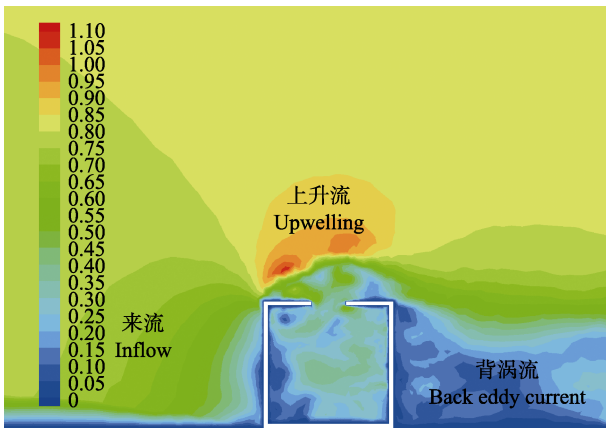


图 6 $Y=0$ 平面上的速度分布(m/s)
Fig.6 Velocity distribution on $Y=0$ plane (m/s)

2.2 多孔方型鱼礁在不同布设间距下所产生的上升流情况

本研究取 Z 方向上速度分量与来流速度之比 $\geq 5\%$ 的水域为上升流区域(黄远东等, 2012b), 为分析不同布设间距下鱼礁所产生的上升流的情况, 选取 4 种不同的布设间距进行 CFD 仿真, 分别为 0.5、1、1.5 和 2 倍鱼礁长度, 得到 1.5、3.0、4.5 和 6.0 m 的 4 种布设间距下流场在 $Y=0$ 平面上的 Z 方向速度分量分布见图 8。图 8 上刻度可以对上升流最大抬升高度进行比较。从仿真结果可以得出, 不同布设间距下, 上升流的最大流速、最大抬升高度以及分别与来流速度、鱼礁高度的关系见表 1。

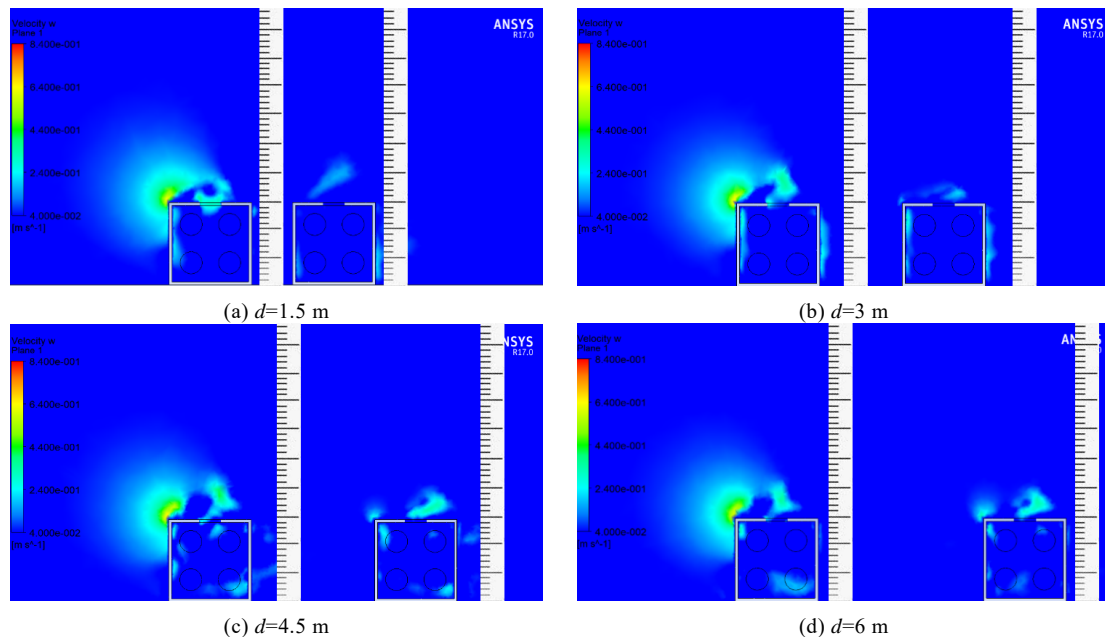


图 8 4 种布设间距下 $Y=0$ 平面上的 Z 方向速度分量分布(m/s)
Fig.8 Z -direction velocity component distribution on $Y=0$ plane with four layouts (m/s)

表1 不同布设间距下的上升流速和抬升高度
Tab.1 Upwelling velocity and elevation under different layout spaces

鱼礁高度 Height of the reef (m)	来流速度 Inflow velocity (m/s)	布设间距 Laying distance (m)	最大上升流速 Maximum upwelling velocity (m/s)	上升流最大 抬升高度 Maximum upwelling elevation (m)	最大上升流速与 来流速度比值 Ratio of maximum upwelling velocity to inflow velocity	上升流最大抬升高度 与鱼礁高度比值 Ratio of maximum upwelling elevation to reef
3	0.8	1.5	0.74	6.28	0.93	2.09
		3.0	0.75	6.27	0.94	2.09
		4.5	0.84	6.28	1.05	2.09
		6.0	0.79	6.29	0.99	2.10

由鱼礁的影响所产生的上升流速和抬升高度代表鱼礁水动力特性的丰富性(吴伟等, 2016), 即流速越大, 抬升高度越高, 其越能满足适应不同流速的鱼类的需求, 集鱼效果也就越好。

从图8和表1可以看出, 不同布设间距下, 多孔方型人工鱼礁上升流的最大速度与来流速度的比值约为0.95倍, 布设间距分别为4.5、6.0 m时, 最大上升流速和上升流范围比布设间距为1.5、3.0 m时有增大的趋势。因此, 在一定程度上, 扩大多孔方型鱼礁的排布间距有利于形成更丰富的上升流。

上升流最大抬升高度与鱼礁高度之比为2.1, 且最大抬升高度点均出现在第1个鱼礁上方, 说明上升流最大抬升高度与鱼礁布设间距之间无关联。另外, 图8中各个鱼礁的顶部开孔处中心区域的上升流效应明显强于顶部的其他区域。由此可见, 人工鱼礁上方开孔有助于增强上升流效应。

2.3 多孔方型鱼礁在不同布设间距下所产生的旋涡情况

4种布设间距下流场在 $Y=0$ 平面上的速度矢量分布见图9。从图9可以看出, 在来流速度为0.8 m/s时, 布设间距分别为1.5、3.0、4.5 m的2个鱼礁之间都形成了1个顺时针旋涡, 形成的旋涡大小随布设间距的增大而增大。产生的旋涡靠左, 旋涡中心在 Z 方向2.5 m左右。其中, 布设间距为4.5 m时, 顺时针旋涡上方隐约出现第2个逆时针旋涡; 而当布设间距为6.0 m时, 顺时针旋涡上方的逆时针旋涡变得明显, 且原来的顺时针旋涡被挤到较下方位置, 并且旋涡开始变小。可以推测, 鱼礁布设间距会对第1个鱼礁后的旋涡产生影响。布设间距越大, 旋涡越大, 但布设间距增大到一定程度后, 会生成第2个反方向的旋涡。

从图9可以看出, 4个图中第2个鱼礁的背部都产生了2个大小相近、垂直排布的旋涡, 其中, 上方的旋涡为逆时针, 下方的旋涡为顺时针。由此可见, 不同布设间距不会对第2个人工鱼礁的旋涡造成影响。

通过对比不同布设间距2个人工鱼礁背部的旋涡数量和旋涡方向, 若继续增大排布间距, 第1个鱼礁背部可能会产生像第2个鱼礁背部的旋涡。

2.4 多孔方型鱼礁在不同布设间距的涡量情况

4种布设间距下, 流场在 $Y=0$ 平面上的涡量云图见图10。从图10可以看出, 在来流速度为0.8 m/s时, 随着布设间距的增大, 鱼礁附近的涡量也随之增大, 布设间距分别为1.5、3.0、4.5 m时, 鱼礁涡量明显逐渐增大, 且涡量分布范围逐渐增大; 当布设间距为6 m时, 涡量大小和分布范围开始变小。另外, 从图10还可以看出, 涡量的最高值都出现在鱼礁的顶部开孔处。由此可以推测, 鱼礁布设间距会对涡量大小和涡量分布范围涡旋产生影响。在一定范围内, 布设间距越大, 涡量越大, 分布范围越广。但超过一定范围后, 涡量不再增大, 分布范围也不再扩大。

2.5 多孔方型鱼礁在不同布设间距的内部流态和背涡流情况

为了研究空心多孔方型人工鱼礁的内部流态情况和背涡流情况, 故选择人工鱼礁的横切面进行后处理(Liu *et al*, 2013)。4种布设间距下, $Z=1.5$ m平面上的速度矢量分布见图11。从图11可以看出, 在4种布设间距下, 尽管前后2个鱼礁内部流态各异, 但都存在一定共性: 第1个鱼礁内部速度大小总体上大于第2个鱼礁内部的速度; 前后2个鱼礁内部均产生了2个 Y 轴向排布、大小相近的旋涡, 其中, 上方的旋涡均为顺时针, 下方的旋涡均为逆时针。上下2个旋涡的速度分布也相似; 鱼礁内部的4个角落处存在大量速度较小的缓流区。

对比鱼礁内部与鱼礁周围侧向绕流流速发现, 鱼礁内部大部分区域流速小于鱼礁周围侧向绕流流速, 在鱼礁内部的4个角落, 存在速度为0的死水区。在不同布设间距下, 前后2个鱼礁背流面均产生了背涡流, 第2个鱼礁后的背涡流差异较小, 而第1个鱼礁

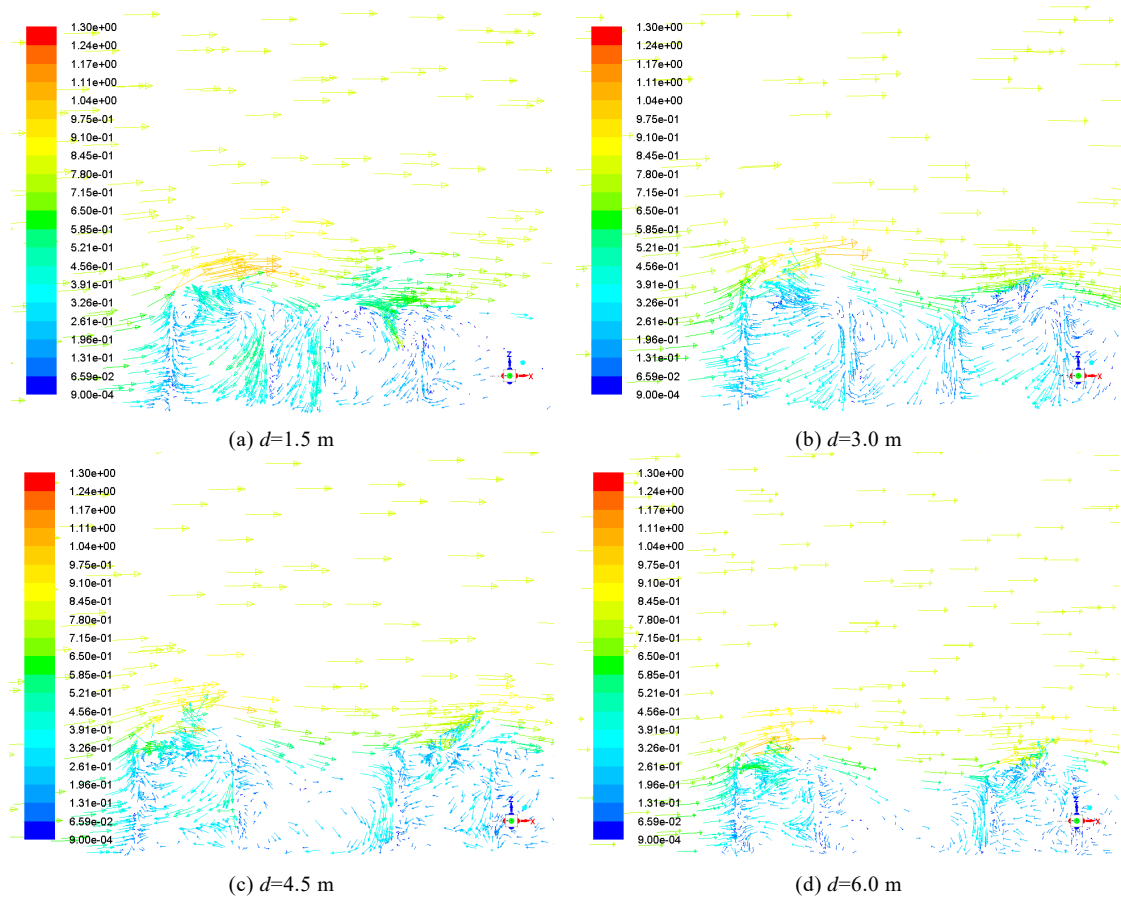


图 9 4 种布设间距下 $Y=0$ 平面上的速度矢量分布(m/s)
 Fig.9 Velocity vector distribution on $Y=0$ plane with four layouts (m/s)

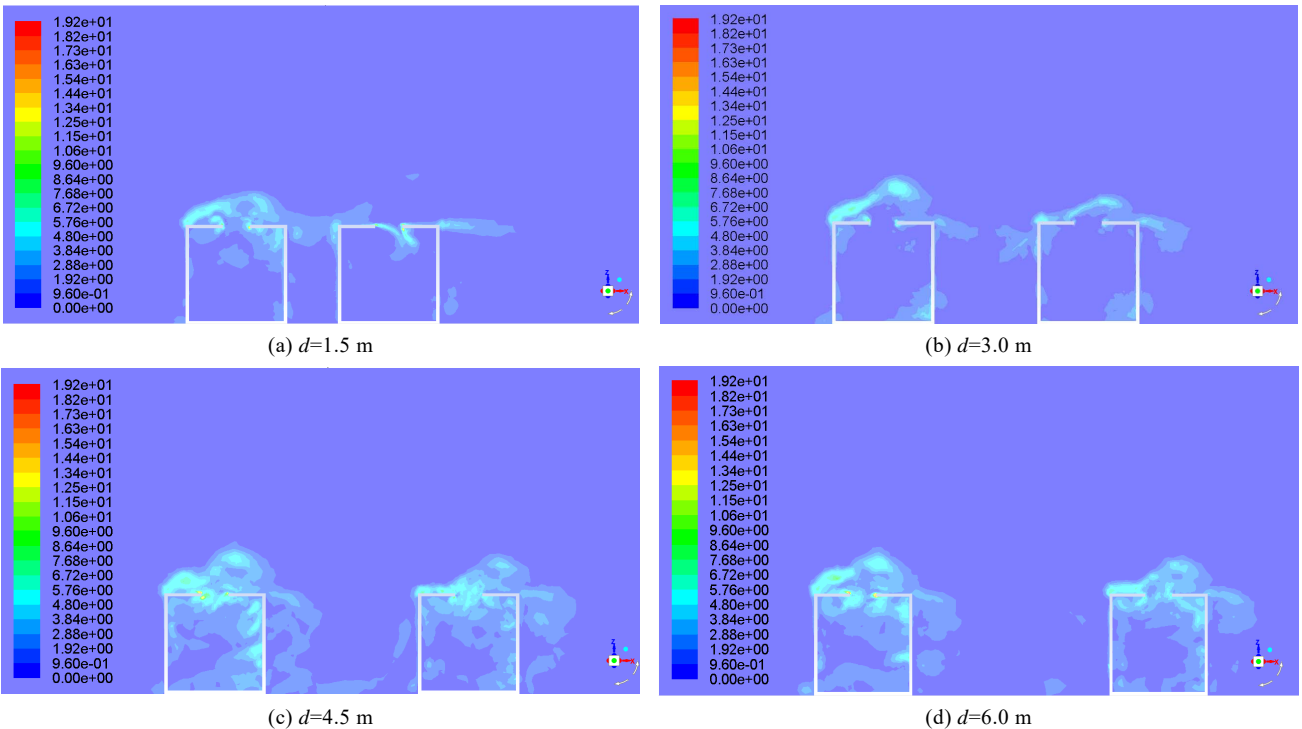


图 10 4 种布设间距下 $Y=0$ 平面上的涡量分布(S^{-1})
 Fig.10 Vorticity distribution on $Y=0$ plane with four layouts (S^{-1})

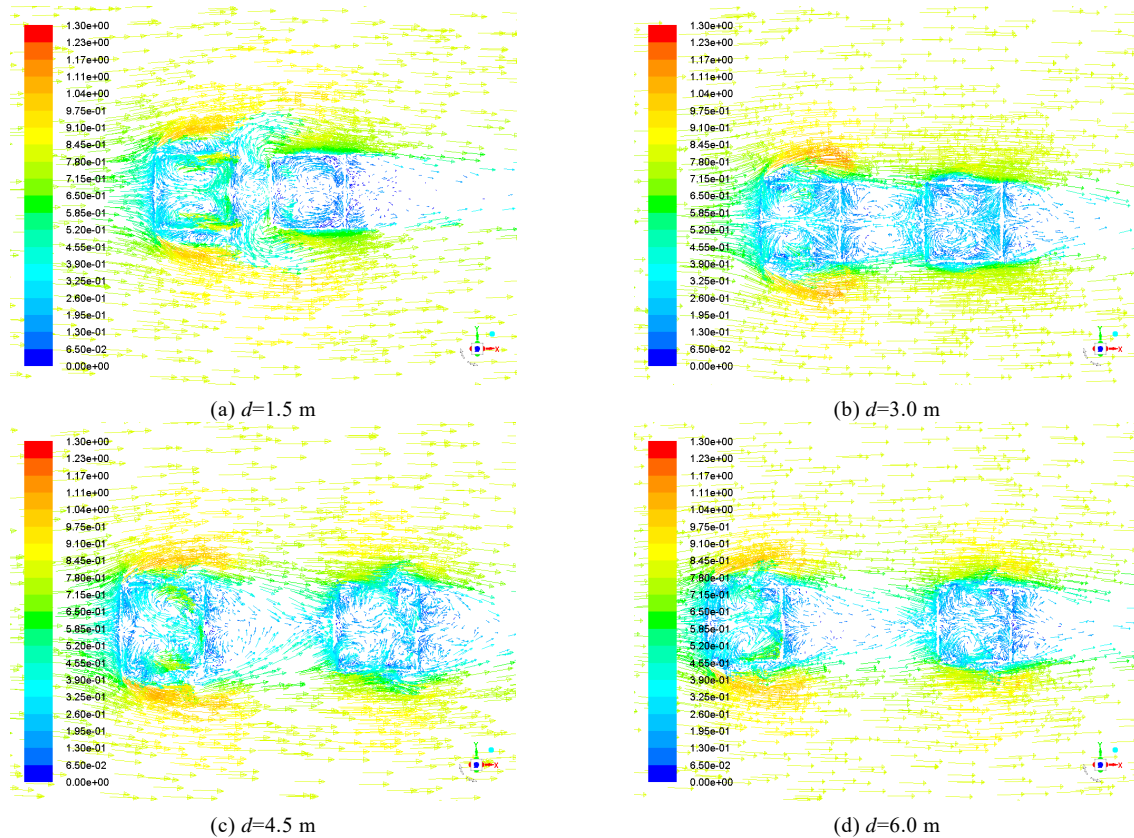


图 11 4 种布设间距下 $Z=1.5\text{m}$ 平面上的速度矢量分布(m/s)
Fig.11 Velocity vector distribution on $Z=1.5\text{m}$ plane with four layouts (m/s)

后的背涡流随布设间距的增大有较大变化。当布设间距为 1.5 m 时, 第 1 个鱼礁后出现 2 个旋转方向相反的旋涡, 旋涡大小约为 $1.00\text{ m}\times 0.75\text{ m}$; 而当布设间距分别为 3.0、4.5、6.0 m 时, 旋涡大小均增大到 $2.50\text{ m}\times 1.25\text{ m}$ 。另外, 当布设间距分别为 4.5、6.0 m 时, 第 1 个鱼礁后的背涡流中有较多流集聚到第 2 个鱼礁的迎流面; 而布设间距为 1.5 或 3.0 m 时, 这种情况较少。从图 9 和图 11 中 2 个不同平面上的背涡流影响范围可以看出, 在 4 种布设间距下, 布设间距越大, 背涡流在 X 方向和 Y 方向的面积越大, 这与崔勇等(2011)的研究结果相一致。而在 Z 方向上, 背涡流高度约为礁体高度的 1.2 倍, 这与黄远东等(2012b)的研究结果相近。因此, 将布设间距继续扩大到 2 倍鱼礁宽度以上, 对本研究工作的开展具有重要意义。

3 结论

基于 Fluent 软件的数值模拟技术, 本研究仿真了一定的流速下, 4 种不同布设间距的多孔方型人工鱼礁的周围流场运动规律, 并从数值模拟结果中对比分析了 4 种布设间距对礁体周围的上升流、礁体内部、2 个鱼礁单体之间的旋涡大小和数量, 以及礁体周围

涡量的影响。结果显示, 多孔方型人工鱼礁内部和周围流态较为复杂, 但可以根据流速和流向明显分辨出缓流区、背涡区、上升流区、死水区等有显著特征的区域, 说明数值模拟技术是优化人工鱼礁设计和部署的可行工具。多孔方型人工鱼礁上升流的最大速度与来流速度的比值约为 0.95 倍; 多孔方型人工鱼礁周围上升流最大抬升高度与鱼礁高度之比约为 2.1; 多孔方型人工鱼礁的结构在一定程度上为鱼礁周围的流态多样性提供了较有利的作用。多孔方型人工鱼礁的布设间距对 2 个鱼礁单体间的旋涡数量和旋涡方向有较大影响, 也对涡量大小和涡量分布范围产生影响。在一定范围内, 布设间距越大, 涡量越大, 涡量分布范围越广; 但超过一定范围后, 涡量不再增大, 涡量分布范围也不再扩大。多孔方型人工鱼礁的布设间距越大; 背涡流在 X 方向和 Y 方向的影响面积越大; 而在 Z 方向中, 背涡流面积不随间距变化而显著变化, 背涡流高度约为礁体高度的 1.2 倍。

本研究结果为人工鱼礁的集鱼原理和海洋牧场建设中考虑人工鱼礁的布设方式的科研工作者提供初步参考。本研究暂未进行整个单位鱼礁或鱼礁群的研究, 只研究了水流方向的 2 个鱼礁单体布设间距的

影响,故存在一定局限性,还需对其他布设形式进行数值模拟分析。另外,数值模拟技术并不能完全模拟各地投礁海域的复杂海况,所以,实际海域中,在人工鱼礁投放前还需通过水槽实验和实地调查(郑延璇等,2012;姜少杰等,2017;李娇等,2013、2018;Lee *et al.*,2018;Komyakova *et al.*,2019;Jiang *et al.*,2016)等研究方法验证数值模拟结果的准确性。

参 考 文 献

- Cui Y, Guan CT, Wan R, *et al.* The numerical simulation of the effect of spacing on the flow field of artificial reefs. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2011(2): 59–65 [崔勇, 关长涛, 万荣, 等. 布设间距对人工鱼礁流场效应影响的数值模拟. *海洋湖沼通报*, 2011(2): 59–65]
- Deng JT, Huang YD, Jiang JW, *et al.* Numerical simulation of the influence of spacing on the flow around a triangular prism artificial reef. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2013, 24(2): 98–102 [邓济通, 黄远东, 姜剑伟, 等. 布设间距对三棱柱形人工鱼礁绕流影响的数值模拟. *水资源与水工程学报*, 2013, 24(2): 98–102]
- Huang YD, Jiang JW, Zhao SF, *et al.* Numerical simulation of flow around square artificial reef. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2012a, 23(3): 1–3 [黄远东, 姜剑伟, 赵树夫. 方型人工鱼礁周围水流运动的数值模拟研究. *水资源与水工程学报*, 2012a, 23(3): 1–3]
- Huang YD, Zhao SF, Jiang JW, *et al.* Numerical simulation of the flow around a porous square artificial reef. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2012b, 23(5): 15–18 [黄远东, 赵树夫, 姜剑伟, 等. 多孔方型人工鱼礁绕流的数值模拟研究. *水资源与水工程学报*, 2012b, 23(5): 15–18]
- Jiang SJ, Liu HD, Wu W, *et al.* The hydrodynamic research and construction effect evaluation of an artificial reef. *Journal of Marine Sciences*, 2017, 35(2): 53–60 [姜少杰, 刘海敌, 吴伟, 等. 一种人工鱼礁的水动力学研究与建设效果评价. *海洋学研究*, 2017, 35(2): 53–60]
- Jiang ZY, Liang ZL, Zhu LX, *et al.* Numerical simulation of effect of guide plate on flow field of artificial reef. *Ocean Engineering*, 2016, 116: 236–241
- Komyakova V, Chamberlain DP, Jones G. Assessing the performance of artificial reefs as substitute habitat for temperate reef fishes: Implications for reef design and placement. *Science of the Total Environment*, 2019, 668: 139–152
- Lan CH, Hsui CY. The deployment of artificial reef ecosystem: Modelling, simulation and application. *Simulation Modelling Practice and Theory*, 2006, 14: 663–675
- Lan XZ, Wan R, Tang YL, *et al.* Numerical simulation of flow field effect of a circular platform artificial reef. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2016, 46(8): 47–53 [兰孝政, 万荣, 唐衍力, 等. 圆台型人工鱼礁单体流场效应的数值模拟. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(8): 47–53]
- Lee MO, Otake S, Kim JK. Transition of artificial reefs (ARs) research and its prospects. *Ocean and Coastal Management*, 2018, 154: 55–65
- Li J, Guan CT, Gong PH, *et al.* Carbon sequestration mechanism and potential analysis of artificial reef ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 65–69 [李娇, 关长涛, 公丕海, 等. 人工鱼礁生态系统碳汇机理及潜能分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 65–69]
- Li J, Zhang Y, Yuan W, *et al.* Research on artificial reef ecosystem health assessment based on fuzzy synthetic evaluation. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 10–19 [李娇, 张艳, 袁伟, 等. 基于模糊综合评价法的人工鱼礁生态系统健康研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 10–19]
- Li XL, Luan SG, Chen Y, *et al.* The 3D vortex structure of cube artificial reef's wake vortex. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2012, 27(6): 572–577 [李晓磊, 栾曙光, 陈勇, 等. 立方体人工鱼礁背涡流的三维涡结构. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 572–577]
- Liu XM, Zheng YN, Chen CP, *et al.* Numerical simulation of flow around frame and caisson artificial reef models. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2019(1): 133–138 [刘心媚, 郑艳娜, 陈昌平, 等. 框架型与沉箱型人工鱼礁绕流特性的数值模拟. *大连海洋大学学报*, 2019(1): 133–138]
- Liu Y, Zhao YP, Dong GH, *et al.* A study of the flow field characteristics around star-shaped artificial reefs. *Journal of Fluids and Structures*, 2013, 39:27–40
- Liu ZL, Su DT. Numerical analysis of the influence of reef arrangements on artificial reef flow fields. *Ocean Engineering*, 2013, 74: 81–89
- Miao ZQ, Xie YH. Effects of water-depth on hydrodynamic force of artificial reef. *Journal of Hydrodynamics*, 2007, 19(3): 372–377
- Pan YJ. The dictionary of fisheries. Shanghai: Shanghai Lexicographical Publishing House, 2007 [潘迎捷. *水产辞典(精)*. 上海: 上海辞书出版社, 2007]
- Shao WJ, Liu CG, Nie HT. Analysis of hydrodynamic characteristics and flow field effects of artificial reefs. *Hydrodynamics Research and Progress Part A*, 2014, 29(5): 580–585 [邵万骏, 刘长根, 聂红涛. 人工鱼礁的水动力学特性及流场效应分析. *水动力学研究与进展A辑*, 2014, 29(5): 580–585]
- Shou WW. Hydrodynamic characteristics of the sea area near Zhoushan Islands and their impact on material transport. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [寿玮玮. 舟山群岛附近海域水动力特征及其对物质运输的影响分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Tang YL. Experimental study on hydrodynamics of artificial reef and numerical simulation of flow field. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [唐衍力. 人工鱼礁水动力的实验研究与流场的数值模拟. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Tang YL, Long XY, Wang XX, *et al.* Comparative analysis of flow field effects of commonly used artificial reefs in China. *Journal of Agricultural Engineering*, 2017, 33(8): 97–103 [唐衍力, 龙翔宇, 王欣欣, 等. 中国常用人工鱼礁流场效应的比较分析. *农业工程学报*, 2017, 33(8): 97–103]
- Wang B, Wu JP, Gao J, *et al.* Discussion on the construction of artificial reefs in Qingdao to improve coastal ecology and fishery environment. *Coastal Engineering*, 2004, 23(4): 66–73 [王波, 武建平, 高峻, 等. 关于青岛建设人工鱼礁改善近海生态和渔业环境的探讨. *海岸工程*, 2004, 23(4): 66–73]
- Wang L. Preliminary study on optimal design of artificial reef

- and reef area layout. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [王磊. 人工鱼礁的优化设计和礁区布局的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Wang G, Wan R, Wang XX, *et al.* Study on the influence of cut-opening ratio, cut-opening shape, and cut-opening number on the flow field of a cubic artificial reef. *Ocean Engineering*, 2018, 162: 341–352
- Wu W, Jiang SJ, Yuan J, *et al.* Numerical simulation of flow field effect of artificial reef with impeller. *Scientific and Technological Innovation and Application*, 2016(32): 16–18 [吴伟, 姜少杰, 袁俊, 等. 带叶轮的人工鱼礁流场效应的数值模拟研究. *科技创新与应用*, 2016(32): 16–18]
- Yu DY, Yang YH, Li YJ. Study on hydrodynamic characteristics and reef stability of artificial reefs with different opening ratios. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2019, 49(4): 128–136 [于定勇, 杨远航, 李宇佳. 不同开口比人工鱼礁体水动力特性及礁体稳定性研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(4): 128–136]
- Zhao L, Deng C, Yu ZJ, *et al.* Hydrodynamic analysis of composite pyramid artificial reef. *Fishery Modernization*, 2018, 45(6): 53–59 [赵林, 邓超, 于振江, 等. 组合式金字塔型人工鱼礁水动力学分析. *渔业现代化*, 2018, 45(6): 53–59]
- Zhang YB, Wang JY, Xin JF. Advances in artificial reef engineering technology. *Fishery Modernization*, 2016, 43(6): 70–75 [张永波, 王继业, 辛峻峰. 人工鱼礁工程技术进展研究. *渔业现代化*, 2016, 43(6): 70–75]
- Zheng YX, Liang ZL, Guan CT, *et al.* Structure design and stability of the equilateral triangle artificial reef. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 117–125 [郑延璇, 梁振林, 关长涛, 等. 等边三角形人工鱼礁礁体结构设计及其稳定性. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 117–125]
- Zheng YX, Guan CT, Song XF, *et al.* Numerical simulation of the flow field effect of star-shaped artificial reef. *Journal of Agricultural Engineering*, 2012, 28(19): 185–193 [郑延璇, 关长涛, 宋协法, 等. 星体型人工鱼礁流场效应的数值模拟. *农业工程学报*, 2012, 28(19): 185–193]

(编辑 陈 严)

Numerical Simulation Study on Influence of Disposal Space on Effects of Flow Field Around Porous Square Artificial Reefs

WANG Jiahao, LIU Lili^①, CAI Xinchun, CHEN Jiaying, YANG Yixin, JIANG Shuxia

(School of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004)

Abstract In this study, computational fluid dynamics (CFD) technology was used to study the flow patterns around porous square artificial reefs with different disposal spaces. The aim was to increase our knowledge base of the fish harvesting principles of artificial reefs and the deployment and layout of the artificial reefs in the construction of marine pastures. Four kinds of disposal spaces were used in the study; they were 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 times the height of the reef. Based on the computer numerical simulation technology, the process of water flowing past the two reefs at a speed of 0.8 m/s was simulated, and the flow around the reef was observed. The results show that there were obvious characteristics of slow flow areas, back eddy current areas, upwelling areas, and dead water areas inside and around the porous square artificial reef. The ratio of the maximum upwelling velocity to the inflow velocity of the porous square artificial reef was about 0.95 times. The ratio of the maximum upwelling height to the reef height around the porous square artificial reef is about 2 : 1. To some extent, the structure of the artificial reef provides a favorable role for the diversity of flow patterns around the reef. The spacing of the porous square artificial reef has a great influence on the number, size, distribution, and direction of vortices between the two reefs. Within a certain range, the larger the spacing, the larger the vorticity and the wider the distribution range. Beyond a certain range, the vorticity does not increase and the distribution range does not expand. The larger the spacing of the porous square artificial reefs, the larger the influence area of the back eddy current in the X and Y directions is. The results clearly show the flow field effects of artificial reefs with different disposal spaces, which is of great significance to the deployment and layout of artificial reefs under specific conditions.

Key words CFD; Porous square artificial reef; Disposal space; Upwelling; Back eddy current

① Corresponding author: LIU Lili, E-mail: liulili2001@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190122002

http://www.yykxjz.cn/

王倩, 张雪, 陈亚东, 沙珍霞. 半滑舌鲷甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1 基因的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 49–59

Wang Q, Zhang X, Chen YD, Sha ZX. Cloning and expression analysis of the *MASP1* gene from the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 49–59

半滑舌鲷甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1 基因的克隆及表达分析*



王倩¹ 张雪¹ 陈亚东^{2,3} 沙珍霞^{1,2①}

(1. 青岛大学生命科学学院 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. 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)

摘要 甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1 (Mannan-binding lectin associated serine protease 1, *MASP1*)是补体凝集素途径中起重要作用的激活蛋白。本研究以半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为研究对象,应用 RACE 技术和实时荧光定量 qRT-PCR 技术对半滑舌鲷 *MASP1* 基因(*Cynoglossus semilaevis MASP1*, *CsMASP1*)进行了克隆和表达模式分析。结果显示, *CsMASP1* 基因 cDNA 序列全长为 2507 bp, 5'非编码区长 82 bp, 3'非编码区长 142 bp, 开放阅读框长 2283 bp, 共编码 760 个氨基酸; *CsMASP1* 基因包含 13 个外显子和 12 个内含子,与多数已知鱼类的 *MASP1* 基因结构一致; SMART 分析显示, *CsMASP1* 包含 6 个结构域,与哺乳动物、鸟类、其他鱼类的结构域一致;同源比对发现, *CsMASP1* 和鱼类的相似度较高,与金目鲈(*Lates calcarifer*)的相似性最高,为 76%。*CsMASP1* 基因在 11 种健康组织(血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肝、皮肤、脾和后肾)中均有表达,其中,在肝、脾和头肾中表达量较高;鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后, *CsMASP1* 基因在 6 种免疫组织(血液、鳃、头肾、肠、肝和脾)中呈现不同的表达模式,在 6 种免疫组织中呈现明显的上调表达,肝的表达峰值出现在感染后 24 h;脾和鳃的表达峰值出现在感染后 6 h;肠、头肾和血液的表达峰值均出现在感染后 12 h;随着病原菌感染时间增加,基因表达量逐渐降低并恢复至正常水平。研究表明, *CsMASP1* 基因参与了半滑舌鲷的免疫应答过程,本结果为半滑舌鲷的免疫机理研究奠定了基础。

关键词 半滑舌鲷; *MASP1* 基因; 基因克隆; 基因表达; 免疫应答

中图分类号 S971.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)03-0049-11

甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1(MASP1)属于丝氨酸蛋白酶(Serine proteases, SP)超家族成员,包括 *MASP1*(Takahashi *et al*, 2013)、*MASP2*(Swierczko *et al*, 2014)和 *MASP3*(Dahl *et al*, 2001)。*MASP1* 是补体凝集素途径中起重要作用的激活蛋白, *MASP1* 可

被甘露糖结合凝集素(Mannan-binding lectin, MBL)激活以响应病原体感染, MBL-MASP 复合物共同激活凝集素途径(Sunyer *et al*, 1998; Schwaebel *et al*, 2002)。

目前,关于 *MASP1* 的研究相对较少,2000 年首次在人中克隆鉴定出 *MASP1*(Chen *et al*, 2000),随后

* 国家自然科学基金项目(31572644)资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31572644)]. 王倩, E-mail: qianwangqd@163.com

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

收稿日期: 2019-01-22, 收修改稿日期: 2019-03-09

构建了人的 MASP1 N 端片段原核表达载体并在大肠杆菌中进行了表达(Cai *et al*, 2008)。迄今仅在文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*)(Endo *et al*, 2003)、七鳃鳗 (*Lampetra fluviatilis*)(Endo *et al*, 2003)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)(Dang *et al*, 2017)和菊海鞘 (*Botryllus schlosseri*)(Nicola *et al*, 2017)等水生生物中开展了 MASP1 的克隆表达及免疫应答相关研究。硬骨鱼 MASP1 的研究还极为有限。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖鱼类。近年来,随着水产养殖行业的快速发展,病害问题特别是弧菌病对半滑舌鳎养殖业造成严重的经济损失。有关半滑舌鳎免疫机制的研究和有效的病害防控手段还有待深入研究(Chen *et al*, 2015)。本研究通过 PCR 技术克隆了 *CsMASP1* 基因的 cDNA,并分析了其基因结构及其进化关系,还研究了 *CsMASP1* 基因在半滑舌鳎 11 种健康组织中的表达特征,及鳃弧菌感染后该基因在 6 种免疫组织中的时空表达规律,为进一步深入了解 *CsMASP1* 基因在半滑舌鳎免疫防御中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

半滑舌鳎购自山东海阳黄海水产有限公司,鱼龄为 2 龄左右,平均体重为(400±5) g,平均体长为(40.3±0.1) cm。健康实验鱼在 24℃水族箱中暂养 7 d,每天换新鲜灭菌海水,尽量消除环境胁迫。鳃弧菌为本实验室保存菌种,经 16S rRNA 测序进行菌种鉴定。

1.2 样品处理和采集

随机选取 3 条健康的半滑舌鳎,分别采集每条鱼的血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肝、皮肤、

脾和后肾共 11 种组织,并立即投入液氮中冷冻,然后转移至-80℃冰箱保存,用于总 RNA 提取。鳃弧菌感染参照(Sha *et al*, 2017)实验方法略作修改,采用腹腔注射方法对实验组进行鳃弧菌感染,感染剂量(半致死剂量)为 3.18×10^5 CFU/g 鱼体,对照组注射相同体积的无菌 PBS 溶液。在注射后 0、6、12、24、48 和 72 h 共 6 个时间点,每个时间点取 3 条鱼,分别收集实验组和对照组的血液、鳃、头肾、肠、肝脏和脾脏 6 种组织,保存方式同上所述。

1.3 RNA 提取和 cDNA 制备

采用液氮研磨收集的组织,按照 RNA 提取试剂盒(天根,北京)的说明书进行组织总 RNA 提取。提取的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳(1.00%)检测其完整性。用 Agilent 2100 biological analyzer (Applied Biosystems, 美国)检测其纯度和浓度。按照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连)试剂盒反转录成 cDNA, -20℃冰箱保存备用。

1.4 *CsMASP1* 基因的 cDNA 序列的扩增

通过对半滑舌鳎转录组和基因组数据进行生物信息学分析,筛选了 *CsMASP1* 基因的部分 cDNA 序列,并对该序列设计特异性引物 P1 和 P2(表 1),以半滑舌鳎 11 个组织混合 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μl): Trans *Taq*[®] HiFi Polymerase (5 U/μl) 0.2 μl, 10× Trans *Taq* HiFi Buffer II 2 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μl, P1 1 μl, P2 1 μl, cDNA 模板 2 μl, ddH₂O 12.2 μl。反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 38 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。1.00%琼脂糖凝胶电泳检测后,用 DNA 胶回收试剂盒(诺唯赞,南京)纯化 PCR 扩增特异性产物,连接到 pEASY-T1(全式金,北京)载体上,重组载体转化到 *TransT1* 感受态细胞(全式金,北京)中,挑取阳

表 1 半滑舌鳎 *MASP1* 基因克隆和表达分析所用引物
Tab.1 PCR primers used for cloning and expression analysis of *MASP1*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Application
P1	TTCTTTCTTCATCTACTTTT	PCR 扩增
P2	GATATTTTTTCAACTAACAG	PCR 扩增
P3	GTAGTGAGCCATGAAACCTGAATGTC	5'RACE 扩增
P4	GTGTGTGAAGTACAACCTTGACTCGG	5'RACE 扩增
P5	TAGAGAAACACCTCCAGATTTTCC	3'RACE 扩增
P6	CTGTGCTGGCTTCTTTGAAGGG	3'RACE 扩增
P7	AACGTGGGCTGCCGTGAGG	qRT-PCR 扩增
P8	TGGAGCCAAGCACCAGCAAC	qRT-PCR 扩增
Cs18s-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	qRT-PCR 内参引物
Cs18s-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	qRT-PCR 内参引物

性克隆进行菌液 PCR 验证后测序(上海派森诺生物科技有限公司)。在克隆获得的序列 5'端和 3'端设计 RACE (Rapid-Amplification of cDNA Ends)引物 P3 和 P5(表 1)和巢式特异性引物 P4 和 P6(表 1), 使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(TaKaRa, 大连)获得该基因的 5'和 3'端序列, 将克隆的序列进行拼接获得 *CsMASP1* 基因的 cDNA 全长序列。

1.5 *CsMASP1* 基因序列分析

将 *CsMASP1* 的全长 cDNA 序列提交到 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), 利用 BLAST 程序进行核苷酸同源性比对, 利用 ORF Finder (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找开放阅读框, 并推导其相应的氨基酸序列; 采用 SMART(Simple Modular Architecture Research Tool)在线软件分析 *CsMASP1* 蛋白的结构域, 利用 ExPASy 软件(<http://www.expasy.org>)预测其相对分子质量和等电点; 用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)软件分析 *CsMASP1* 蛋白的信号肽。应用 Splign(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)在线软件确定 *CsMASP1* 基因的内含子与外显子的数目, 分析不同物种 *MASP1* 的基因结构以及其所在染色体的位置。

1.6 *MASP1* 同源比对系统进化树构建

从 GenBank 中查询不同物种 *MASP1* 基因的氨基酸序列, 采用 DNAMAN 软件进行不同物种的 *MASP1* 蛋白的氨基酸序列多重比对, 用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

1.7 *CsMASP1* 基因表达的实时定量分析

根据 *CsMASP1* 基因设计扩增引物 P7 和 P8(表 1), 以半滑舌鳎 18S rRNA 基因为内参设计特异引物 Cs18s-F 和 Cs18s-R (表 1)。基因实时定量表达参照已报道的方法进行(Lu *et al*, 2013; Yu *et al*, 2017)。使用 ChamQ™SYBR® Color qPCR Master Mix 试剂(诺唯赞, 南京), 按照说明书于 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪上进行该基因的实时定量分析(qRT-PCR)。反应体系为 20 μ l: 10 μ l 2 \times ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix, 1 μ l 模板 cDNA, 0.4 μ l 引物 P7, 0.4 μ l 引物 P8, 0.4 μ l 50 \times ROX Reference Dye 2, 7.8 μ l ddH₂O。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样品设置 3 个技术重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法计算目的基因的相对表达量, Ct 值取 3 个平行样品的平均值。qRT-PCR 检测结果使用 SPSS

19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)的 Duncan 法对多组样本平均值进行两两比较分析, $P < 0.05$ 时, 认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 *CsMASP1* 基因序列分析和结构特征

克隆获得的 *CsMASP1* 基因 cDNA 序列全长为 2507 bp (登录号: XM_008309208.2), 5'非编码区(Untranslated Region, UTR, 5' UTR)长 82 bp, 3' UTR 长 142 bp, 开放阅读框(Open reading frame, ORF)长 2283 bp (图 1)。推测 *CsMASP1* 编码氨基酸为 760 个, 预测其分子量为 84.95 kDa, 理论等电点(pI)为 5.33。SignalP 4.0 Server 分析显示, 此氨基酸序列无信号肽。SMART 软件分析显示, *CsMASP1* 蛋白含 6 个结构域: 分别是 2 个类 Clr/Cls 蛋白(like Clr/Cls Protein domain, CUB)结构域(47~168 aa, 215~327 aa), 1 个表皮细胞生长因子样(Calcium-binding epidermal growth factor-like domain, EGF-CA)结构域(169~212 aa), 2 个补体控制蛋白区(Complement control protein domain, CCP)结构域(331~392 aa, 397~461 aa)和 1 个丝氨酸蛋白酶区(Serine protease domain, SP)Tryp-SPc 结构域(478~752 aa) (图 2)。

利用 Splign 软件分析了 7 个物种的 *MASP1* 基因结构并进行了比较(图 3), 它们是半滑舌鳎(XM_008309208.2)、剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)(XM_023351221.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(XM_027280128.1)、斑马鱼(*Danio rerio*)(XM_001341900.6)、马(*Equus caballus*) (XM_001499629.5)、人(*Homo sapiens*)(NM_001879.5)和中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)(XM_003495604.2)。结果显示, *CsMASP1* 含 13 个外显子, 位于 4 号染色体上; 剑尾鱼 *MASP1* 含 13 个外显子, 位于 18 号染色体上; 大黄鱼 *MASP1* 含 13 个外显子, 位于 7 号染色体上; 斑马鱼 *MASP1* 含 12 个外显子, 位于 15 号染色体上; 马 *MASP1* 含 16 个外显子, 位于 19 号染色体上; 人 *MASP1* 含 16 个外显子, 位于 3 号染色体上; 中国仓鼠 *MASP1* 含 15 个外显子, 位于 4 号染色体上。半滑舌鳎 *MASP1* 基因结构与多数已知鱼类(剑尾鱼和大黄鱼)一致, 与哺乳类(人、马和中国仓鼠)在外显子数目上有差异, 说明该基因在鱼类保守。

2.2 半滑舌鳎与其他物种 *MASP1* 同源比对和系统进化分析

通过 BLAST 比对, 将 *CsMASP1* 氨基酸序列

	aacacacacacactctgagcagagtcgggaagtagagagacggagacaaagaccaactggtagagcagcagacaaaagtag	82
ATG	AGAAAGAAGAAGTGAAGAGAATGAAAAGATCATCATCAGTGATTCTTCATCAACTGTCGTTGAAGCTGTCTTTCATCCTGAGAAGAAAAGGATGATCAGGTGCCTCCTCTTCCTG	202
M	K K E E V K R M K E S S S V I L H Q L S L K S V F H P E K K R M I R C L L F L	40
	CTTCTCCTGACGTTGGCGACTGACGCTCAGGTTCTGTCTTTGTGCACAAATGTATGGCAGCATCAAATCGCCAAATTTCCAGAGCCATATCCCAATGAGACAGAACTGCGCTGGAATGTC	322
	L L L T L A T D A Q V L S L S Q M Y G S I K S P N F P E P Y P N E T E L R W N V	80
	AGCATTCTGAAGGATCCGAGTCAAGTGTACTTACACACTTTGACCTAGAGCCGCTACCTGTGTGAGTACGACTTTGTCAAGGTGGAGGCAGAGAGGGAGGAGCTGGCATTGTC	442
	S I P E G F R V K L Y F T H F D L E P S Y L C E Y D F V K V E A E R E E L A L F	120
	TGGGGAAAGGAGAGGACACTGAAGCTGTGCCGCTCAGCAGGTCATCACTTACCAGAAAATCCCTCAGCCTGCTTCTCTCTGACTTCTCCAATGAGCAGAGACATTCAGGT	562
	C G K E E S D T E A V P A Q Q V I T S P R N S L S L L F S S D F S N E Q R H S G	160
	TTCATGGCTCACTACAGTGCAGAGGATGTTGATGAATGCAGTATTCCAGTGTATGAAGTCTGTTTGTGATCACTTCTGCACAACCTCATGGAGGTTACTACTGCTCCTGCTGCTAT	682
	F M A H Y S A E D V D E C S D S S D E D L F C D H F C H N F I G G Y Y C S C R Y	200
	GGTTACCTGCTGCATACAGCAATCGTACCTGCAGAGTGGAGTGCAGCGATGCTGTGTTACAGGAAACGCTCTGGTATTCTCAGCAGTGTGATTCCCGGCTCCGTATCCAAAAGCTCT	802
	G Y L L H T D N R T C R V E C S D A V F R E R S G I L S S V D F P A P Y P K S S	240
	GACTGTTGTATCGTATTGAGGTGGAGCTGGATTTAAGATCCGCTCCAGTTGACCTAGCTTCAACGTGAGGATCATCTGACGTCAGGTGCCTTACGACTACATCAAGATACA	922
	D C L Y R I E V E P G F K I R L Q F D P S F N V E D H P D V R C P Y D Y I K I T	280
	GGGGCAGCACTGAGCAGGCCCTTTTGTGGAGATAAATCCCAGGAGTATTGAGGTGGACAGTAACTGGCCCTCTGCTGCTTCCACAGTGACAACCTCAGGAGAAAACCTGGGATGG	1042
	G G S T E Q G P F C G D K S P G V I E V D S N V A S V V F H S D N S G E N L G W	320
	AGGTTGACGTACACAGCTATAGGAAGTAAATGCGTAGTACTGAAATCCAGCCCAACGCTCTGATGAATCCTGCAATCAGAATATTCTTTAAGACCACATGTTCTCACCTGTGAG	1162
	R L T Y T A I G S K C V V P E I Q P H A L M N P V Q S E Y S F K D H I V F T C E	360
	CCTGGATTTCGACTGCTGAAGGATGGACAGTATCTGGACCATTTCCAGATCGACTGTGGTCTAATGGATCCTGGACTAGTCGCTCCTCAGTGCACATGGTGGATTGTTGGGAGTCCA	1282
	P G F R L L K D G Q Y L D H F Q I D C G S N G S W T S R P P Q C H M V D C G S P	400
	AAGTGTGGACTGGCAGAGGTGGTTTGGGAACCCAGCAACACCCTCGATTTGGATCGTCTGTCACGTACCTGTAGAGGGACATGATGGAGCCCAAGCACCAGCAACACGCTCT	1402
	K V V D L A E V V F G N H D N T T R F G S S V T Y V C R G D M M E P S T S N T S	440
	TACACTGTGGCCAGAATGGAGAATGGACAAATGTAGAAGCAGGAGTCAAATGCCCGCTGTCTCCAGCCTGTGGAGTCCCTCGCTACCTTCCCCCTCAGATGAAGCGTATCGTG	1522
	Y T C G Q N G E W T N V E A G V K L P R C L P A C G R P S R T F P P Q M K R I V	480
	GGAGGGCGGACTGCAGAGCCAGGCTCTTCCATGGCAGGTCCTGCTCAGTGTGAGGACCAGTCCAGAGTCCCAAGACCAGTGGTTGGTTGGTGGAGCGTGTCTGAGTCTCGG	1642
	G G R T A E P G L F P W Q V L L S V E D Q S R V P E D H W F G S G A L L S E F W	520
	GTCTCACGGCAGCCACGTTCTCAGTCTCAGAGGAGATGCTAGTGTGGTTCCTGTGGCACCAGAACAGTGAAGTCTTCTTGGTCCATGACCCCAACAACAATAAGGCT	1762
	V L T A A H V L R S Q R R D A S V V P V A P E H V K V F L G L H D A N N K H K A	560
	GACAGTCGCTCAGTGGACAAGGTGGTCTCCATCCACACTTCCAACCAACAACATAATAATGACATCGCCCTCATAAGGCTGACTGAGGCAGTGGAGTTAACAAGTTACATCCGACCT	1882
	D S R S V D K V V L H P H F Q P N N Y N N D I A L I R L T E A V E F N S Y I R P	600
	GTGTGTTTGGCCCTCCCAATGATGAGCCTAACTCCTGCTACTCTACCTAACTCTCTGGGAGTGTGGCTGGTGGGGATCTCCAACCTAACTCCACCTTTTCTTCTCATCCCCA	2002
	V C L P S P N D E P N S S S L L P N S L G V V A G W G I S N P N S T F S S S S P	640
	CCGACTCCGTACCACGGCAACTTTGACCCCGACTGACCTCTGACATCTACAGTACGTAAGTACCCGGTGGTTTCTCAGGGCGAGTGTGGGCCAGTACTCCTCTCGCTCCGTC	2122
	P T S V T T A N F D P G L T S D I L Q Y V K L P V V S Q G E C R A S Y S S R S V	680
	AGTTACAACATCACAGACAACATGTTCTGTCTGGCTCTTTGAAGGGGGCGGACACCTGCTGGGTGACAGCGGAGGGCGTTGTGACAGAGACCAGTCAACCCGAGGTGGGTG	2242
	S Y N I T D N M F C A G F F E G G R D T C L G D S G G A F V T E D Q L T R R W V	720
	GTGTGAGGCTGTGTCATGGGAGGCCAGAAAGAGTGTGGAGTCCGGGGTGTATGGTGTTACACTCAGTGGCATCATATGTGGAGTGGATAGAGAAAACCTCCAGATTTCCCC	2362
	V S G L V S W G G P E E C G S R R V Y G V Y T R V A S Y V E W I E K H L Q I F P	760
TGA	ggtagactctgtaacagcagcaaaaaggtgtgtccaactgaaatgtgagatttgacagtagaataacagcaatcacacgaagtaaaaaaa	2482
*		760
	aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2507

图 1 半滑舌鲷 *MASP1* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cynoglossus semilaevis MASP1*

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方，用大写字母表示。方框所示为起始密码子(ATG)、星号(*)所示为终止密码子(TGA)；实线(____)所示为 CUB 结构域；圆点线(.....)所示为 EGF-CA 结构域；短划线(_ __)所示为 CCP 结构域；双划线(====)所示为 Tryp-SPc 结构域；波浪线(~~~~)所示为 poly A 结构

Translated amino acid sequence was shown under the nucleotide sequence as uppercase. The initiation codon and termination codon were marked by a box and an asterisk, respectively; CUB domain was shown in solid line(____); EGF-CA domain was shown in dot line(.....); CCP domain was shown in dashed line(_ __); Tryp-SPc domain was shown in double solid line(====); poly A was shown in wavy line(~~~~)

(XP_008307430.1) 与金目鲈 (*Lates calcarifer*)(XP_018560455.1)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)(XP_019966501.1)、黄鳝 (*Monopterus albus*)(XP_020477488.1)、伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*)(XP_014184888.1)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)(AAI70221.1)、海龟 (*Chelonia mydas*)(EMP37646.1)、红喉潜鸟 (*Gavia stellata*)(XP_009815055.1)、皇帝企鹅 (*Aptenodytes forsteri*)(KFM09600.1)、白鹭 (*Egretta garzetta*)(XP_009633907.1)、西伯利亚虎 (*Panthera tigris altaica*)(XP_015393589.1)、羊驼 (*Vicugna pacos*)(XP_006201039.1)、马 (XP_005601936.1)、中国仓鼠 (XP_007606939.1)、人 (XP_016862358.1) 的 MASP1 氨基酸序列进行同源比对, 相似性范围为 76%~42%。其中, CsMASP1 与金目鲈的相似性最高, 为 76%; 而与中国仓鼠的相似性最低, 为 42%。将半滑舌鳎和其他 13 个物种 MASP1

的氨基酸序列进行多重比对, 可以看出不同物种 MASP1 存在高度保守的氨基酸残基, 如图 4 所示, 保守氨基酸出现在丝氨酸蛋白酶活性中心处: 组氨酸 His⁵²⁶、天冬氨酸 Asp⁵⁸² 和丝氨酸 Ser⁷⁰⁵, 这 3 个氨基酸的保守定位对于维持丝氨酸蛋白酶的活性是十分重要的。

利用 MEGA 6.0 软件对上述各个物种的 MASP1 氨基酸序列进行比对构建了系统进化树(图 5)。结果显示, 半滑舌鳎与伯氏朴丽鱼、金目鲈和黄鳝等鱼类的 MASP1 聚为一支。两栖类海龟和非洲爪蟾、鸟类白鹭、皇帝企鹅和红喉潜鸟, 哺乳类马、西伯利亚虎、羊驼、人和中国仓鼠等动物的 MASP1 聚为一支。但两栖类、鸟类和哺乳类又按亲缘关系远近聚成相应的亚类。MASP1 在进化上与伯氏朴丽鱼的亲缘关系最近, 与哺乳类、爬行类和鸟类等动物的 MASP1 的亲

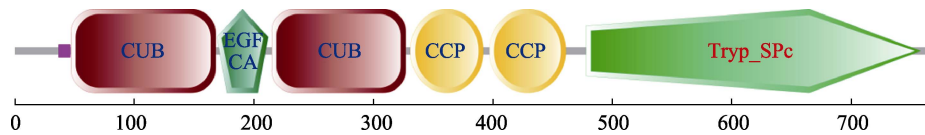


图 2 半滑舌鳎 MASP1 蛋白结构域预测

Fig.2 Domain structure prediction of *Cynoglossus semilaevis* MASP1

SMART 软件在线预测 CsMASP1 蛋白的结构域, CsMASP1 包含 6 个结构域, 从 C 端到 N 端分别是 CUB 结构域(47~168 aa), EGF-CA 结构域(169~212aa), CUB 结构域(215~327 aa), CCP 结构域(331~392 aa), CCP 结构域(397~461 aa), Tryp-SPc 结构域(478~752 aa)

SMART software predicts the domain of CsMASP1 protein online. CsMASP1 contains six domains: CUB domain (47~168 aa), EGF-CA domain (169~212 aa), CUB domain (215~327 aa), CCP domain (331~392 aa), CCP domain (397~461 aa), Tryp-SPc domain (478~752 aa)



图 3 不同物种的 MASP1 基因结构比较

Fig.3 Comparison of MASP1 gene structures of different species

7 个物种的 MASP1 基因结构图, 各个物种的 MASP1 基因序列号与所在染色体基因组序列号分别为: 人 NM_001879.5, NG_029440.1; 马 XM_001499629.5, NC_009162.3; 中国仓鼠 XM_003495604.2, NW_003613596.1; 剑尾鱼 XM_023351221.1, NC_036460.1; 大黄鱼 XM_027280128.1, NC_040017.1; 半滑舌鳎 XM_008309208.2, NC_024310.1; 斑马鱼 XM_001341900.6, NC_007126.7

The sequence numbers of the MASP1 gene and the genome numbers of the chromosomes in seven species were as follows: *Homo sapiens* NM_001879.5, NG_029440.1; *Equus caballus* XM_001499629.5, NC_009162.3; *Cricetulus griseus* XM_003495604.2, NW_003613596.1; *Xiphophorus maculatus* XM_023351221.1, NC_036460.1; *Larimichthys crocea* XM_027280128.1, NC_040017.1; *Cynoglossus semilaevis* XM_008309208.2, NC_024310.1; *Danio rerio* XM_001341900.6, NC_007126.7

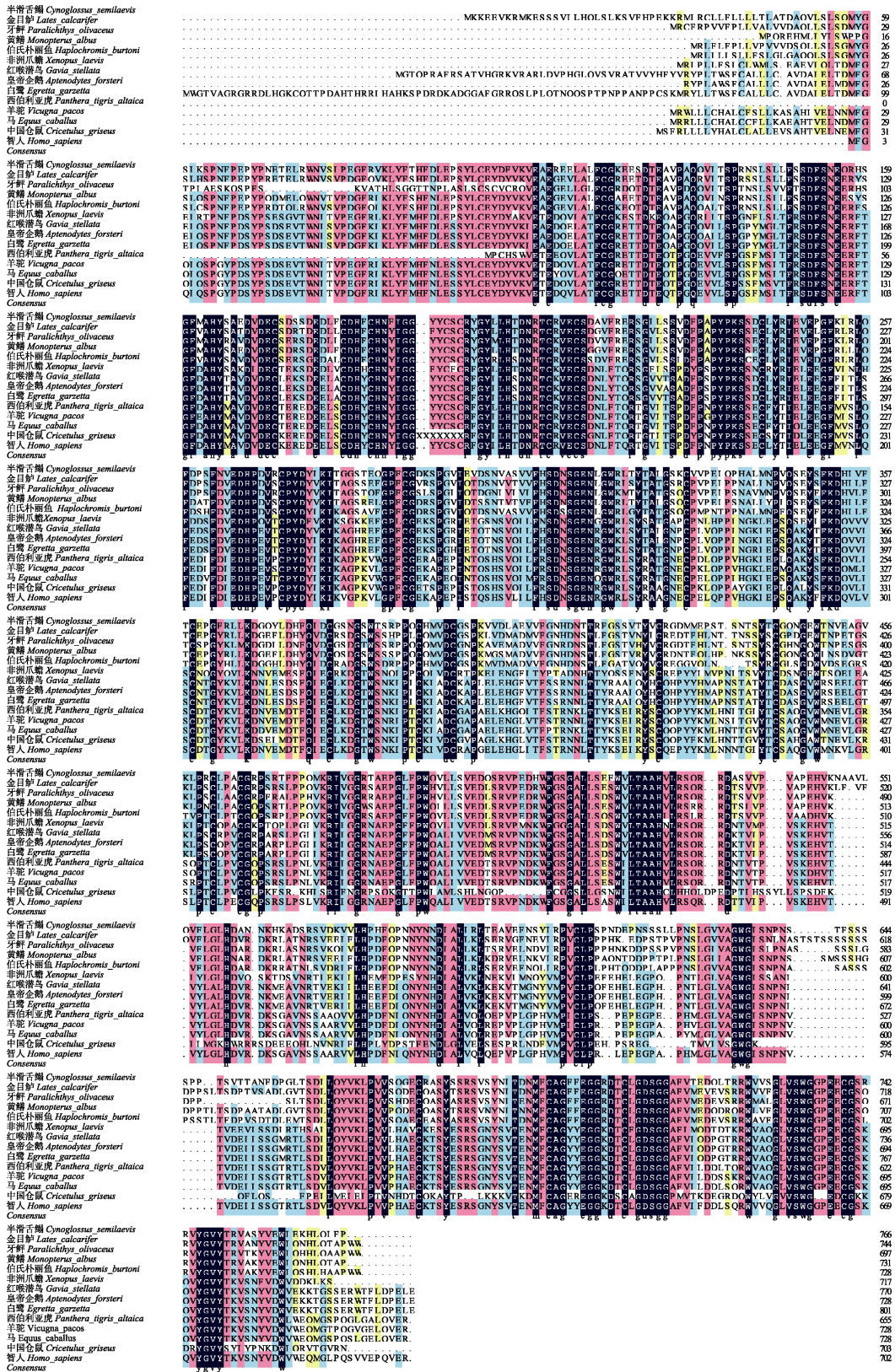


图4 半滑舌鲷和其他物种 MASP1 氨基酸序列的多重比对

Fig.4 Multiple alignment of the deduced amino acids of MASP1 among half-smooth tongue sole and other different species
MASP1 氨基酸序列比对, 丝氨酸蛋白酶结构域中保守氨基酸用黑框标出: 组氨酸 His⁵²⁶、天冬氨酸 Asp⁵⁸² 和丝氨酸 Ser⁷⁰⁵
Amino acid sequence alignment of MASP1, conservative amino acids in serine protease domain were marked by the black box: His⁵²⁶, Asp⁵⁸² and Ser⁷⁰⁵

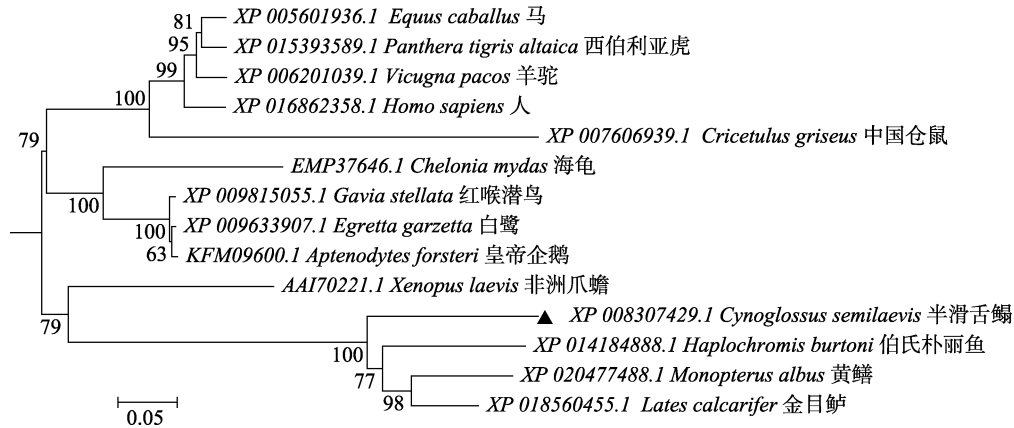


图 5 MEGA 6.0 软件构建的基于 MASP1 氨基酸序列的系统进化树
Fig.5 Phylogenetic tree based on MASP1 amino acid sequence by MEGA 6.0

缘关系较远。从进化的结果看,几个关键节点的支持率较高,均在 90%以上。例如:金目鲈和黄鳝,半滑舌鳎和伯氏朴丽鱼这几个物种聚类为一个分支,支持率分别为 98%和 100%。

2.3 *CsMASP1* 基因在健康组织中的表达分析

利用 qRT-PCR 分析 *CsMASP1* 基因在 11 种健康组织中的表达特征。结果显示, *CsMASP1* 基因在血液、脑、鳃、性腺、心脏、头肾、肠、肝、皮肤、脾和后肾中均有表达;其中,肝中相对表达量最高(185.4),其次为脾(138.1)和头肾(76.2),在脑、心脏、血液、肠、后肾、性腺、皮肤和鳃中表达量较低且表达量依次降低(图 6)。

2.4 鳗弧菌感染后 *CsMASP1* 基因在免疫组织中的表达分析

鳗弧菌感染半滑舌鳎后可诱导 *CsMASP1* 在免疫组织中的表达变化,在感染 0、6、12、24、48、72 h 后, *CsMASP1* 在 PBS 对照组和感染组半滑舌鳎的血液、鳃、头肾、肠、肝和脾 6 种免疫组织中的表达水平如图 7 所示。*CsMASP1* 基因表达总体趋势表现为先升高后降低。在脾和鳃中, *CsMASP1* 基因的表达呈现相同的上调趋势,其表达峰值出现在鳗弧菌感染后 6 h,在脾中为对照组表达量的 15.4 倍;在鳃中则是对照组的 4.6 倍;在肝中 *CsMASP1* 基因表达上调,最大表达量出现在感染后 24 h,是对照组的 12.4 倍;在肠中 *CsMASP1* 基因表达上调,最大表达量出现在感染后 12 h,是对照组的 7.7 倍,72 h 时依然保持较高的表达水平;在头肾和血液中, *CsMASP1* 基因的表达峰值均出现在鳗弧菌感染后 12 h,在头肾中为对照

组表达量的 9.7 倍;在血液中则是对照组的 6.8 倍;随后基因表达量逐渐下降至略低于正常水平值。

3 讨论

3.1 *CsMASP1* 基因 cDNA 的克隆及序列分析

甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶是机体

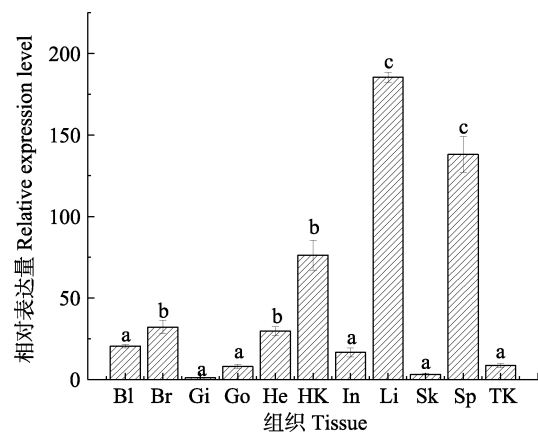


图 6 *CsMASP1* 基因在半滑舌鳎健康组织中的相对表达量
Fig.6 The relative expression of *CsMASP1* gene in normal tissues of *C. semilaevis*

Bl: 血液; Br: 脑; Gi: 鳃; Go: 性腺; He: 心脏; HK: 头肾; In: 肠; Li: 肝; Sk: 皮肤; Sp: 脾; TK: 后肾。字母“a, b, c”代表 SPSS 多重分析的不同分组,有相同字母表示差异不显著($P>0.05$),无相同字母表示差异显著($P<0.05$);下同

Bl: Blood; Br: Brain; Gi: Gills; Go: Gonad; He: Heart; Hk: Head kidney; In: Intestine; Li: Liver; Sk: Skin; Sp: Spleen; Tk: Trunk kidney. The letters of ‘a, b, and c’ indicated the Duncan grouping in SPSS 19.0 software. The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), the different letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same applies below

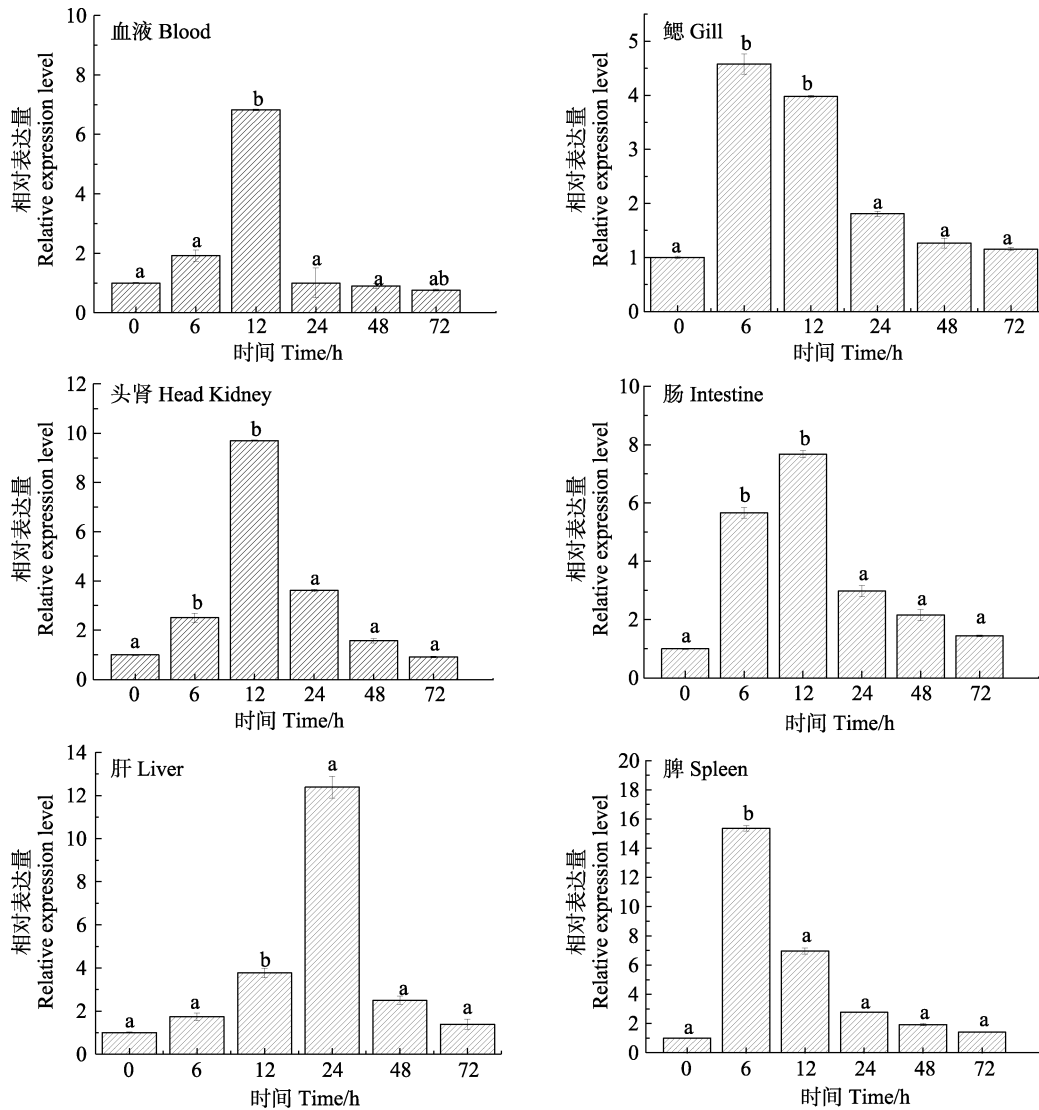


图 7 鳊弧菌感染半滑舌鲷后不同时间点 6 种组织(血液、鳃、头肾、肠、肝和脾)中 *CsMASP1* 基因的相对表达水平

Fig.7 Relative expression of *CsMASP1* gene in six tissues (blood, gill, head kidney, intestine, liver and spleen) of *C. semilaepis* at different time points after *Vibrio anguillarum* infection

重要的天然免疫防御分子,通过激活补体和调理吞噬 2 种方式来清除病原体(Chen *et al*, 2000)。MASP1 是形成 C4bC2a 转化酶的必要因子,是凝集素激活途径中的特异性启动酶(Oroszlan *et al*, 2016)。MASP 最初是作为与 Complement component 1s(C1s)功能相似可以裂解 C4 和 C2 的一种新型丝氨酸蛋白酶被发现的(Matsushita *et al*, 1992)。鉴于 MASP 与 C1s 相似,推测 MBL-MASP1-MASP2 与 C1q-C1r2-C1s2 相似,因此, MASP1 和 MASP2 可能分别与类 Complement component 1r (C1r)和类 C1s 丝氨酸蛋白酶有相似的功能(Matsushita *et al*, 1998、2000)。虽然在硬骨鱼的免疫系统中已经鉴定出了 *MASP1*,但其对细菌感染的免疫功能尚不清楚(Endo *et al*, 2003; Dang *et al*,

2017)。本研究成功克隆了 *CsMASP1* 基因,预测其编码蛋白的分子量为 84.95 kDa,与已报道的草鱼 MASP1 (Dang *et al*, 2017)的分子量和人 MASP1 (Matsushita *et al*, 1998)的分子量类似。*CsMASP1* 编码的氨基酸序列经 SignalP 软件预测无信号肽,而草鱼 MASP1 蛋白序列中包含一段 19 aa 的信号肽(Dang *et al*, 2017)。研究表明, MASP 的 SP 区(Serine protease domain)是催化功能区,含有所有丝氨酸蛋白酶活性中心高度保守的组氨酸(His)、丙氨酸(Asp)和丝氨酸(Ser)等 3 个氨基酸残基,与 MASP 的丝氨酸蛋白酶活性有关(Wallis *et al*, 2000、2007)。在本研究中, SMART 结果显示, *CsMASP1* 含有 6 个结构域,分别是 2 个 CUB 结构域(47~168 aa, 215~327 aa)、1 个 EGF

结构域(169~212 aa)、2 个 CCP 结构域(331~392 aa, 397~461 aa)和 1 个 Tryp-SPc 结构域(478~752 aa)。与文献报道的人 MASP1(Matsushita *et al.*, 1998; Stover *et al.*, 2001; Dobo *et al.*, 2016)结构域相同, 与草鱼 MASP1(Dang *et al.*, 2017)结构域也相同。丝氨酸蛋白酶结构域(SP)活性中心有 1 个典型的组氨酸环。氨基酸序列比对结果显示, 丝氨酸蛋白酶结构域完全相似, 组氨酸 His⁵²⁶、天冬氨酸 Asp⁵⁸² 和丝氨酸 Ser⁷⁰⁵ 定位相当保守, 与文献报道的文昌鱼和七鳃鳗(Endo *et al.*, 2003)的比对结果一致, 说明该活性中心在进化上相对保守。这些特性与 MASP/C1r/C1s 家族的进化相关(Jia *et al.*, 2003)。系统进化分析结果显示, CsMASP1 与伯氏朴丽鱼 MASP1 亲缘关系最近, 与金目鲈和黄鳝等鱼类的 MASP1 亲缘关系次之。

3.2 CsMASP1 在健康组织和鳎弧菌感染后的免疫组织中的表达分析

本研究利用 qRT-PCR 检测 CsMASP1 在半滑舌鳎 11 种健康组织和感染后 6 种免疫组织中的表达谱, 结果显示, 在所检测的 11 种组织中分布广泛且具有组织特异性, 在肝中表达水平最高, 脾中表达水平次之, 在头肾中的表达相对其他组织也较高, 推测其可能在免疫调控中发挥作用。与草鱼的分布结果不相同, 草鱼 MASP1 在心脏中表达水平最高, 在肝和脑中表达水平次之(Dang *et al.*, 2017)。

MASP1 是构成先天性免疫防御体系的重要成员之一(Ammitzboll *et al.*, 2013)。本研究报道了 CsMASP1 参与鳎弧菌感染后机体反应的免疫应答。鳎弧菌感染半滑舌鳎 72 h 内, CsMASP1 在血液、鳃、头肾、肠、肝和脾组织中均出现上调表达的情况, 总体趋势表现为表达量先升高, 达到一个峰值后, 随感染时间的延长表达量逐渐降低恢复至正常水平, 说明 CsMASP1 在病原入侵后参与了机体的免疫应答。鳃和肠中的 CsMASP1 表达量在鳎弧菌感染后 6 h 大幅上调, 鳃在 6 h 达到最大值, 肠比鳃稍微滞后, 肠在 12 h 达到最高峰, 分别是对照组的 7.7 倍和 4.6 倍, 随后下降到与对照组无显著差异。肠是最大的免疫器官, 肠上分布着大量的肠相关淋巴组织, 肠道组织和鳃是腹腔注射鳎弧菌后直接接触的部位, 所以肠和鳃 CsMASP1 的表达量均先于其他免疫组织上调。随后, 病原菌进入其他免疫组织, 激活其他免疫组织 CsMASP1 基因的表达。与 Dang 等(2017)研究发现草鱼感染嗜水气单胞菌后, 草鱼 MASP1 在鳃和肠中表达量短时快速增加结果相一致; 但草鱼 MASP1 在肠中感染后 4、24、72 h 显示 3 个表达高峰与本研究的

结果不太一致, 推测草鱼 MASP1 在肠中感染后出现 3 个峰值可能是由于感染菌不同, 也可能是由于鱼体差异等。脾 CsMASP1 的表达量随着时间增加而增加, 在感染 6 h 后达到最大值, 约是对照组的 15 倍, 是所有免疫组织中增量最高的组织; 这与肾、脾是鱼类免疫细胞生成的主要场所, 也是产生免疫应答的主要部位这一观点是一致的(Wang *et al.*, 2018)。6 种免疫组织表现出不同的表达模式可能与不同时间点的信号转导有关, 在我们之前的研究中, 感染后, 补体激活途径、凝血级联激活途径和弧菌感染相关途径均被激活来抵御病原菌的入侵(Zhang *et al.*, 2015)。CsMASP1 在免疫组织中的高表达暗示了 CsMASP1 在机体免疫反应中可能发挥着重要作用。本结果为深入研究 MASP1 基因在半滑舌鳎免疫防御系统中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- Ammitzboll CG, Steffensen R, Nielsen HJ, *et al.* Polymorphisms in the MASP1 gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73317
- Cai XM, Zhao N, Zuo DM, *et al.* Construction and expression of prokaryotic expression vector of human MASP1 N-terminal fragment. *Cell and Molecular Immunology*, 2008, 24(6): 546-549 [蔡学敏, 赵娜, 左大明, 等. 人 MASP1N 端片段原核表达载体的构建及其表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(6): 546-549]
- Chen ZL, Lu X, Zhang LY, *et al.* Cloning and identification of human MBL-related serine protease 1 gene. *Cellular and Molecular Immunology*, 2000, 16(5): 417-419 [陈政良, 卢晓, 张丽芸, 等. 人 MBL 相关丝氨酸蛋白酶 1 cDNA 的克隆与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, 16(5): 417-419]
- Chen Y, Fan L, Liu TT, *et al.* Cloning and expression analysis of TRAF6 gene and TAK1 gene of half-smooth tongue sole. *Chinese Aquatic Science*, 2015, 22(5): 867-876 [陈燕, 樊琳, 刘田田, 等. 半滑舌鳎 TRAF6 基因和 TAK1 基因的克隆及表达分析. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 867-876]
- Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, *et al.* MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, 2001, 15(1): 127-135
- Dang YF, Shen YB, Xu XY, *et al.* Mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) mediates immune responses against *Aeromonas hydrophila* *in vitro* and *in vivo* in grass carp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017(66): 93-102
- Dobo J, Pal G, Cervenak L, *et al.* The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in

- the lectin pathway of complement and beyond. *Immunological Reviews*, 2016, 274(1): 98–111
- Endo Y, Nonaka M, Saiga H, *et al.* Origin of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 involved in the lectin complement pathway traced back to the invertebrate, amphioxus. *Journal of Immunology*, 2003, 170(9): 4701–4707
- Jia TJ, Li P, Zhang SM. Research status of structure and function of MASPs. *Medical Review*, 2003, 9(4): 193–195 [贾天军, 李萍, 张庶民. MASPs 的结构与功能研究现状. *医学综述*, 2003, 9(4): 193–195]
- Lu Y, Wang QL, Li M, *et al.* Expression analysis of *TLR20* and *TLR21* genes in channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged by different bacteria and virus. *Progress in Fisheries Science*, 2013, 34(6): 44–51 [路飏, 王启龙, 李敏, 等. 斑点叉尾鲷 *TLR20* 和 *TLR21* 基因在不同细菌和病毒感染后的表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 44–51]
- Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(6): 1497–1502
- Matsushita M, Endo Y, Nonaka M, *et al.* Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 29–35
- Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, *et al.* Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *Journal of Immunology*, 2000, 165(5): 2637–2642
- Matsushita M, Endo Y, Fujita T. MASPl (MBL-associated serine protease 1). *Immunobiology*, 1998, 199(2): 340–347
- Nicola F, Lorian B. Morula cells as key hemocytes of the lectin pathway of complement activation in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 63: 157–164
- Oroszlan G, Kortvely E, Szakacs D, *et al.* MASP-1 and MASP-2 do not activate pro-factor D in resting human blood, whereas MASP-3 is a potential activator: kinetic analysis involving specific MASP-1 and MASP-2 inhibitors. *Journal of Immunology*, 2016, 196(2): 857–865
- Schwaebel W, Dalai MR, Thiel S, *et al.* The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MAp19: Four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*, 2002, 205(4–5): 455–466
- Sha ZX, Wang LQ, Sun LM, *et al.* Isolation and characterization of monocyte/macrophage from peripheral blood of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, (65): 256–266
- Stover C, Endo Y, Takahashi M, *et al.* The human gene for mannan binding lectin associated serine protease-2, the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2-3. *Genes and Immunity*, 2001, 2(3): 119–127
- Sunyer JO, Lambris JD. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*, 1998, 166(1): 39–57
- Swierzko AS, Szala A, Sawicki S, *et al.* Mannose-binding lectin (MBL) and MBL-associated serineprotease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2014, 63(11): 1129–1140
- Takahashi M, Sekine H, Endo Y, *et al.* Comment on “Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function”. *Journal of Immunology*, 2013, 190(6): 2477
- Wang LQ, Wang H, Chen YD, *et al.* Isolation and identification of T lymphocyte from peripheral blood of half-smooth tongue sole and analysis of *TCR β* gene immune response. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(3): 480–487 [汪林庆, 王航, 陈亚东, 等. 半滑舌鲷外周血 T 淋巴细胞的分离、鉴定及 *TCR β* 基因免疫应答分析. *水生生物学报*, 2018, 42(3): 480–487]
- Wallis R, Dodd RB. Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases: Effects of naturally occurring mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(40): 30962–30969
- Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, *et al.* Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(11): 7844–7851
- Yu MJ, Sun LM, Chen YD, *et al.* Cloning and expression of the *c-Jun* gene in immune response to pathogen challenge in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fisheries Science*, 2017, 38(2): 31–39 [于孟君, 孙璐明, 陈亚东, 等. 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) *c-Jun* 基因的克隆及免疫应答分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 31–39]
- Zhang X, Wang SL, Chen SL, *et al.* Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in immunity in *Cynoglossus semilaevis* during *Vibrio anguillarum* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 209–218

Cloning and Expression Analysis of the *MASP1* Gene from the Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Qian¹, ZHANG Xue¹, CHEN Yadong^{2,3}, SHA Zhenxia^{1,2①}

(1. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

Abstract Mannan-binding lectin-associated serine protease 1 (MBL associated serine protease 1, MASP1) is an important activator in the complement lectin pathway. In this study, the cDNA of the *MASP1* gene from *Cynoglossus semilaevis* (*CsMASP1*) was cloned using a RACE method based on the partial sequence of *CsMASP1*, and gene expression was performed by qRT-PCR. The results showed that the full length of cDNA was 2507 bp in size, including a 5'-untranslated region (UTR) of 82 bp, 3'-UTR of 142 bp, and a complete open reading frame (ORF) of 2283 bp, encoding 760 amino acids. The theoretical isoelectric point (pI) of the predicted protein was 5.33 and the molecular weight was 84.95 kDa. Homologous alignment showed that the amino acids sequence of *CsMASP1* had a high identity with those of other species, approximately 42%~76%. The *CsMASP1* gene was expressed in all tested tissues (liver, intestine, spleen, head-kidney, gill, blood, brain, skin, heart, trunk-kidney, and gonad) in the healthy *C. semilaevis* and the highest expression was in the liver (185.4). To study the expression patterns of the *CsMASP1* gene in an immune response, the specific expression of *CsMASP1* was performed after *Vibrio anguillarum* infection. The results showed that the expression of the *CsMASP1* gene was up-regulated in the liver, gill, blood, intestine, head-kidney, and spleen after *V. anguillarum* infection. The most significantly up-regulated expression and the peak level at 6 h reached 15.4 times baseline in the spleen. The results indicate that the *CsMASP1* genes are involved in the immune response.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; *MASP1*; Gene cloning; Gene expression; Immune response

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190402001

http://www.yykxjz.cn/

于万峰, 林黑着, 黄忠, 虞为, 周传朋, 谭连杰, 荀鹏伟, 黄倩倩, 黄小林. 卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 60–69
Yu WF, Lin HZ, Huang Z, Yu W, Zhou CP, Tan LJ, Xun PW, Huang QQ, Huang XL. Dietary selenium requirement of golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 60–69

卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量*



于万峰^{1,2} 林黑着^{2,3①} 黄忠^{2,3} 虞为^{2,3} 周传朋²
谭连杰^{1,2} 荀鹏伟^{1,2} 黄倩倩^{1,2} 黄小林^{2,3}

(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南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地 深圳 518121)

摘要 为确定卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)对饲料中硒的需求量, 选取初始体重为(15.04±0.20) g 的卵形鲳鲹 450 尾, 随机分成 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 25 尾。分别投喂以亚硒酸钠(Na₂SeO₃) 为硒源, 硒含量分别为 0.41、0.60、0.73、0.80、0.90 和 1.12 mg/kg 的等氮等脂饲料 50 d。结果显示, 随着饲料中硒含量的增加, 卵形鲳鲹的增重率和特定生长率先升高后趋于稳定, 饲料系数变化趋势与之相反。饲料中硒含量对全鱼体成分无显著影响($P>0.05$)。血清白蛋白和高密度脂蛋白胆固醇含量随饲料中硒含量的增加呈先升高后降低的趋势, 而血清碱性磷酸酶活性先升高后保持稳定。饲料中添加硒可以显著提高血清谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶和肝脏谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽硫转移酶、谷胱甘肽还原酶、过氧化氢酶活性($P<0.05$), 随着饲料中硒含量的增加, 其谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽硫转移酶和过氧化氢酶活性呈先升高后稳定的趋势, 而超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶活性呈先上升后下降的趋势。饲料中不同硒水平显著影响了卵形鲳鲹全鱼中的硒含量($P<0.05$), 且随着饲料中硒含量的增加先上升后趋于稳定。折线回归分析表明, 以增重率、血清谷胱甘肽过氧化物酶活性和全鱼中硒含量为评价指标, 卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量分别为 0.66、0.82 和 0.76 mg/kg。

关键词 卵形鲳鲹; 硒; 需求量; 生长性能; 抗氧化能力

中图分类号 S963.73⁺⁴ **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0060-10

硒存在于动物机体的所有组织和细胞, 是鱼类所必需的微量元素之一。硒是谷胱甘肽过氧化物酶的组成成分, 该酶能催化过氧化氢和脂质过氧化物分别转

化为水和脂质醇(NRC, 2011), 可维持细胞结构完整和生理功能正常。硒参与多种抗氧化酶的组成, 可通过其抗氧化作用和对免疫细胞及免疫因子的调节来

* 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2017ZD01)、国家自然科学基金项目(31602175)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2018HY-ZD0506)和深圳市科技计划知识创新基础研究项目(JCYJ20170817103947002; JCYJ20180306180203889)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2017ZD01), National Natural Science Foundation of China (31602175), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018HY-ZD0506), and Shenzhen Grant Plan for Science and Technology (JCYJ20170817103947002; JCYJ20180306180203889)]. 于万峰, E-mail: yuwanfeng123@163.com

①通讯作者: 林黑着, 研究员, E-mail: linheizhao@163.com

收稿日期: 2019-04-02, 收修改稿日期: 2019-04-18

增强动物机体的免疫功能(方热军等, 2018)。此外, 硒对提高动物生长繁殖性能、维持甲状腺正常生理功能、防癌抗癌及解毒等具有重要作用(段亮亮, 2018)。目前, 部分鱼类对硒的需求量已被确定, 如石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)为 0.70 mg/kg (Lin *et al*, 2005)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)为 1.18 mg/kg (Han *et al*, 2011)、黄尾鲷(*Seriola lalandi*)为 5.56 mg/kg (Le *et al*, 2013)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)为 0.15~0.38 mg/kg (Hilton *et al*, 1980)、大黄鱼(*Larimichthys croceus*)为 0.178~0.575 mg/kg (曹娟娟等, 2015)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)为 0.63~0.75 mg/kg (谈枫等, 2015)、军曹鱼(*Rachycentron canadum* L.)为 0.788~0.811 mg/kg (Liu *et al*, 2010)、条纹锯鲷(*Centropristis striata*)为 0.62~0.92 mg/kg (张清雯等, 2018)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为 1.06~2.06 mg/kg (Lee *et al*, 2016)等。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*), 属暖水性中上层洄游鱼类, 具有生长快、肉细嫩、味鲜美和价格适中等多种优点, 是我国福建、广东及海南等沿海地区的重要经济鱼类之一。关于卵形鲳鲹蛋白质(刘兴旺等, 2011)、脂肪(王飞, 2012)、碳水化合物(Zhou *et al*, 2015)、氨基酸(杜强, 2012; 谭小红, 2015; Huang *et al*, 2018)、脂肪酸(戚常乐, 2016)和维生素(荀鹏伟等, 2018; 黄倩倩等, 2019; Xun *et al*, 2019)等营养需要量的研究已有相关报道, 但对其微量元素硒需要量的研究尚属空白。本实验以卵形鲳鲹为研究对象, 研究饲料中不同硒含量对其生长性能、全鱼体成分、血清生化指标、血清和肝脏抗氧化指标、全鱼和脊椎骨中硒含量的影响, 旨在确定卵形鲳鲹对饲料中硒的最适需求量, 为其配合饲料配制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验饲料配方及营养组成见表 1。以酪蛋白、鱼粉、大豆浓缩蛋白、豆粕、花生粕和玉米蛋白粉为蛋白源, 鱼油和大豆卵磷脂为脂肪源, 面粉和玉米淀粉为糖源, 配制基础饲料。以亚硒酸钠(Na_2SeO_3 , 硒含量 0.45%, 饲料级, 购自河北省黄骅市津骅添加剂有限公司)为硒源, 硒的添加水平为 0、0.15、0.30、0.45、0.60 和 0.75 mg/kg, 并相应减少微晶纤维素的用量, 配制成 6 种不同硒含量的等氮等脂半纯化饲料。实验饲料委托中国广州分析测试中心采用氢化物原子荧光光谱法(GB/T 13883-2008)测定, 其硒的含量分别为 0.41、0.60、0.73、0.80、0.90 和 1.12 mg/kg。将鱼粉等原料用粉碎机粉碎, 使其过 40 目筛网。按

照饲料配方准确称量每种饲料原料, 把常量组分混合均匀后, 微量组分通过逐级扩大混匀的方法加入, 初步混匀后倒入搅拌机(SZ250, 广州旭众食品有限公司)搅拌 10 min 后取出。按配方比例加入鱼油和大豆卵磷脂, 搓碎混匀并过 40 目筛网后倒入搅拌机搅拌 10 min。添加适量水(约 40%)再搅拌 10 min 后, 用双螺杆挤条机(F-26, 华南理工大学)挤压成直径为 2.0 和 2.5 mm 的 2 种条形物。经造粒机(G-500, 华南理工大学)将其甩成颗粒后风干, 然后用封口袋密封并做好标签, 保存于 -20°C 冰箱中备用。

1.2 饲养管理

本实验卵形鲳鲹由深圳市龙岐庄实业发展有限公司培育, 正式实验前先在中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地养殖池塘的网箱中暂养。投喂基础饲料驯化 7 d 后, 选取体质健康、规格整齐的卵形鲳鲹 450 尾[初始体重为 (15.04 ± 0.20) g], 随机分配到 18 个网箱中($1.0\text{ m}\times 1.0\text{ m}\times 1.5\text{ m}$), 随机分成 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 25 尾, 分别投喂 6 组实验饲料。每天 06:30 和 17:30 饱食投喂 2 次, 24 h 充氧, 实验周期为 50 d。养殖期间水温为 $27^\circ\text{C}\sim 31^\circ\text{C}$, 盐度为 15~20, 溶解氧浓度 $>5.0\text{ mg/L}$ 。

1.3 样品采集

养殖实验结束时, 将卵形鲳鲹停食 24 h 后, 称取每个网箱的鱼体总重并记录鱼尾数。每个网箱随机取 7 尾鱼, 其中 2 尾鱼用于全鱼体成分和硒含量分析, 剩余 5 尾鱼测体长和体重并记录。之后, 用 1 ml 注射器(1%肝素钠润洗)从尾静脉取血, 注入 1.5 ml 离心管中, 4°C 静置 30 min 后离心(3000 r/min , 10 min, 4°C), 获取上清液并分装于 1.5 ml 离心管中, 于 -80°C 保存, 用于血清生化和酶活性分析; 按顺序解剖出采血后鱼的内脏和肝脏, 称量并记录, 肝脏分装于 2 ml 冻存管中, 液氮速冻后于 -80°C 保存, 用于肝脏酶活性分析; 将解剖后的鱼置于微波炉加热 3 min, 剥离肌肉并取出脊椎骨, 于烘箱中 105°C 烘干 2 h, 然后粉碎, 用于脊椎骨硒含量分析。

1.4 指标测定

增重率(Weight gain rate, WGR, %)= $100\times[\text{末均体重}(\text{g})-\text{初均体重}(\text{g})]/\text{初均体重}(\text{g})$

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)= $100\times[\ln \text{末均体重}(\text{g})-\ln \text{初均体重}(\text{g})]/\text{养殖天数}(\text{d})$

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=饲料投喂量(g)/鱼体增重(g)

肥满度(Condition factor, CF)= $100\times\text{体重}(\text{g})/[\text{体}$

长(cm)]³

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=100×内脏重(g)/鱼体重(g)

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %)=100×肝脏重(g)/鱼体重(g)

饲料和全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量分别采用 105℃常压干燥法、凯氏定氮法、索氏抽提法(石油醚为抽提剂)和 550℃马弗炉灼烧法进行测定;

血清生化指标委托广州新海医院检验中心进行测定;血清和肝脏抗氧化指标采用试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)进行测定;全鱼和脊椎骨中硒含量委托中国广州分析测试中心采用氢化物原子荧光光谱法(GB 5009.93-2017)进行测定。

1.5 数据分析

实验数据采用 Excel 2016 软件进行处理,通过

表 1 实验饲料配方及营养组成(干物质基础, %)

Tab.1 Formulation and nutrient composition of the experimental diets (DM basis, %)

成分 Ingredients	饲料 Diets					
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 6
酪蛋白 Casein	26	26	26	26	26	26
鱼粉 Fish meal	10	10	10	10	10	10
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	10	10	10	10	10	10
豆粕 Soybean meal	6	6	6	6	6	6
花生粕 Peanut meal	5	5	5	5	5	5
玉米蛋白粉 Corn protein meal	2	2	2	2	2	2
面粉 Wheat flour	13	13	13	13	13	13
玉米淀粉 Corn starch	9	9	9	9	9	9
鱼油 Fish oil	9	9	9	9	9	9
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
维生素预混料 Vitamin premix ¹	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
无硒矿物质预混料 Selenium-free mineral premix ²	2	2	2	2	2	2
维生素 C Vitamin C (95%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗氧化剂 Antioxidant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
氯化胆碱 Choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	3.700	3.697	3.693	3.690	3.687	3.683
甜菜碱 Betaine	1	1	1	1	1	1
海藻酸钠 Sodium alginate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
亚硒酸钠 Na ₂ SeO ₃ (mg/kg)	0	33.33	66.67	100.00	133.33	166.67
营养组成 Nutrient composition (%)						
水分 Moisture	7.30	7.48	7.33	7.40	7.36	7.49
粗蛋白 Crude protein	43.0	42.8	43.0	43.0	42.9	42.9
粗脂肪 Crude lipid	11.4	11.4	11.6	11.5	11.7	11.6
灰分 Ash	6.32	6.27	6.26	6.27	6.33	6.27
硒 Selenium (mg/kg)	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12

注: 1. 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A 1200 mg, 维生素 D₃ 50 mg, 维生素 E 30000 mg, 维生素 K₃ 30000 mg, 维生素 B₁ 8000 mg, 维生素 B₂ 15000 mg, 维生素 B₆ 12000 mg, 维生素 B₁₂ 90 mg, 烟酸 90000 mg, 肌醇 80000 mg, 泛酸钙 50000 mg, 叶酸 1200 mg, 生物素 40 mg

2. 无硒矿物质预混料(mg/kg 饲料): 氟化钠 4 mg, 碘化钾 1.6 mg, 氯化钴(1%)100 mg, 硫酸亚铁 160 mg, 硫酸锌 100 mg, 硫酸铜 20 mg, 硫酸锰 120 mg, 硫酸镁 1352 mg, 磷酸二氢钙 6000 mg, 氯化钠 200 mg, 沸石粉 11942.4 mg

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg diet): Vitamin A 1200 mg, Vitamin D₃ 50 mg, Vitamin E 30000 mg, Vitamin K₃ 30000 mg, Vitamin B₁ 8000 mg, Vitamin B₂ 15000 mg, Vitamin B₆ 12000 mg, Vitamin B₁₂ 90 mg, Nicotinic acid 90000 mg, Inositol 80000 mg, Calcium pantothenate 50000 mg, Folic acid 1200 mg, Biotin 40 mg

2. Selenium-free mineral premix (mg/kg diet): NaF 4 mg, KI 1.6 mg, CoCl₂·6H₂O (1%) 100 mg, FeSO₄·H₂O 160 mg, ZnSO₄·H₂O 100 mg, CuSO₄·5H₂O 20 mg, MnSO₄·H₂O 120 mg, MgSO₄·H₂O 1352 mg, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 6000 mg, NaCl 200 mg, Zeolite powder 11942.4 mg

SPASS 25.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 所得数据用“平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示, 若组间差异显著, 再采用 Duncan 氏法进行多重比较分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果

2.1 饲料中硒含量对卵形鲳鲹生长性能的影响

由表 2 可知, 随着饲料中硒含量的增加, 卵形鲳鲹的终末体重、WGR 和 SGR 先升高后保持稳定, 且 0.41 mg/kg 组的终末体重、WGR 和 SGR 均显著低于其他各组($P < 0.05$)。FCR 随饲料中硒含量的增加先降低后趋于稳定, 0.41 mg/kg 组的 FCR 显著高于 0.80、0.90 和 1.12 mg/kg 组($P < 0.05$)。饲料中硒含量对卵形鲳鲹的 CF、VSI 和 HSI 均无显著影响($P > 0.05$)。以 WGR

为评价指标, 通过折线回归分析得出卵形鲳鲹饲料中最适硒含量为 0.66 mg/kg (图 1)。

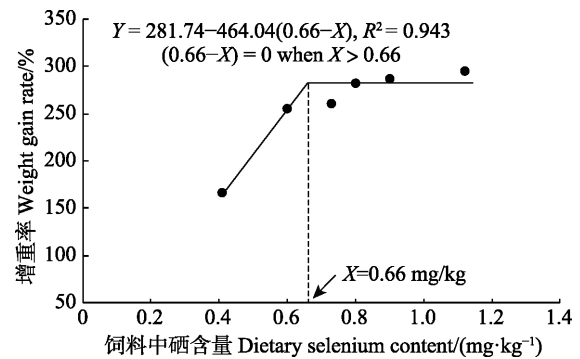


图 1 卵形鲳鲹增重率与饲料中硒含量的关系

Fig.1 Relationship between dietary selenium content and weight gain rate of golden pompano

表 2 饲料中硒含量对卵形鲳鲹生长性能的影响

Tab.2 Effects of dietary selenium content on growth performance of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
初始体重 Initial weight (g)	15.12±0.18	15.00±0.26	15.19±0.11	14.92±0.16	15.02±0.21	14.98±0.27
终末体重 Final weight (g)	40.15±4.33 ^a	53.30±2.06 ^b	54.78±8.01 ^b	57.07±2.15 ^b	58.16±2.27 ^b	59.14±1.86 ^b
增重率 WGR (%)	165.39±26.63 ^a	255.33±8.86 ^b	260.81±55.38 ^b	282.64±17.57 ^b	287.31±18.91 ^b	295.13±19.86 ^b
特定生长率 SGR (%/d)	1.94±0.20 ^a	2.53±0.05 ^b	2.55±0.30 ^b	2.68±0.09 ^b	2.71±0.10 ^b	2.75±0.10 ^b
饲料系数 FCR	2.81±0.31 ^a	2.57±0.22 ^{ab}	2.55±0.11 ^{ab}	2.40±0.11 ^b	2.42±0.06 ^b	2.35±0.07 ^b
肥满度 CF	3.49±0.14	3.72±0.10	3.62±0.15	3.66±0.19	3.69±0.17	3.77±0.11
脏体比 VSI (%)	6.92±0.05	6.80±0.12	6.54±0.24	6.55±0.27	6.74±0.06	6.84±0.36
肝体比 HSI (%)	1.63±0.15	1.68±0.23	1.50±0.03	1.45±0.09	1.47±0.05	1.47±0.07

注: 同行数据上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$), 下同

Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), the same as below

表 3 饲料中硒含量对卵形鲳鲹全鱼体成分的影响

Tab.3 Effects of dietary selenium content on the whole body composition of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
水分 Moisture (%)	69.25±1.02	68.00±1.01	68.87±1.46	68.32±0.52	68.91±1.51	68.18±0.77
粗蛋白 Crude protein (%)	52.29±1.61	52.63±1.55	53.60±0.52	52.55±0.85	51.49±2.69	52.67±1.35
粗脂肪 Crude lipid (%)	34.76±3.20	35.71±3.16	34.93±1.14	35.71±0.68	37.46±1.14	36.04±2.31
灰分 Ash (%)	13.23±1.44	11.44±0.76	12.77±1.43	12.26±0.46	11.37±0.67	11.75±1.18

2.2 饲料中硒含量对卵形鲳鲹全鱼体成分的影响

由表 3 可知, 随着饲料中硒含量的增加, 各组间卵形鲳鲹鱼体的水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 饲料中硒含量对卵形鲳鲹血清生化指标的影响

由表 4 可知, 血清白蛋白(ALB)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量均随饲料中硒含量的增加呈先上升后下降的趋势, 且 0.73 mg/kg 组的血清 ALB 含

量和 0.90 mg/kg 组的血清 HDL-C 含量显著高于 0.41 mg/kg 组 ($P<0.05$)。0.41 和 0.60 mg/kg 组的血清碱性磷酸酶(ALP)活性显著低于其他各组 ($P<0.05$), 其活性随饲料中硒含量的增加先升高后趋于稳定。饲料中硒含量对血清总蛋白(TP)和总胆固醇(TCHO)含量无显著影响 ($P>0.05$)。

2.4 饲料中硒含量对卵形鲳鲹血清抗氧化指标的影响

由表 5 可知, 随着饲料中硒含量的增加, 血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性先升高后趋于稳定, 且 0.41 mg/kg 组的血清 GSH-PX 活性显著低于其他各组 ($P<0.05$)。血清超氧化物歧化酶(SOD)活性随饲料中硒含量的增加呈先升高后降低的趋势, 0.73 mg/kg 组的血清 SOD 活性除了与 0.60 mg/kg 组没有显著性差异 ($P>0.05$)外, 均显著高于其他各组

($P<0.05$)。以血清 GSH-PX 活性为评价指标, 通过折线回归分析得出卵形鲳鲹饲料中最适硒含量为 0.82 mg/kg (图 2)。

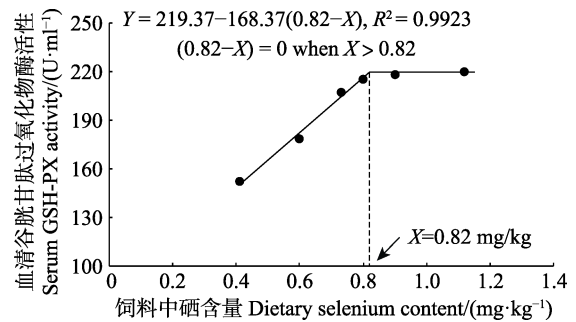


图 2 卵形鲳鲹血清谷胱甘肽过氧化物酶活性与饲料中硒含量的关系

Fig.2 Relationship between dietary selenium content and serum GSH-PX activity of golden pompano

表 4 饲料中硒含量对卵形鲳鲹血清生化指标的影响

Tab.4 Effects of dietary selenium content on serum biochemical indexes of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
总蛋白 TP (g/L)	41.97±5.25	45.13±2.31	47.25±2.65	45.95±2.55	42.80±2.00	42.60±1.10
白蛋白 ALB (g/L)	9.83±0.93 ^a	11.03±0.95 ^{ab}	11.95±0.85 ^b	11.37±1.31 ^{ab}	11.00±0.20 ^{ab}	10.60±0.10 ^{ab}
碱性磷酸酶活性 ALP activity (U/L)	59.00±9.64 ^a	61.33±4.16 ^a	75.00±5.29 ^b	74.67±8.08 ^b	73.33±4.93 ^b	74.00±1.00 ^b
总胆固醇 TCHO (mmol/L)	3.05±0.21	3.42±0.12	3.53±0.38	3.51±0.49	3.68±0.45	3.44±0.33
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	2.20±0.17 ^a	2.42±0.29 ^{ab}	2.40±0.11 ^{ab}	2.42±0.15 ^{ab}	2.59±0.20 ^b	2.41±0.16 ^{ab}

表 5 饲料中硒含量对卵形鲳鲹血清抗氧化相关酶活性的影响

Tab.5 Effects of dietary selenium content on serum antioxidant enzyme activity of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
谷胱甘肽过氧化物酶活性 GSH-PX activity (U/ml)	151.77±1.56 ^a	178.40±20.81 ^b	207.36±17.33 ^c	215.56±8.06 ^c	218.34±16.18 ^c	220.17±15.42 ^c
超氧化物歧化酶活性 SOD activity (U/ml)	43.25±2.57 ^a	49.58±4.28 ^{ab}	55.66±2.76 ^b	45.71±4.36 ^a	44.17±2.48 ^a	45.19±4.02 ^a

2.5 饲料中硒含量对卵形鲳鲹肝脏抗氧化指标的影响

由表 6 可知, 饲料中不同硒含量显著影响了卵形鲳鲹肝脏 GSH-PX、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、谷胱甘肽还原酶(GR)和过氧化氢酶(CAT)的活性 ($P<0.05$)。随着饲料中硒含量的增加, 肝脏 GSH-PX、GST 和 CAT 活性先升高后保持稳定, 其中, 0.41 mg/kg 组的肝脏 GSH-PX 活性显著低于其他各组 ($P<0.05$), 0.41 和 0.60 mg/kg 组的肝脏 GST 和 CAT 活性显著低于其他各组 ($P<0.05$)。肝脏 GR 活性随饲料中硒含量的增加呈先上升后下降的趋势, 其活性在 0.60 mg/kg 组达

到峰值并显著高于其他各组 ($P<0.05$)。

2.6 饲料中硒含量对卵形鲳鲹全鱼和脊椎骨中硒含量的影响

由表 7 可知, 全鱼中硒含量随着饲料中硒含量的增加先升高后保持稳定, 且 0.41 mg/kg 组全鱼硒含量除了与 0.60 mg/kg 组差异不显著 ($P>0.05$)外, 均显著低于其他各硒添加组 ($P<0.05$)。饲料中硒含量对脊椎骨中硒含量的影响不显著 ($P>0.05$)。以全鱼中硒含量为评价指标, 通过折线回归分析得出卵形鲳鲹饲料中最适硒含量为 0.76 mg/kg (图 3)。

表 6 饲料中硒含量对卵形鲳鲆肝脏抗氧化相关酶活性的影响
Tab.6 Effects of dietary selenium content on liver antioxidant enzyme activity of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
谷胱甘肽过氧化物酶活性 GSH-PX activity (U/mg prot)	7.68±0.25 ^a	15.93±0.84 ^b	17.77±1.34 ^b	18.57±2.21 ^b	22.63±2.28 ^c	23.13±2.19 ^c
谷胱甘肽硫转移酶活性 GST activity (U/mg prot)	29.44±0.69 ^a	30.74±2.05 ^a	35.67±3.05 ^b	36.12±2.35 ^b	39.71±0.11 ^c	40.25±1.38 ^c
谷胱甘肽还原酶活性 GR activity (U/g prot)	1.63±0.02 ^a	1.96±0.16 ^b	1.72±0.03 ^a	1.69±0.08 ^a	1.63±0.09 ^a	1.63±0.07 ^a
过氧化氢酶活性 CAT activity (U/mg prot)	85.22±5.02 ^a	95.19±1.75 ^a	123.58±5.56 ^b	115.73±13.28 ^b	117.47±0.48 ^b	114.71±2.99 ^b

表 7 饲料中硒含量对卵形鲳鲆全鱼和脊椎骨中硒含量的影响
Tab.7 Effects of dietary selenium content on selenium concentrations in whole body and vertebrae of golden pompano

指标 Parameters	饲料中硒含量 Dietary selenium content (mg/kg)					
	0.41	0.60	0.73	0.80	0.90	1.12
全鱼中硒含量 Whole body selenium concentration (mg/kg)	0.24±0.03 ^a	0.34±0.01 ^{ab}	0.41±0.09 ^b	0.43±0.07 ^b	0.43±0.06 ^b	0.41±0.08 ^b
脊椎骨中硒含量 Vertebrae selenium concentration (mg/kg)	0.08±0.00	0.10±0.00	0.09±0.02	0.10±0.02	0.10±0.01	0.10±0.02

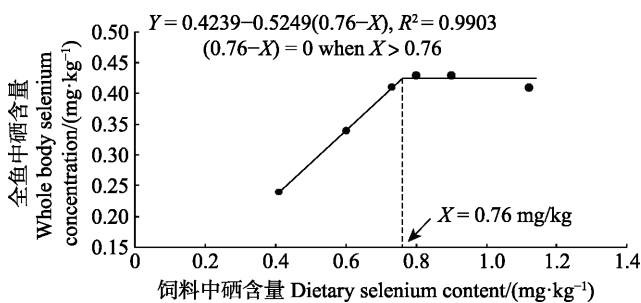


图 3 卵形鲳鲆全鱼中硒含量与饲料中硒含量的关系
Fig.3 Relationship between dietary selenium content and whole body selenium concentration of golden pompano

3 讨论

饲料中添加硒可促进鱼类生长。本实验结果显示,随着饲料中硒含量的增加,卵形鲳鲆的增重率和特定生长率先升高后保持稳定,这与大黄鱼(曹娟娟等, 2015)、异育银鲫(Han *et al*, 2011)和军曹鱼(Liu *et al*, 2010)的研究报道相似。饲料中添加硒不仅可以改善鱼类生长性能,还可提高其饲料利用率。本研究中,饲料系数随饲料中硒水平的上升先降低后稳定在一定水平,这与军曹鱼(Liu *et al*, 2010)的研究结果相吻合。这是因为硒不仅可以提高动物机体的抗氧化、抗应激和免疫能力,而且硒还是 5'-脱碘酶的组成部分,介导甲状腺素的合成与代谢,催化 T4 转化成 T3,而 T3 控制着生长激素的基因表达及合成,有利于动物

的生长发育(谢帝芝等, 2010)。然而在尼罗罗非鱼(Lee *et al*, 2016)、石斑鱼(Lin *et al*, 2005)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (胡俊茹等, 2016)的研究中发现,饲料中添加硒也可显著提高其增重率和饲料效率,不同的是随着饲料中硒含量的增加,增重率和饲料效率呈先升高后降低的趋势,造成这种差异显示了硒营养和毒性的双重效应(Wang *et al*, 2012),再加上不同种类对硒的耐受程度不同所导致。Seko 等(1989)认为过量硒可能会攻击特定的脱氢酶系统,并且硒化合物浓度过高会产生自由基而对动物组织造成氧化损伤,从而影响动物的正常生长发育。

饲料中不同硒水平对不同鱼种全鱼体成分存在较大差异。饲料中硒含量显著影响了黄颡鱼(胡俊茹等, 2016)鱼体的水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量,且粗脂肪含量随饲料中硒含量的增加呈先升高后稳定的趋势;而在绿鲟(*Acipenser medirostris*)和白鲟(*Acipenser transmontanus*) (Riu *et al*, 2014)的研究中发现,其全鱼粗脂肪含量随饲料中硒水平的上升呈下降趋势,这可能是因为硒与动物体脂肪的代谢有关。本研究中,饲料中硒含量对卵形鲳鲆鱼体的水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量影响不显著,与曹娟娟等(2015)的研究结果相似。

血清生化指标可以反映鱼体的正常生理状态、健康状况和营养水平(韩娜娜等, 2010)。血清白蛋白(ALB)由肝脏合成,对维持血液胶体渗透压、运输小

分子物质、修补组织及清除自由基等具有重要作用(Ahmed *et al.*, 2002; 张敏, 2011)。本研究中,血清 ALB 含量随饲料中硒水平的上升呈先升高后降低的趋势,这说明饲料中适宜硒含量可提高肝脏合成 ALB 的能力,但硒含量过高可能会对鱼体的肝功能造成损害。碱性磷酸酶(ALP)是一种磷酸单脂水解酶,其活性可以反映鱼体非特异性免疫能力的水平(Prabhu *et al.*, 2016; 张媛媛等, 2012)。本研究结果显示,随着饲料中硒含量的增加,血清 ALP 活性先上升后趋于稳定,这可能是因为硒对于增强鱼体的非特异性免疫功能具有一定程度的促进作用。高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)主要是由肝脏合成,可将血液中多余的血脂和胆固醇转运到肝脏并分解(吴凡等, 2011),起到清除血液垃圾的作用。本研究中,饲料中添加硒可以显著提高血清 HDL-C 的含量,有利于鱼体血脂的代谢,但随着饲料中硒水平进一步升高,血清 HDL-C 含量呈下降趋势,与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) (李宁等, 2017)的研究报道相似,这可能是由于饲料中较高硒含量会对机体肝脏造成不同程度的损伤,降低肝脏对 HDL-C 的合成能力,从而不利于血液垃圾的清除,进而影响鱼体健康。

硒影响鱼类的抗氧化能力是其重要作用之一。饲料中硒不足,可导致草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (苏传福, 2008)血清和肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性明显降低。饲料中适宜硒水平可显著提高大口黑鲈(李宁等, 2017)血清和肝脏 GSH-PX、谷胱甘肽硫转移酶(GST)和 SOD 活性。GSH-PX 能将体内多余的过氧化物清除掉,以保护机体免受其氧化损伤(张滕闲等, 2017)。SOD 能清除体内氧自由基以起到对机体的防御保护作用(王丽丽等, 2019)。本研究中,饲料中添加硒显著提高了血清 GSH-PX 活性,这与军曹鱼(Liu *et al.*, 2010)的报道相似。随着饲料中硒含量的增加,血清 SOD 活性呈先上升后下降的趋势,与大黄鱼(曹娟娟等, 2015)和鲈鱼(谈枫等, 2015)的研究结果类似,这是因为 SOD 是一种含金属元素的蛋白酶,而饲料中较高硒水平可能影响了机体对金属元素的吸收利用,从而降低其活性。GST 属于抗氧化酶之一,可通过修复自由基造成的细胞膜磷脂损伤和抑制微粒体的过氧化反应等多种途径来发挥其抗氧化作用(冯欣等, 2010)。谷胱甘肽还原酶(GR)能清除在氧化胁迫反应中所产生的活性氧自由基(张新党等, 2018)。过氧化氢酶(CAT)通过参与活性氧的代谢能使机体内的功能性大分子物质免受其氧化损伤(谭连杰等, 2019)。本研究中,肝脏 GSH-PX 活性随饲料中硒含量的增加先升高后保持稳定,这一结果与石斑鱼

(Lin *et al.*, 2005)和军曹鱼(Liu *et al.*, 2010)等诸多研究报道相似。饲料中添加硒也可显著提高肝脏 GST 和 CAT 活性,且随着饲料中硒水平的上升,其活性先升高后趋于稳定。肝脏 GR 活性随饲料中硒含量的增加呈先上升后下降的趋势,这与大黄鱼(曹娟娟等, 2015)的研究报道相吻合。以上结果表明,饲料中适宜硒含量可通过提高 GSH-PX、GST、GR、CAT 和 SOD 等抗氧化酶的活性来清除体内的活性氧和自由基,进而提高卵形鲳鲹的抗氧化能力以起到保护机体的作用。

硒在体内沉积对满足鱼体营养需要和氧化应激生理状态下的快速利用具有重要意义(张清雯等, 2018)。本实验结果显示,饲料中添加硒可显著提高全鱼中的硒含量,且随着饲料中硒水平的上升,其含量先增加后趋于稳定,此结果与大黄鱼(曹娟娟等, 2015)和军曹鱼(Liu *et al.*, 2010)的报道相吻合。饲料中硒水平不会显著影响卵形鲳鲹脊椎骨中的硒含量,这可能是因为脊椎骨中硒含量对饲料中硒添加水平不太敏感,或者更多的硒被储存在其他组织,如肝脏(Le *et al.*, 2014)和肌肉(Lin, 2014)等,因此,增加饲料中的硒含量并不会使硒在其脊椎骨中沉积。

通过对卵形鲳鲹增重率、血清 GSH-PX 活性和全鱼中硒含量进行评估,得出卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量分别为 0.66、0.82 和 0.76 mg/kg,与石斑鱼(Lin *et al.*, 2005)、鲈鱼(谈枫等, 2015)、军曹鱼(Liu *et al.*, 2010)和条纹锯鲷(张清雯等, 2018)的硒需求量相接近,低于异育银鲫(Han *et al.*, 2011)、黄尾鲷(Le *et al.*, 2013)和尼罗罗非鱼(Lee *et al.*, 2016),高于虹鳟(Hilton *et al.*, 1980)和大黄鱼(曹娟娟等, 2015)。

4 结论

饲料中添加硒可以改善卵形鲳鲹的生长性能和血清生化指标,并能提高机体的抗氧化能力和鱼体硒沉积量。以增重率、血清 GSH-PX 活性和全鱼中硒含量为评价指标,得出卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量分别为 0.66、0.82 和 0.76 mg/kg。

参 考 文 献

- Ahmed AF, Constable PD, Misk NA. Effect of feeding frequency and route of administration on abomasal luminal pH in dairy calves fed milk replacer. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(6): 1502–1508
- Cao JJ, Zhang WB, Xu W, *et al.* Dietary selenium requirement of juvenile large yellow croaker *Larimichthys croceus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 241–249 [曹娟娟,

- 张文兵, 徐玮, 等. 大黄鱼幼鱼对饲料硒的需求量. 水生生物学报, 2015, 39(2): 241–249]
- Du Q. Dietary lysine and methionine requirements and substitution of fish meal in diets for juvenile *Trachinotus ovatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012, 1–58 [杜强. 卵形鲳鲹赖氨酸和蛋氨酸需求量及饲料中鱼粉替代的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–58]
- Duan LL. The physiological function of selenium and the development of selenium-rich health food. Modern Food, 2018, 1(14): 42–45 [段亮亮. 硒的生理功能和富硒保健食品开发. 现代食品, 2018, 1(14): 42–45]
- Fang RJ, Yang KL. The antioxidant and immune effects of selenium and its metabolic regulation pathway. Feed Industry, 2018, 39(23): 1–7 [方热军, 杨凯丽. 硒的抗氧化和免疫作用及其代谢调控途径. 饲料工业, 2018, 39(23): 1–7]
- Feng X, Du Y, Pan K, et al. Glutathione S-transferases and its oxidative stress. Medical Research and Education, 2010, 27(5): 80–83 [冯欣, 杜宇, 潘坤, 等. 谷胱甘肽硫转移酶与氧化应激. 医学研究与教育, 2010, 27(5): 80–83]
- Han D, Xie S, Liu M, et al. The effects of dietary selenium on growth performances, oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquaculture Nutrition, 2011, 17(3): e741–e749
- Han NN, Shi CY. The application of blood indexes in ichthyological research. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(33): 18877–18878, 18880 [韩娜娜, 史成银. 血液指标在鱼类学研究中的应用. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18877–18878, 18880]
- Hilton JW, Hodson PV, Slinger SJ. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Journal of Nutrition, 1980, 110(12): 2527–2535
- Hu JR, Wang GX, Sun YP, et al. Effects of dietary selenium content on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism gene expression of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(12): 3925–3934 [胡俊茹, 王国霞, 孙育平, 等. 饲料硒含量对黄颡鱼幼鱼生长性能、抗氧化能力和脂肪代谢基因表达的影响. 动物营养学报, 2016, 28(12): 3925–3934]
- Huang QQ, Lin HZ, Zhou CP, et al. Vitamin B₂ requirement of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). South China Fisheries Science, 2019, 15(1): 69–76 [黄倩倩, 林黑着, 周传朋, 等. 卵形鲳鲹幼鱼对维生素 B₂ 的需要量. 南方水产科学, 2019, 15(1): 69–76]
- Huang Z, Tan XH, Zhou CP, et al. Effect of dietary valine levels on the growth performance, feed utilization and immune function of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. Aquaculture Nutrition, 2018, 24(1): 74–82
- Le KT, Fotedar R. Dietary selenium requirement of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Agricultural Sciences, 2013, 4(6): 68–75
- Le KT, Fotedar R. Toxic effects of excessive levels of dietary selenium in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Aquaculture, 2014, 433: 229–234
- Lee S, Nambi RW, Won S, et al. Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 2016, 464: 153–158
- Li N, Zheng YH, Wu XF, et al. Tolerance of selenium-yeast in diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(6): 1949–1960 [李宁, 郑银桦, 吴秀峰, 等. 大口黑鲈对饲料中酵母硒的耐受性研究. 动物营养学报, 2017, 29(6): 1949–1960]
- Lin YH. Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth, selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture, 2014, 430: 114–119
- Lin YH, Shiao SY. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture, 2005, 250(1–2): 356–363
- Liu K, Wang XJ, Ai QH, et al. Dietary selenium requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. Aquaculture Research, 2010, 41(10): e594–e601
- Liu XW, Xu D, Zhang HT, et al. Optimal dietary protein requirement for juvenile *Trachinotus ovatus*. South China Fisheries Science, 2011, 7(1): 45–49 [刘兴旺, 许丹, 张海涛, 等. 卵形鲳鲹幼鱼蛋白质需要量的研究. 南方水产科学, 2011, 7(1): 45–49]
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D C: National Academy Press, 2011
- Prabhu PAJ, Schrama JW, Kaushik SJ. Mineral requirements of fish: A systematic review. Reviews in Aquaculture, 2016, 8(2): 172–219
- Qi CL. The study on effects of dietary LNA, ARA, DHA and EPA levels on growth performance and immunity of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 1–63 [戚常乐. LNA、ARA、DHA 和 EPA 对卵形鲳鲹幼鱼生长及免疫影响的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 1–63]
- Riu ND, Lee JW, Huang SSY, et al. Effect of dietary selenomethionine on growth performance, tissue burden, and histopathology in green and white sturgeon. Aquatic Toxicology, 2014, 148: 65–73
- Seko Y, Saito Y, Kitahara J, et al. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. Selenium in Biology and Medicine, 1989, 70–73
- Su CF. Studies on dietary selenium requirements of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon ideelus*. Master's Thesis of Southwest University, 2008, 1–51 [苏传福. 草鱼幼鱼硒的营养需要研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2008, 1–51]
- Tan F, Liang MQ, Zheng KK, et al. The requirement of dietary selenium at the middle growth stage of Japanese seabass

- (*Lateolabrax japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 93–100 [谈枫, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 养殖中期对饲料硒的需求量. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 93–100]
- Tan LJ, Lin HZ, Huang Z, *et al.* Effects of *lycium barbarum* polysaccharide on growth performance, antioxidant capacity, serum immune and biochemical indexes of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(1): 418–427 [谭连杰, 林黑着, 黄忠, 等. 枸杞多糖对卵形鲳鲹生长性能、抗氧化能力及血清免疫、生化指标的影响. *动物营养学报*, 2019, 31(1): 418–427]
- Tan XH. Assessment of arginine and leucine requirement for juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 1–58 [谭小红. 卵形鲳鲹幼鱼对饲料中精氨酸和亮氨酸需求量的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 1–58]
- Wang F. Study on the optimum protein and lipid requirement and supplementation with animal and plant ingredient in feeds for golden pompano *Trachinotus ovatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012, 1–49 [王飞. 卵形鲳鲹饲料最适蛋白和脂肪需求及添加不同动植物原料的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–49]
- Wang LL, Li BS, Wang JY, *et al.* Effects of dietary vitamin D₃ on growth performance, body composition, and antioxidant capacity of the juvenile sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 110–118 [王丽丽, 李宝山, 王际英, 等. 维生素 D₃ 对仿刺参幼参生长、体组成及抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 110–118]
- Wang WF, Mai KS, Zhang WB, *et al.* Dietary selenium requirement and its toxicity in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 2012, 330–333: 42–46
- Wu F, Wen H, Jiang M, *et al.* Effects of different dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition and serum biochemical indices of juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *Journal of South China Agricultural University*, 2011, 32(4): 91–95 [吴凡, 文华, 蒋明, 等. 饲料碳水化合物水平对奥尼罗非鱼幼鱼生长、体成分和血清生化指标的影响. *华南农业大学学报*, 2011, 32(4): 91–95]
- Xie DZ, Liu Z, Xiao DY, *et al.* Study on selenium in aquatic animal nutrition. *Hunan Feed*, 2010(6): 30, 34–36 [谢帝芝, 刘臻, 肖调义, 等. 硒元素在水产动物营养中的研究. *湖南饲料*, 2010(6): 30, 34–36]
- Xun PW, Lin HZ, Huang Z, *et al.* Dietary pantothenic acid requirement of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *South China Fisheries Science*, 2018, 14(5): 80–87 [荀鹏伟, 林黑着, 黄忠, 等. 卵形鲳鲹对饲料中泛酸的需求量. *南方水产科学*, 2018, 14(5): 80–87]
- Xun PW, Lin HZ, Wang RX, *et al.* Effects of dietary vitamin B₁ on growth performance, intestinal digestion and absorption, intestinal microflora and immune response of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture*, 2019, 506: 75–83
- Zhang M. Physiological functions and clinical applications of human albumin. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2011, 33(1): 36–38 [张敏. 人血浆白蛋白的生理功能及临床应用. *四川生理科学杂志*, 2011, 33(1): 36–38]
- Zhang QW, Chen C, Shao YX, *et al.* Effects of selenomethionine on growth performance, tissue selenium content, antioxidant capacity and serum biochemical indices of *centropomus striata*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(11): 4746–4756 [张清雯, 陈超, 邵彦翔, 等. 硒代蛋氨酸对条纹锯鲷生长性能、组织硒含量、抗氧化能力及血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(11): 4746–4756]
- Zhang TX, Chen Q, Zhang BL, *et al.* The effects of curcumin on the growth, digestion and antioxidant ability of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 56–63 [张滕闲, 陈钱, 张宝龙, 等. 姜黄素对黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 生长、消化与抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 56–63]
- Zhang XD, Zhang X, Tao LL, *et al.* Effects of fish oil replacement by rubber seed oil on growth performance, digestive enzyme activity, lipoprotein content and antioxidant capacity of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(3): 1007–1018 [张新党, 张曦, 陶琳丽, 等. 橡胶籽油替代鱼油对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、消化酶活性、脂蛋白含量和抗氧化功能的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(3): 1007–1018]
- Zhang YY, Liu B, Ge XP, *et al.* Effect of dietary oil sources on growth performance, body composition, the serum biochemical indices, fatty acids composition and lipid metabolism of *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1111–1118 [张媛媛, 刘波, 戈贤平, 等. 不同脂肪源对异育银鲫生长性能、机体成分、血清生化指标、体组织脂肪酸组成及脂质代谢的影响. *水产学报*, 2012, 36(7): 1111–1118]
- Zhou CP, Ge XP, Niu J, *et al.* Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 2015, 437: 390–397

Dietary Selenium Requirement of Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*)

YU Wanfeng^{1,2}, LIN Heizhao^{2,3}①, HUANG Zhong^{2,3}, YU Wei^{2,3}, ZHOU Chuanpeng²,
TAN Lianjie^{1,2}, XUN Pengwei^{1,2}, HUANG Qianqian^{1,2}, HUANG Xiaolin^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 3. Shenzhen Base of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shenzhen 518121)

Abstract To determine the optimal dietary selenium requirement of golden pompano (*Trachinotus ovatus*), a total of 450 fish with an initial body weight of (15.04±0.20) g were randomly assigned into 6 groups with 3 replicates per group and 25 fish per replicate. The fish were fed isonitrogenous and isolipidic diets with sodium selenite (Na₂SeO₃) as the selenium source for 50 days, which the selenium contents were 0.41, 0.60, 0.73, 0.80, 0.90 and 1.12 mg/kg, respectively. The results showed that weight gain rate and specific growth rate firstly increased and then remained stable with the increased dietary selenium content, while the feed conversion ratio had an opposite trend. No significant difference was found in the whole body composition ($P>0.05$). In serum, with the dietary selenium levels increasing, the contents of albumin and high density lipoprotein cholesterol firstly increased and then decreased, while the activity of alkaline phosphatase increased and then remained stable. The selenium in the feed had significant effects on the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in the serum, and glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, catalase in the liver ($P<0.05$). As the dietary selenium levels increased, the activities of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and catalase firstly increased and then remained stable, whereas the activities of superoxide dismutase and glutathione reductase increased and then decreased. The selenium levels in feed significantly affected the selenium concentration in the whole body ($P<0.05$), as the dietary selenium content increased, whole body selenium concentration increased and then remained stable. Broken-line regression analysis based on the weight gain rate, serum glutathione peroxidase activity and whole body selenium concentration indicate that the optimal dietary selenium requirements for golden pompano are 0.66, 0.82 and 0.76 mg/kg, respectively.

Key words *Trachinotus ovatus*; Selenium; Requirement; Growth performance; Antioxidant capacity

① Corresponding author: LIN Heizhao, E-mail: linheizhao@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190314003

http://www.yykxjz.cn/

蓝军南, 温久福, 李俊伟, 区又君, 周慧, 李加儿, 李活. 四指马鲛淋巴器官发育组织学观察. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 70-77

Lan JN, Wen JF, Li JW, Ou YJ, Zhou H, Li JE, Li H. Histological observations on the early development of lymphoid organs in *Eleutheronema tetradactylum*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 70-77

四指马鲛淋巴器官发育组织学观察*



蓝军南^{1,2} 温久福¹ 李俊伟¹ 区又君^{1①} 周 慧¹ 李加儿¹ 李 活³

(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. 茂名市金阳热带海珍养殖有限公司 茂名 525444)

摘要 采用石蜡组织连续切片和 HE 染色技术, 对 1~60 dph (Days post hatching) 四指马鲛 (*Eleutheronema tetradactylum*) 的淋巴器官个体发育进行研究, 描述了淋巴器官发育特点及组织学特征。结果显示, 在盐度为 9.0 ± 0.5 , 水温为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下, 3 dph 胸腺原基出现, 由 4~6 层未分化干细胞和淋巴母细胞样的细胞组成; 胸腺发育迅速, 主要由淋巴细胞填充; 至 25 dph 皮质区和髓质区分明显, 胸腺发育基本完成。3 dph 头肾原基形成, 由前肾管和少量造血干细胞组成; 5 dph 胸腺淋巴细胞向头肾迁移, 头肾开始淋巴化; 随着鱼体生长, 造血干细胞分化成不同类型细胞; 18 dph 前肾管开始退化, 至 53 dph 完全消失, 头肾主要由网状内皮系统支持下的淋巴造血组织构成。7 dph 脾脏原基形成, 至 16 dph 开始淋巴化; 脾脏内皮系统较头肾发达, 但其发育速度较胸腺和头肾慢, 淋巴细胞明显少于胸腺和头肾。研究表明, 四指马鲛淋巴器官原基出现及淋巴化的顺序是胸腺、头肾、脾脏。免疫淋巴器官结构及功能尚未发育完善, 可能是四指马鲛在变态期间幼体死亡率高的主要原因之一。

关键词 四指马鲛; 淋巴器官; 发育; 组织学

中图分类号 Q954.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0070-08

鱼类的淋巴器官主要包括胸腺、头肾、脾脏以及黏膜相关的淋巴组织(Boehm *et al*, 2012), 黏膜相关淋巴组织包括鼻咽、内脏、鳃和皮肤相关淋巴组织, 它们通过细胞和体液介导途径参与继发性淋巴免疫反应。胸腺是大多数鱼类最早发育的中枢淋巴器官, 它

在鱼类胚胎发育早期就已经形成并发挥作用, 胸腺为 T 细胞的增殖、成熟和抗原受体库的生成提供了适宜的微环境(Nakanishi *et al*, 2015), 同时, 产生促淋巴细胞生成素以促进其他淋巴器官的淋巴细胞生成(Fishelson, 2006)。头肾和脾脏是主要的免疫及造血器

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900200)、广东省“扬帆计划”引进创新创业团队项目(2016YT03H038)、广东省省级科技计划项目(2017B020204002)和广东省现代农业产业技术体系(海水鱼产业)创新团队建设专项资金(2019KJ143)共同资助 [This work was supported by Special Fund for "Blue Granary Science and Technology Innovation" of National Key Research and Development Program (2018YFD0900200), Guangdong "Yang Fan" Innovative & Entrepreneurial Research Team Program (2016YT03H038), Provincial Science and Technology Project of Guangdong Province (2017B020204002), and Guangdong Provincial Special Fund For Modern Agriculture Industry Technology (Marine Fish Industry) Innovation Teams (2019KJ143)]. 蓝军南, E-mail: ljn009@126.com

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

收稿日期: 2019-03-14, 收修改稿日期: 2019-04-03

官, 含有丰富的血管、血窦和免疫细胞(胡玲玲等, 2010)。其免疫细胞介导并参与免疫反应, 尤其吞噬细胞(黑色素-巨噬细胞和粒细胞)是免疫系统的重要组成部分, 具有趋化、吞噬、细胞因子分泌、抗原处理以及通过多种机制表达来清除病原体的作用(Espinosa *et al*, 2018; 邢贺飞等, 2016)。免疫淋巴器官是鱼类防止病原入侵的主要防线, 研究免疫淋巴器官的发生发育可了解机体免疫活性建立的时间节点, 对优化养殖条件、完善苗种培育和健康养殖技术具有重要意义(Campoverde *et al*, 2019)。近年来, 国内外越来越多的学者针对鱼类免疫淋巴器官的发生发育开展研究, 如在大西洋白姑鱼(*Argyrosomus regius*)、考氏鳍竺鲷(*Pterapogon kauderni*)、斑马鱼(*Barchydanio rerio var*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等多种鱼类已见报道(Campoverde *et al*, 2019; Fishelson, 2010; Danilova *et al*, 2004; Liu *et al*, 2004; 雷雪彬等, 2013; 吴金英等, 2003)。

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)俗称马友、午鱼、午笋等, 通常分布于热带和温带海区, 主要分布于印度洋和太平洋西部, 在我国黄海、东海、南海和渤海均有分布(Moore *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014)。其肉质鲜美, 营养价值高, 具有良好的养殖前景。2012年我国规模化全人工繁育和养殖四指马鲛属鱼类获得成功, 近年来先后在广东、海南、福建、广西、上海、江苏、山东、浙江、河北等沿海地区开展了养殖技术推广应用, 四指马鲛已成为海水鱼类养殖的新品种(林先智等, 2015)。目前, 四指马鲛苗种培育和养殖技术已经成功, 但在仔稚鱼变态发育阶段常出现大量死亡现象, 同时, 在成鱼养殖过程中对应激反应比较敏感, 容易因手工操作受伤死亡, 其中原因需要进一步研究(刘奇奇等, 2017)。鱼类淋巴器官对病害具有重要的免疫作用, 关于四指马鲛淋巴器官发生发育的研究目前在国内外尚未见报道。本研究采用石蜡组织连续切片和HE染色技术对人工培育的四指马鲛淋巴器官发育进行研究, 试从免疫器官发育的角度推测机体免疫活性建立的时间, 并观察淋巴器官发育过程中组织形态学特点, 以丰富四指马鲛的基础生物学资料, 为其苗种培育和成鱼健康养殖提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的四指马鲛仔稚鱼为2018年6~9月在中国水产科学研究院南海水产研究所珠海试验基地培育所得。

1.2 实验方法

鱼苗孵化及培育参考区又君等(2017)的方法进行。孵化后2 dph (Days post hatching, dph)将鱼苗置于1000 L白色塑料桶中培育, 放苗前, 水桶中预先接种小球藻和轮虫, 每天添加淡水降低盐度0.5~1, 直到盐度降至 9.0 ± 0.5 。培育水温为 $(28\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。7 dph投喂枝角类和桡足类幼体, 25 dph起投喂卤虫无节幼体, 30 dph起投喂粉状配合饲料并逐渐过渡到人工颗粒饲料。1~18 dph, 每天取样1次; 20~45 dph, 每5 d取样1次; 45~60 dph, 每7 d取样1次, 每次取15尾。取样时, 记录鱼苗日龄, 并用数显游标卡尺(精确度0.01 mm)测量全长, 置于4%多聚甲醛中固定, 24 h后转入70%的乙醇中保存。参考马定昌等(2014)的方法并稍作调整, 将固定好的样品进行流水冲洗12 h, 经50%~100%梯度乙醇脱水(50%乙醇2 h、70%乙醇4 h、80%乙醇2 h、85%乙醇2 h、95%乙醇45 min \times 2、100%乙醇45 min \times 2), 二甲苯透明(1/2无水乙醇+1/2二甲苯混合液1 h、二甲苯15 min \times 2), 浸蜡(石蜡2 h \times 2), 石蜡包埋, 以4~6 μm 的厚度进行纵向连续切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 中性树脂封片, 在ZEISS Axio Scope. A1型光学显微镜(德国)下观察并摄影记录。

2 结果

2.1 胸腺

3 dph, 胸腺原基开始形成, 位于鳃盖骨背上角处, 由4~6层未分化干细胞和淋巴母细胞样的细胞组成, 细胞较大, 圆形或椭圆形, 嗜碱性, 核大且深染, 原基外缘上皮鞘尚未形成(图1A)。6 dph, 胸腺个体增大, 呈长椭圆形, 胸腺细胞增多, 染色加深, 出现小淋巴细胞, 呈紫红色, 上皮鞘形成(图1B)。18 dph, 胸腺外包结缔组织被膜, 淋巴细胞增多, 密度增大(图1C)。20 dph, 结缔组织开始向胸腺实质伸展把腺体分成若干小叶, 小叶间结缔组织形成的小梁将其分成数个小结(图1D)。25 dph, 胸腺与头肾有结缔组织连接(图1E), 胸腺分区明显, 皮质区位于胸腺外层, 淋巴细胞密集, 着色较深, 有许多微血管分布; 髓质区位于胸腺内层, 着色较浅, 淋巴细胞数量较少。胸腺小叶明显, 由于小叶间隔不明显, 小结不完全隔开(图1F)。胸腺主要由着色较深的淋巴母细胞和淋巴细胞所填充, 偶见少量红细胞。

另外, 在早期发育过程中, 胸腺外周有一些分散的淋巴细胞, 胸腺与头肾有细胞“桥”连接(图2B), 到发育基本完成, 细胞“桥”衍变成结缔组织, 胸腺与头肾独立分开。

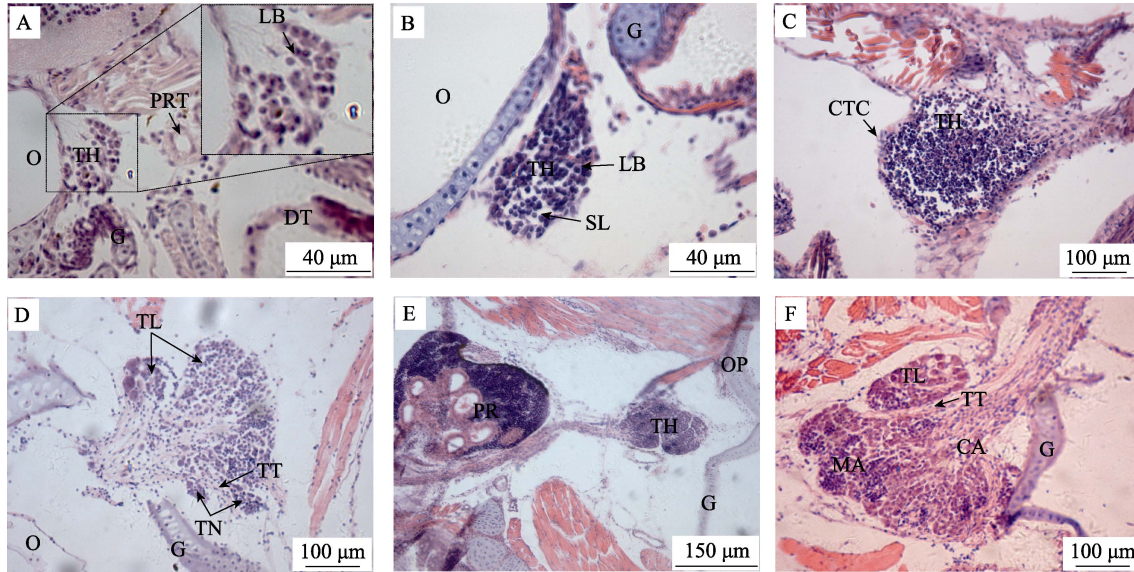


图1 四指马鲛胸腺的发育

Fig.1 Development of thymus in *E. tetradactylum*

A: 3dph (Days post hatching), 示胸腺淋巴母细胞, 400×; B: 6 dph, 示胸腺淋巴母细胞和小淋巴细胞, 400×; C: 18 dph, 示胸腺淋巴细胞和结缔组织被膜, 200×; D: 20 dph, 示胸腺小叶、小梁及小结出现, 200×; E: 25 dph, 示头肾和胸腺, 100×; F: 25 dph, 示胸腺皮质区、髓质区、小叶、小梁, 400×; CTC: 结缔组织被膜; CA: 皮质区; DT: 消化道; G: 鳃弓; LB: 淋巴母细胞; MA: 髓质区; O: 耳囊; OP: 鳃盖骨; PR: 头肾; PRT: 前肾管; SL: 小淋巴细胞; TH: 胸腺; TL: 胸腺小叶; TT: 胸腺小梁; TN: 胸腺小结

A: 3 dph, showing lymphoblasts of the thymus, 400×; B: 6 dph, showing lymphoblasts and small lymphocytic of the thymus, 400×; C: 18 dph, showing lymphocytes and connective tissue, 200×; D: 20 dph, showing thymic lobules, trabeculae, and nodules appear, 200×; E: 25 dph, showing thymus and pronephros; F: 25 dph, showing the cortical areas, medulla areas, lobule, trabecular, 400×; CTC: Connective tissue; CA: Cortical areas; DT: Digestive tract; G: Gill; LB: Lymphoblasts; MA: Medulla areas; O: Oticapsule; OP: Operculum; PR: Pronephros; PRT: Pronephric tubules; SL: Small lymphocytic; TH: Thymus; TL: Thymic lobule; TT: Thymic trabecular; TN: Thymic nodules

2.2 头肾

1 dph, 头肾原基尚未形成, 原肾管沿脊椎直抵躯干后部, 开口于肛门。3 dph, 原肾管前端分化成若干个前肾管, 前肾管的管壁由单层上皮细胞组成, 前肾管间有少量未分化的造血干细胞, 此时头肾原基形成(图 2A)。5 dph, 前肾管由外向内集中且管径增大, 头肾外围有红色髓性细胞分布, 边缘出现淋巴样组织, 呈紫红色(图 2B)。7 dph, 前肾管管径增大, 管壁细胞红色深染, 细胞核偏位, 肾管外缘出现淋巴母细胞和圆形的粒细胞, 管间组织开始填充, 前肾管之间有少量红细胞分布(图 2C)。15 dph, 头肾的淋巴细胞分化明显, 淋巴细胞逐渐增多, 前肾管之间的填充细胞增多, 红细胞数量增加(图 2D)。18 dph, 前肾管开始退化, 管壁细胞出现凋亡现象; 淋巴细胞增多, 着色加深, 出现淋巴细胞集中区(图 2E)。20 dph, 头肾内出现肾上腺, 有少量圆形、紫红色的肾上腺细胞分布, 淋巴细胞集中区明显, 粒细胞增多, 在肾管外缘偶见黄褐色的巨噬细胞(图 2F)。25 dph, 大量前肾管

退化, 淋巴细胞比例增大, 并出现大量嗜铬细胞团, 呈黄褐色, 分布于头肾外缘(图 2G)。30 dph, 前肾管减少, 肾上腺增大, 肾上腺细胞及嗜铬细胞团增多(图 2H)。35 dph, 头肾中央静脉出现, 只有少数前肾管和退化残留的小肾管(图 2I)。40 dph, 头肾内部红细胞活跃, 淋巴细胞和粒细胞相间分布, 偶见着色较深的淋巴细胞集中区和着色较浅粒细胞集中区(图 2J)。53 dph, 前肾管完全退化, 仅有少量退化后的前肾管残留(图 2L), 静脉腔直径增大, 内有较多的血细胞(图 2K), 此时与成鱼头肾的组织结构接近。头肾外缘由被膜包围, 实质由大量的淋巴细胞、血细胞和粒细胞填充, 仅见少数黑色素-巨噬细胞聚集中心, 淋巴细胞集中区和粒细胞集中区比较明显, 其形态很不规则。

2.3 脾脏

7 dph, 脾原基出现, 位于肠壁背侧, 并被胰脏组织包围, 卵圆形, 由疏松的间充质细胞索和毛细血管组成(图3A)。16 dph, 脾原基增大, 梨形, 内含少量

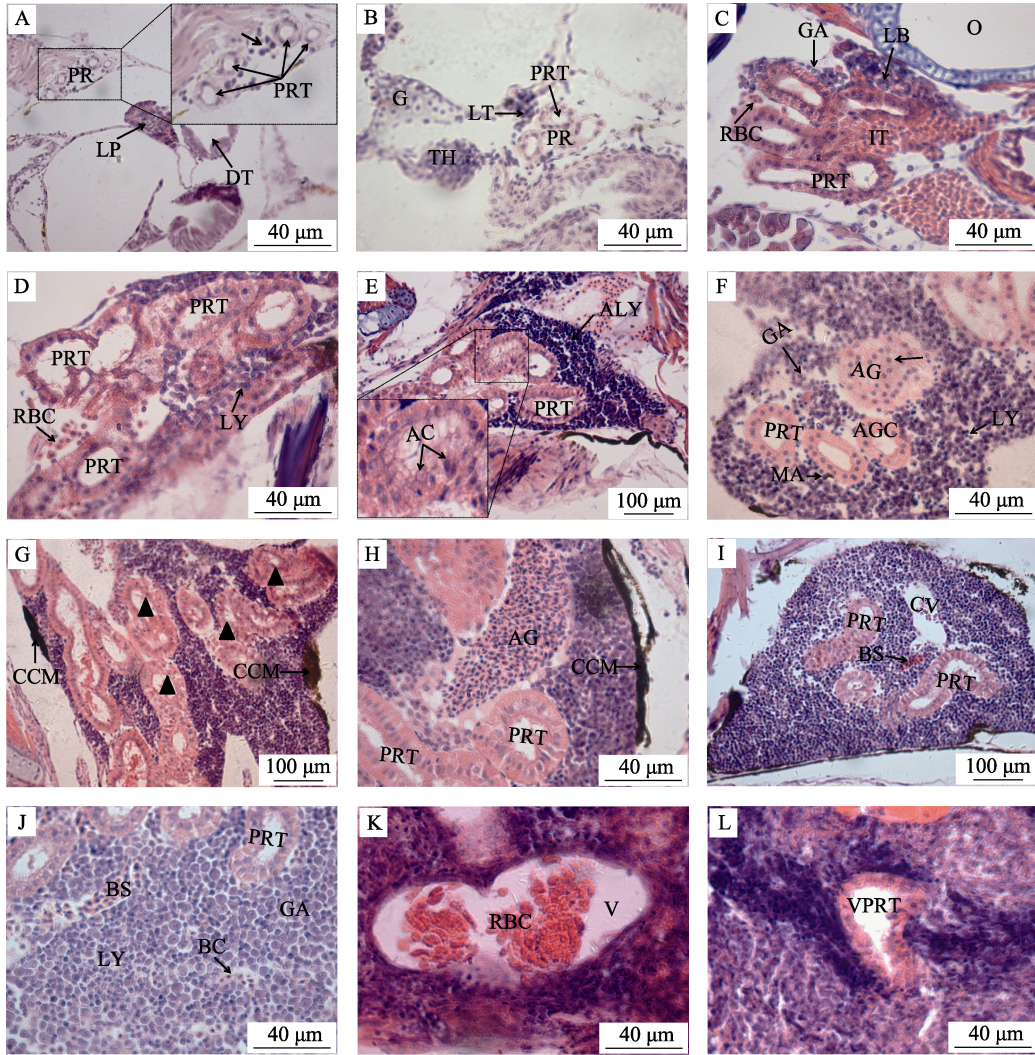


图 2 四指马鲛头肾的发育

Fig.2 Development of head kidney in *E. tetradactylum*

A: 3 dph, 示头肾的造血干细胞(↑)和前肾管, 400×; B: 5 dph, 示增大的前肾管和淋巴组织, 400×; C: 7 dph, 示继续增大的前肾管, 管间组织, 淋巴母细胞, 粒细胞, 红细胞, 400×; D: 15 dph, 示前肾管, 淋巴细胞, 红细胞, 400×; E: 18 dph, 示淋巴细胞集中区和退化的肾管, 凋亡细胞, 200×; F: 20 dph, 示肾上腺细胞, 前肾管, 粒细胞, 淋巴细胞, 巨噬细胞, 400×; G: 25 dph, 示大量前肾管退化(▲), 嗜铬细胞团, 200×; H: 30 dph, 示前肾管, 肾上腺, 嗜铬细胞团, 200×; I: 35 dph, 示中央静脉, 血窦, 前肾管, 200×; J: 40 dph, 示前肾管, 血窦, 血细胞, 淋巴细胞, 粒细胞, 400×; K: 53 dph, 示静脉, 400×;

L: 53 dph, 示已退化的前肾管, 400×; AC: 凋亡细胞; AG: 肾上腺; AGC: 肾上腺细胞; ALY: 淋巴细胞集中区; BC: 血细胞; BS: 血窦; CCM: 嗜铬细胞团; CV: 中央静脉; DT: 消化道; G: 鳃弓; GA: 粒细胞; IT: 管间组织; LP: 肝原基; LT: 淋巴组织; LB: 淋巴母细胞; LY: 淋巴细胞; MA: 巨噬细胞; ND: 肾管; PR: 前肾; PRT: 前肾管; RBC: 红细胞; V: 静脉; VPRT: 退化的前肾管

A: 3 dph, showing hematopoietic stem cells of head kidney(↑) and pronephric tubules, 400×; B: 5 dph, showing enlarged pronephric tubules and lymphatic tissue, 400×; C: 7 dph, showing pronephric tubules continues to enlarge, inter tubular tissue, lymphocytoblast, granulocytes, red blood cell, 400×; D: 15 dph, showing pronephric tubules, lymphocyte, red blood cell, 400×; E: 18 dph, showing lymphocytes accumulation, degenerated pronephric tubules and apoptotic cell, 200×; F: 20 dph, showing adrenal gland cells, pronephric tubules, granulocytes, lymphocyte, macrophage, 400×; G: 25 dph, showing a lot of pronephric tubules degenerate(▲), chromaffin cell mass, 200×; H: 30 dph, showing pronephric tubules, adrenal gland, chromaffin cell mass, 200×; I: 35 dph, showing central veins, blood sinus, pronephric tubules, 200×; J: 40 dph, showing pronephric tubules, blood sinus, blood cell, lymphocyte, granulocytes, 400×; K: 53 dph, showing vein, 400×; L: 53 dph, showing vestigial pronephric tubules, 400×; AC: Apoptotic cell; AG: Adrenal gland; AGC: Adrenal gland cells; ALY: Lymphocytes accumulation; BC: Blood cell; BS: Blood sinus; CCM: Chromaffin cell mass; CV: Central veins; DT: Digestive tract; G: Gill; GA: Granulocytes; IT: Inter tubular tissue; LP: Liver primordium; LT: Lymphoid tissue; LB: Lymphocytoblast; LY: Lymphocyte; MA: Macrophage; ND: Nephric ducts; PR: Pronephros; PRT: Pronephric tubules; RBC: Red blood cell; V: Vein; VPRT: Vestigial pronephric tubules

嗜碱性细胞或造血干细胞,并开始淋巴化(图3B)。20 dph,脾体积增大,淋巴细胞与红细胞相间排列,可见活跃的红细胞生成;着色较深的嗜碱性细胞、成纤维细胞与红细胞排列较疏松,成索状结构(图3C)。25 dph,脾外缘由浆膜包裹,淋巴细胞密度增大,毛细血管增多,偶见黑色素巨噬细胞聚集中心(图3D)。30 dph,脾脏增大,小淋巴细胞增多,巨噬细胞出现,黄褐色,形状不规则;毛细血管增多,椭圆体结构出

现(图3E)。35 dph,黑色素巨噬细胞聚集中心数量增多,体积增大;淋巴细胞和红细胞增多,着色加深,出现明显的淋巴细胞集中区(图3F)。45 dph,结缔组织被膜伸入脾实质内形成脾小梁,脾小叶开始形成,着色较深的白髓和着色较浅的红髓开始区分,红细胞增多,巨噬细胞明显(图3G)。53 dph,淋巴细胞数量增加,着色加深,呈紫红色(图3H),红髓与白髓交错排列,脾窦较明显(图3I)。此时,脾组织发育基本完成,

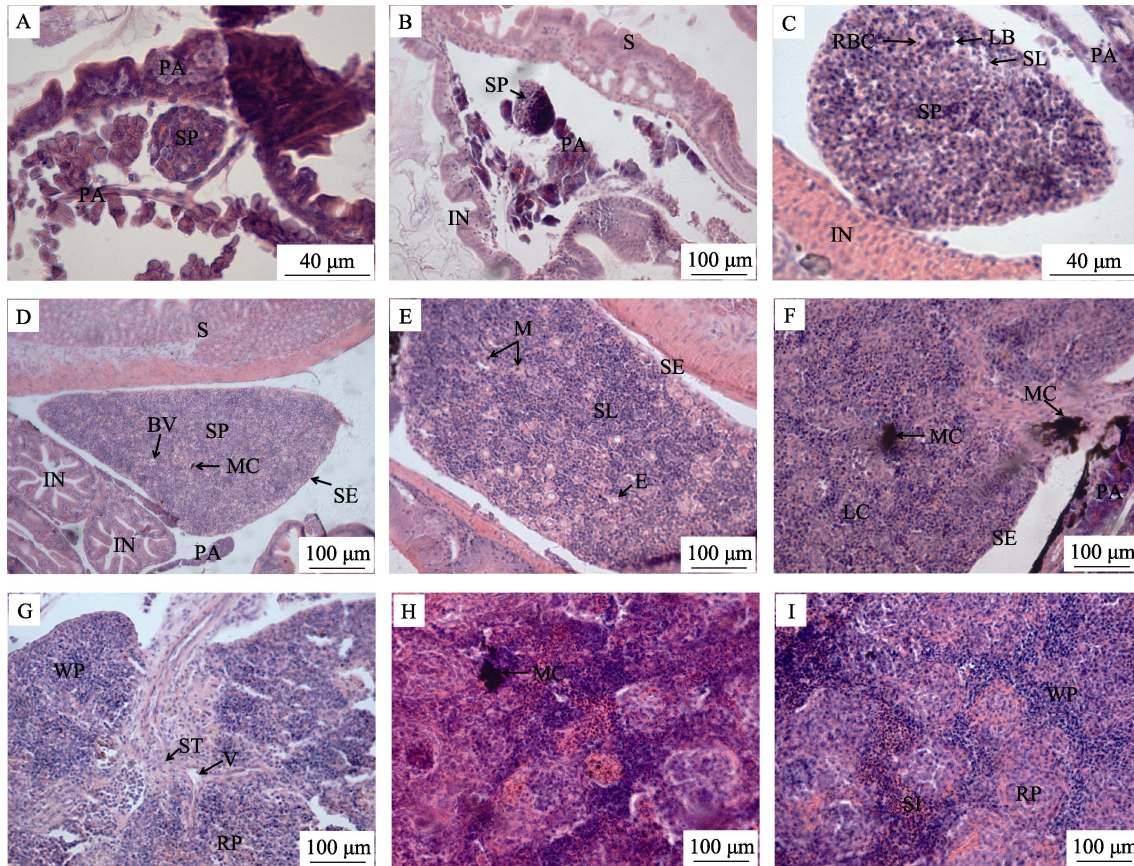


图3 四指马鲛脾脏的发育

Fig.3 Development of spleen in *E. tetradactylum*

A: 7 dph, 示脾脏原基和胰脏, 400×; B: 16 dph, 脾脏体积增大, 细胞开始淋巴化, 200×; C: 20 dph, 示淋巴母细胞, 小淋巴细胞和红细胞, 400×; D: 25 dph, 示黑色素-巨噬细胞聚集中心, 浆膜, 血管, 200×; E: 30 dph, 小淋巴细胞增多, 示巨噬细胞, 椭圆体, 200×; F: 35 dph, 示中央静脉, 淋巴细胞聚集区, 200×; G: 45 dph, 示脾小梁, 红髓, 白髓, 200×; H: 53 dph, 200×; I: 53 dph, 示脾窦, 红髓, 白髓, 200×。

BL: 血管; E: 椭圆体; IN: 肠; LB: 淋巴母细胞; LC: 淋巴细胞聚集区; M: 巨噬细胞;
MC: 黑色素-巨噬细胞聚集中心; PA: 胰脏; RBC: 红细胞; RP: 红髓; S: 胃; SE: 浆膜;
SP: 脾脏; SL: 小淋巴细胞; ST: 脾小梁; SI: 脾窦; V: 静脉; WP: 白髓

A: 7 dph, showing the spleen primordium and pancreas, 400×; B: 16 dph, showing the spleen bulked up, and the cells began to lymphatize, 200×; C: 20 dph, showing the lymphoblast, small lymphocytes and red blood cells, 400×; D: 25 dph, showing blood vessel, melano-macrophage centers and serosa, 200×; E: 30 dph, showing small lymphocytic increase, macrophage and ellipsoid, 200×; F: 35 dph, showing central veins, lymphocyte aggregation center, 200×; G: 45 dph, showing spleen trabecular, red pulp, white pulp, 200×; H: 53 dph, 200×; I: 53 dph, showing splenic sinus, red pulp, white pulp, 200×. BL: Blood vessel; CV: Central veins; E: Ellipsoid; IN: Intestines; LB: Lymphoblast; LC: Lymphocyte aggregation center; M: Macrophage; MC: Melano-macrophage centers; PA: Pancreas; RBC: Red blood cell; RP: Red pulp; S: Stomach; SE: Serosa; SP: Spleen; SL: Small lymphocytic; ST: Spleen trabecular; SI: Splenic sinus; V: Vein; WP: White pulp

但尚未成熟, 往后继续增大, 脾细胞继续淋巴化。脾的内皮系统较头肾发达, 其发育速度较胸腺和头肾慢, 淋巴细胞明显少于胸腺和头肾。

3 讨论

在许多硬骨鱼类发育过程中, 胸腺是第一个发育成熟的淋巴器官, 如斑马鱼在 4 dph 时, 其胸腺在其他淋巴器官开始发育之前就已经形成(Hansen *et al.*, 1998; Willett *et al.*, 1999)。本研究结果显示, 四指马鲛胸腺原基及头肾原基均在 3 dph 出现, 但胸腺原基发育较快, 25 dph 基本发育完成, 而头肾淋巴化速度较慢; 脾脏原基则在 7 dph 形成, 发育过程较为缓慢。四指马鲛淋巴器官淋巴化的顺序是胸腺、头肾、脾脏, 可见胸腺作为鱼类中枢免疫器官在维系机体早期发育阶段的免疫机能具有重要作用(Rauta *et al.*, 2012)。这与斜带石斑鱼、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)等海水鱼类的研究结果一致(吴金英等, 2003; 苏友禄等, 2008)。四指马鲛的胸腺与鳃咽腔由组织被膜相隔, 与咽上皮密切相关, 这有利于口咽腔和鳃组织抵抗病原入侵, 促进和调节淋巴细胞和非淋巴细胞的相互作用, 发挥免疫防御功能(Boehm *et al.*, 2003)。胸腺组织结构的分化在硬骨鱼类中是高度可变的, 在许多鱼类中胸腺的皮质和髓质没有明显的分化(Liu *et al.*, 2004)。25 dph 胸腺皮质和髓质区分明显, 髓质可以看成是一个次级淋巴器官, 因为它可以被外源性抗原和淋巴细胞所利用(Schuurman *et al.*, 1997)。不同的鱼类其免疫能力存在差异可能与胸腺的组织结构特征有一定的关系。

本研究发现, 在四指马鲛早期发育过程中, 胸腺外周有一些分散的淋巴细胞; 胸腺与头肾互相靠拢, 有细胞“桥”连接。同样, 在金头鲷(*Sparus aurata*)、罗非鱼(*Oreochromis spp.*)、虹鳉(*Poecilia reticulatus*)、鲈(*Pleuronectes platessa*)等鱼类中也有关于胸腺与头肾存在细胞“桥”相连的报道(Jósefsson *et al.*, 1993)。3 dph 时, 四指马鲛头肾原基中未分化的造血干细胞在形态特征与胸腺的干细胞相似, 此时, 胸腺和头肾均未开始淋巴化; 5 dph 时胸腺淋巴细胞有往头肾迁移的迹象, 头肾的造血干细胞开始分化, 出现淋巴样组织。这为“头肾的淋巴细胞是从胸腺迁移而来”这一观点提供佐证(Jósefsson *et al.*, 1993; Bowden *et al.*, 2005)。但与斜带石斑鱼(吴金英等, 2003)及卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) (蔡文超等, 2012)的研究结果不尽相同, 可见不同的鱼类其头肾淋巴细胞的起源存在差别。四指马鲛头肾在发育早期有较多的肾小管, 随着鱼体的生长, 淋巴细胞增多, 18 dph 时肾小管开始

退化, 直到 53 dph 肾小管才完全消失, 后来主要由淋巴细胞、粒细胞和血细胞等填充, 此时头肾形成了具有免疫和造血功能的淋巴样器官。这与牙鲆、斜带石斑鱼、草鱼、鳊(*Siniperca chuatsi*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)等多种鱼类的研究结果类似(吴金英等, 2003; 雷雪彬等, 2013; 田敬云等, 2005; 刘小玲等, 2009)。20 dph 时头肾开始出现少量巨噬细胞和肾上腺细胞, 巨噬细胞可吞噬和消灭入侵的病原体, 还有助于释放对宿主免疫应答启动起重要作用的促炎细胞因子, 表明此时四指马鲛的头肾可能开始具有免疫防御功能(Pressley *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2007; Fishelson, 2010)。25 dph 时头肾淋巴细胞增多, 边缘出现大量黄褐色或黑色的嗜铬细胞团, 而成熟的嗜铬细胞和肾上腺细胞可分泌儿茶酚胺类激素和皮质类固醇激素, 从而参与水盐代谢及应激反应(Geven *et al.*, 2017)。脾脏原基在 7 dph 时出现, 淋巴化的时间最迟, 30 dph 时有黑色素-巨噬细胞聚集中心出现, 往后不断增多, 因其有从循环系统中清除可溶性和颗粒物质的作用, 常被广泛用作监测水质和鱼体健康状况的生物标记(刘小玲等, 2009)。53 dph 时红髓与白髓相间排列, 区分不明显, 此时, 脾脏尚未具备强大的造血和免疫功能, 需要继续发育完善。在脾脏发育过程中, 红细胞较为活跃, 数量明显增长, 血管系统发达, 表明脾脏具有很强的造血、血液过滤及储存功能(区又君等, 2015)。相对于胸腺和头肾, 脾脏淋巴化过程较为缓慢, 淋巴细胞也明显少于胸腺和头肾, 可见脾脏在体液免疫中处于相对次要的地位(Rauta *et al.*, 2012)。

对于脊椎动物而言, 免疫活性的建立依赖于免疫淋巴器官的发育成熟。研究表明, 鱼类淋巴细胞的出现并不代表其功能成熟, 而淋巴细胞的功能成熟往往比淋巴器官的出现迟, 一般要到幼鱼期以后才发育完成, 而免疫功能的完善则更迟(吴金英等, 2003)。此外, 鱼类淋巴器官的形态及功能发育受营养及环境的影响较大, 如环境温度会影响胸腺形态结构的发育以及淋巴细胞的生成(Bowden *et al.*, 2005), 矿物质缺乏(如铁、磷、硒)会损害幼鱼免疫器官的功能和结构完整性(Guo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018); 拥挤应激会对鱼类的非特异性免疫反应产生负面影响, 增加脾脏的不适当凋亡, 使鱼类更易受到病原体的侵袭, 最终影响鱼类的生存(Zheng *et al.*, 2018)。相对其他鱼类而言, 四指马鲛淋巴器官原基出现的时间较早, 胸腺淋巴化也较迅速, 但头肾和脾脏发育较滞后。四指马鲛从出膜经过仔鱼期、稚鱼期再到幼鱼期需要较长的一段时间过渡。从稚鱼到幼鱼这一变态发育阶段, 鱼体的形态结构与器官的发育尚处于演变和完善过程, 加上环境因子和营养因素对免

疫淋巴器官结构及功能发育的影响,导致其免疫防御机能较弱,这可能是变态期间鱼苗脆弱,容易患病,死亡率高的主要原因。针对该问题亟待进一步往免疫调控机制方面深入研究,这对苗种培育和成鱼健康养殖具有重要意义。

参 考 文 献

- Boehm T, Bleul CC, Schorpp M. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunological Reviews*, 2003, 195(1): 15–27
- Boehm T, Hess I, Swann JB. Evolution of lymphoid tissues. *Trends in Immunology*, 2012, 33(6): 315–321
- Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 2005, 19(5): 413–427
- Cai WC, Ou YJ, Li JE, *et al.* Development of immune organs at early stages of *Trachinotus ovatus*. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(5): 39–45 [蔡文超, 区又君, 李加儿, 等. 卵形鲳鲹免疫器官的早期发育. *南方水产科学*, 2012, 8(5): 39–45]
- Campoverde C, Andree KB, Milne DJ, *et al.* Ontogeny of lymphoid organs and mucosal associated lymphoid tissues in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 509–520
- Chen K, Jiang WD, Wu P, *et al.* Effect of dietary phosphorus deficiency on the growth, immune function and structural integrity of head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 63: 103–126
- Danilova N, Hohman VS, Sacher F, *et al.* T cells and the thymus in developing zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(7): 755–767
- Espinosa C, García Beltrán JM, Esteban MA, *et al.* In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 30–38
- Fishelson L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae*, *Teleostei*) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, 2006, 267(1): 57–69
- Geven EJW, Klaren PHM. The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 66: 73–83
- Guo YL, Jiang WD, Wu P, *et al.* The decreased growth performance and impaired immune function and structural integrity by dietary iron deficiency or excess are associated with TOR, NF- κ B, p38MAPK, Nrf2 and MLCK signaling in head kidney, spleen and skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 65: 145–168
- Hansen JD, Zapata AG. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews*, 1998, 166(1): 199–220
- Hu LL, Li JE, Ou YJ, *et al.* Study on microstructure of head-kidney and speed of *Oplegnathus fasciatus*. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(3): 41–45 [胡玲玲, 李加儿, 区又君, 等. 条石鲷头肾和脾脏的显微结构观察. *南方水产*, 2010, 6(3): 41–45]
- Jósefsson S, Tatner MF. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 1993, 3(1): 35–49
- Lei XB, Chang OQ, Shi CB, *et al.* Histological and immunohistochemical observations on the early development of head kidney in *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 840–850 [雷雪彬, 常藕琴, 石存斌, 等. 草鱼头肾发生组织学与免疫组织化学观察. *水产学报*, 2013, 37(6): 840–850]
- Lin W, Li L, Chen J, *et al.* Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 80: 540–545
- Lin XZ, Ou YJ, Li JE, *et al.* Present status and foreground of family threadfin fishes (Polynemidae). *Journal of Biology*, 2015(4): 83–87 [林先智, 区又君, 李加儿, 等. 马鲛科 (Polynemidae) 鱼类的研究现状及展望. *生物学杂志*, 2015(4): 83–87]
- Liu QQ, Wen JF, Ou YJ, *et al.* The effects of acute off-water handling stress on the tissue structure and oxidative stress of juvenile *Eleutheronema tetradactylum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 48–55 [刘奇奇, 温久福, 区又君, 等. 急性离水操作胁迫对四指马鲛 (*Eleutherone ma tetradactylum*) 幼鱼组织结构和氧化应激的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 48–55]
- Liu XL, Ge HY, Gu ZM. Ontogeny and structure of head kidney of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(3): 108–110 [刘小玲, 葛海燕, 顾泽茂. 黄颡鱼头肾的组织发生与组织结构研究. *水生生态学杂志*, 2009, 2(3): 108–110]
- Liu Y, Zhang SC, Jiang GL, *et al.* The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 621–632
- Ma DC, Ye LH, Xu AY, *et al.* A histological study of *Tylorrhynchus heterochaetus*. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(4): 58–63 [马定昌, 叶柳荷, 许爱娉, 等. 疣吻沙蚕组织切片的观察研究. *南方水产科学*, 2014, 10(4): 58–63]
- Moore BR, Stapley J, Allsop Q, *et al.* Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia, as indicated by parasites. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(3): 923–936
- Nakanishi T, Shibasaki Y, Matsuura Y. T cells in fish. *Biology*, 2015, 4: 640–663
- Nayak AS, Lage CR, Kim CH. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicological Sciences*, 2007, 98(1): 118–124
- Ou YJ, Liu JH, Li JE, *et al.* Morphology and histology of head-kidney and spleen in *Cromileptes altivelis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(11): 2034–2039 [区又君, 刘江华, 李加儿, 等. 驼背鲂头肾和脾脏的形态组织学观察. *南方农业学报*, 2015, 46(11): 2034–2039]
- Ou YJ, Xie MJ, Li JE, *et al.* First maturation and mass seedling propagation of cultured *Eleutheronema tetradactylum* in Guangdong Province. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(4): 97–104 [区又君, 谢木娇, 李加儿, 等. 广东池塘培育四指马鲛亲鱼初次性成熟和苗种规模化繁育技术研究. *南方水产科学*, 2017, 13(4): 97–104]
- Pressley ME, Phelan III PE, Witten PE. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(6): 501–513
- Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters*,

- 2012, 148(1): 23–33
- Schuurman HJ, Kuper CF, Kendall MD. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microscopy Research and Technique*, 1997, 38(3): 216–226
- Su YL, Feng J, Guo ZX, *et al.* Morphological studies on the development of lymphoid organs in *Cobia Rachycentron canadum*. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 7–14 [苏友禄, 冯娟, 郭志勋, 等. 军曹鱼淋巴器官发育的形态学研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 7–14]
- Tian JY, Xie HX, Yao WJ, *et al.* Ontogenetic development of the pronephros and the distribution of B-lymphocytes in adult pronephros of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(3): 440–446 [田敬云, 谢海侠, 姚卫建, 等. 鳊鱼头肾的组织发生及成鱼头肾 B 淋巴细胞分布. *动物学报*, 2005, 51(3): 440–446]
- Wang JJ, Peng S, Fei Y. Low mtDNA Cytb diversity and shallow population structure of *Eleutheronema tetradactylum* in the East China Sea and the South China Sea. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 55(2): 268–274
- Willett CE, Cortes A, Zuasti A, *et al.* Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 1999, 214(4): 323–336
- Wu JY, Lin HR. Ontogeny of lymphoid organs in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(6): 819–828 [吴金英, 林浩然. 斜带石斑鱼淋巴器官个体发育的组织学. *动物学报*, 2003, 49(6): 819–828]
- Xing HF, Gao FT, Zhang YZ, *et al.* Molecular cloning, expression and SNP screening of natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) gene cDNA from half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 116–127 [邢贺飞, 高峰涛, 张永珍, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)基因克隆与表达分析及 SNP 筛选. *渔业科学进展*, 2016, 37(04): 116–127]
- Zheng L, Jiang WD, Feng L, *et al.* Selenium deficiency impaired structural integrity of the head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 408–420

(编辑 马瑾艳)

Histological Observations on the Early Development of Lymphoid Organs in *Eleutheronema tetradactylum*

LAN Junnan^{1,2}, WEN Jiufu¹, LI Junwei¹, OU Youjun^{1①}, ZHOU Hui¹, LI Jiaer¹, LI Huo³

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 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. Maoming Jinyang Tropical Fish Breeding Co. Ltd, Maoming 525444)

Abstract This work focused on the histological study of the ontogeny of lymphoid organs by paraffin tissue sections and HE staining techniques in *Eleutheronema tetradactylum*, from 1 to 60 dph (day post hatching). The results showed that in the conditions of salinity 9.0±0.5 and water temperature (28±2)°C, thymus primordium appears at 3 dph that composed of 4~6 layers of undifferentiated stem cells and lymphocyte-like cells; thymus differentiated rapidly and mainly filled with lymphocytes; at 25 dph, the cortex and medulla are clearly distinguished and thymus development was basically completed. Similarly, the head kidney primordium formed at 3 dph, it consists of pronephric tubules and a few of hematopoietic stem cells; at 5 dph, the head kidney began to lymphatize when the thymic lymphocytes migrate there, and hematopoietic stem cells differentiated into different types of cells as the fish grew; at 18 dph, pronephric tubules began to degenerate and disappeared completely until 53 dph, when the head kidney is mainly composed of lymphopoietic tissue supported by reticular endothelial system. At 7 dph, the spleen primordium appears and begins to lymphatize obviously until 16 dph. The endothelial system of spleen is more developed than that of head kidney, but its development speed is significantly slower than thymus and head kidney, and lymphocytes are less than in the thymus and head kidney. These observations suggested that the respective lymphoid organs primordium becomes the thymus, head kidney and spleen successively. The structure and function of the lymphatic organs in *E. tetradactylum* have not been fully developed and maybe one of the main causes of high mortality during the metamorphosis period. This study is of great significance for optimizing breeding conditions, improving juvenile cultivation and healthy aquaculture technology.

Key words *Eleutheronema tetradactylum*; Lymphoid organs; Development; Histology

① Corresponding author: OU Youjun, E-mail: ouyoujun@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190309001

http://www.yykxjz.cn/

王杉, 徐文腾, 李明, 王洁, 王磊, 翟介明, 陈松林. 斑石鲷 *TGF-β1* 基因克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 78-87

Wang S, Xu WT, Li M, Wang J, Wang L, Zhai JM, Chen SL. Molecular cloning and expression pattern analysis of *TGF-β1* in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 78-87

斑石鲷 *TGF-β1* 基因克隆和表达分析*



王杉^{1,2} 徐文腾¹ 李明^{1,2} 王洁^{1,2} 王磊¹ 翟介明³ 陈松林^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 3. 莱州市明波水产有限公司 烟台 261400)

摘要 虹彩病毒是造成斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)工厂化养殖中大规模死亡的主要病原,其感染力极强,感染后的斑石鲷死亡率高,严重影响了斑石鲷养殖产业发展。转化生长因子 *TGF-β1* 是一种重要的免疫调节因子,在病毒免疫应答中发挥重要作用。为研究 *TGF-β1* 在斑石鲷被虹彩病毒感染过程中发挥的作用,运用 RACE 和实时荧光定量 qRT-PCR 技术对 *TGF-β1* 进行了基因克隆,并对其在不同组织、不同时间点相对表达量的差异分析。结果显示,斑石鲷 *TGF-β1* 基因 cDNA 序列全长为 3157 bp, 5'非编码区长 712 bp, 3'非编码区长 1278 bp, 开放性阅读框长 1167 bp, 编码 388 个氨基酸,基因组包含 6 个外显子和 5 个内含子。同源分析发现, *TGF-β1* 和鱼类相似度较高,与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的同源性最高,为 76.67%。*TGF-β1* 在斑石鲷健康组织(肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤)中均有表达,在头肾、肠、肝脏和皮肤组织中表达量较高,而在脾脏和肾脏组织表达量较低。为进一步研究 *TGF-β1* 在病毒感染过程中相对表达量的变化,对健康斑石鲷注射虹彩病毒进行刺激,随后比较了 *TGF-β1* 在脾脏、肝脏、肾脏、头肾 4 个不同组织、不同时间点的相对表达量的差异,在头肾、脾脏和肝脏中,病毒刺激后 *TGF-β1* 的表达量均出现升高,但在脾脏和肝脏中,峰值出现在刺激后第 4 天,而在头肾中峰值出现在感染后的第 10 天。在肾脏中,病毒刺激后的 *TGF-β1* 的表达呈现下降趋势,0 d 表达量最高,4、7 d 依次降低,7 d 降至最低,10 d 有所恢复。以上研究表明, *TGF-β1* 可能响应了虹彩病毒对机体的刺激,可能在病毒免疫应答中发挥作用。而病毒感染后不同组织中 *TGF-β1* 相对表达量的差异,则值得进一步研究。

关键词 斑石鲷; 虹彩病毒; *TGF-β1*

中图分类号 S942.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)03-0078-10

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)属于鲈形目、石鲷科、石鲷属,主要分布在太平洋东北部,朝鲜、日本、中国等地沿海地区。因其营养丰富、经济价值高,成

为一种新兴的工厂化养殖鱼类。但在斑石鲷大规模养殖过程中病害频发,严重影响斑石鲷的产业发展。因此,研究病毒感染与免疫的分子机制,对于斑石鲷病

* 国家重点研发计划项目蓝色粮仓科技创新专项(2018YFD0900301-2)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900301-2), and Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China.] 王杉, E-mail: 787832529@qq.com

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

收稿日期: 2019-03-09, 收修改稿日期: 2019-04-16

害防控具有重要意义。

通过对某养殖场患病或死亡斑石鲷的PCR检测,可以扩增出明亮的虹彩病毒特有的条带。因此,认为这些斑石鲷携带虹彩病毒,并推测虹彩病毒可能与斑石鲷的死亡有关。虹彩病毒科包括5个属:细胞肿大病毒属、蛙病毒属、淋巴肿大病毒属、虹彩病毒属和绿虹彩病毒属等。其中,感染鱼类的主要是细胞肿大病毒属中的真鲷虹彩病毒(RSIV)和脾肾坏死病毒(ISKNV),它们可以感染多种海洋鱼类,感染后死亡率极高(Nakajima *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001)。虹彩病毒是一种大型二十面体病毒,具有线性双链DNA基因组(Goorha *et al.*, 1984)。在一些亚洲国家,细胞肿大病毒导致多种海洋物种在高水温下死亡(Inoue *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1996; Miyata *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 1998)。在韩国,1998年首次在南部沿海地区发现条石鲷虹彩病毒感染(Jung *et al.*, 2000)。疾病的最初症状是进食量减少,嗜睡,身体颜色异常,鳃有淤点,以及脾脏、鳃和消化道的病变。在疾病的末期,患病鱼在笼子边缘无规律游动(Inoue *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 2000; Gibson-Kueh *et al.*, 2003; He *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 1997)。受虹彩病毒感染的鱼的特征是脾脏增大,脾脏、鳃、肾、心脏和肝脏中存在嗜碱性细胞增大的现象,并导致肾和脾造血组织坏死(Nakajima *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2000)。虹彩病毒对斑石鲷养殖业危害巨大,因此,亟需从分子机制角度对斑石鲷虹彩病毒病进行防治。

TGF-β是调节复杂免疫反应的主要分子开关,在免疫过程中起促进和抑制的双重调节作用。转化生长因子β超家族(TGF-βs)属于多功能生长因子的超家族,主要包括5个成员(TGF-β1~5)(Roberts *et al.*, 1990; Kehrl *et al.*, 1986)。体内绝大部分组织和细胞都能产生TGF-β及其受体(Le *et al.*, 2005),在成纤维细胞、巨噬细胞和血小板中表达量较高(Takehara, 2000; Thompson *et al.*, 1989),其广泛参与体内各种生理生化功能的调节,包括哺乳动物胚胎发育,两栖动物、昆虫的骨骼发育,伤口愈合、免疫以及成人的炎症反应,调节细胞增殖、分化和生长(Senturk *et al.*, 2010),并能调节包括干扰素γ和肿瘤坏死因子α在内的其他生长因子的表达和激活,其中,*TGF-β1*含量最高且功能最为广泛。

目前,*TGF-β1*在鱼类中的研究主要集中在基因克隆和对免疫细胞调节方面,先后在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Daniels *et al.*, 1999)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Kohli *et al.*, 2003)、海鲷(*Sparus aurata*)(Tafalla *et al.*, 2003)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(Yang *et al.*,

2008)中克隆得到*TGF-β1*;在鱼类免疫细胞中的研究表明,通过用LPS刺激草鱼体外培养的单核巨噬细胞,发现*TGF-β1*抑制了炎症细胞因子如肿瘤坏死因子(tnfa)、白细胞介素(il1b)、肌苷(inos)和白细胞介素(il8)mRNA水平的表达(Wei *et al.*, 2015)。金鱼(*Carassius auratus* L.)*TGF-β1*抑制TNF-α激活的巨噬细胞中的一氧化氮的生成(Haddad *et al.*, 2008),从而抑制巨噬细胞的活化。草鱼*TGF-β1*显著降低草鱼头部肾白细胞(hkls)的活性(Yang *et al.*, 2012)。这些研究表明,*TGF-β1*主要通过抑制促炎症因子的表达来发挥抗炎作用,因为过度炎症可能导致组织损伤和广泛的慢性疾病,在哺乳动物中造成如关节炎、炎症性肠病和哮喘等(Foster *et al.*, 2009)。*TGF-β1*已被证明能够抑制toll样受体下游的炎症信号,在炎症的消退中起关键作用(Han *et al.*, 2005; Serhan *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2010)。然而,*TGF-β1*在某些研究中呈现出截然相反的作用,如草鱼体内*TGF-β1*下调LPS/PHA刺激造成的外周血淋巴细胞增殖,而*TGF-β1*在同一细胞中的刺激作用则出现与之相反的情况(Yang *et al.*, 2010)。*TGF-β1*在哺乳动物的免疫应答中同样发挥双重作用。如在癌细胞发展初期起到抑制作用,而在癌细胞的侵袭和扩散过程中起促进作用。这些研究不仅可以*TGF-β1*看作是硬骨鱼类的免疫调节因子,还表明*TGF-β1*在脊椎动物进化过程中保持基本相近的免疫功能。然而,有关鱼类*TGF-β1*参与炎症调节的机制仍然缺乏研究。实际上,到底是什么机制介导其对免疫应答的抑制作用,仍然没有详细的阐释。

本文主要研究了*TGF-β1*基因在斑石鲷健康组织中的相对表达量以及斑石鲷感染虹彩病毒后该基因在4种不同免疫组织中相对表达量的差异,希望能为进一步深入了解*TGF-β1*基因在斑石鲷免疫调节中起的作用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

正常组织:健康、体重为(300±10)g的斑石鲷由莱州明波水产有限公司提供,实验前,在水箱中暂养3d(24℃~26℃)。麻醉后,取3条鱼进行解剖,取肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤组织,立即放入液氮保存,随后将样品转移到-80℃保存,用于后续的RNA提取。

斑石鲷虹彩病毒感染及样品采集:健康、体重为(150±10)g的斑石鲷,由莱州明波水产有限公司提供,

实验前暂养 3 d (24°C~26°C)。麻醉后,腹腔注射斑石鲷虹彩病毒液(由华南农业大学秦启伟教授提供),每尾 100 μl (10^9 拷贝数)。虹彩病毒感染后,在 0、4、7、10 d 时间点取样,每个时间点取 3 条鱼,每条鱼取肝脏、脾脏、肾脏和头肾 4 个组织。取完的组织立即放入液氮中,随后放入-80°C 冰箱中冷冻保存,以待后续 DNA 和 RNA 提取。

1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

本实验使用 Trizol 法对样品的 RNA 进行提取,包括所有健康组织和所有感染后的样品。用琼脂糖凝胶电泳对提取的 RNA 进行检测,使用 Gene Quant Pro RNA/DNA 分光光度计测定提取的 RNA 的浓度。将鉴定合格的 RNA,使用 cDNA 反转录试剂盒(TaKaRa)反转录合成 cDNA,再用琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 的质量。使用 RACE 试剂盒(TaKaRa),按照说明合成 RACE-Ready-cDNA,作为扩增 5' 和 3' 非翻译区(Untranslated Region, UTR)的模板。

1.3 TGF- β 1 基因全长 cDNA 与基因组序列的克隆

1.3.1 中间片段的验证 根据斑石鲷转录组测序结果,获得 TGF- β 1 基因的部分 cDNA 序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物(TGF- β 1-F/TGF- β 1-R)(表 1),分别将

9 个不同组织(肝脏、脾脏、肾脏、头肾、心脏、鳃、胃、肠和皮肤)的 cDNA 模板进行混合,使用混合模板进行 PCR 扩增。总体体系为 15 μl : Mix (TaKaRa) 7.5 μl , TGF- β 1-F 1 μl , TGF- β 1-R 1 μl , ddH₂O 4.5 μl , 模板 cDNA 1 μl 。反应程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 60 s, 共 40 个循环; 72°C 7 min; 4°C 保存。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物与目的片段大小一致,将目的片段切下,使用胶回收试剂盒(诺唯赞,南京)对目的片段进行回收纯化,将回收产物连接到 pEASY-T1 载体(全式金,北京),转化到 Trans-T1 感受态细胞(全式金,北京)中,加入无抗 LB 液体培养基,振荡培养 1 h,涂板,37°C 过夜培养(12~16 h),挑取 6 个克隆送到北京睿博兴科生物技术有限公司(青岛区)测序。

1.3.2 5' 和 3' RACE 克隆 根据已经验证正确的部分 cDNA 序列,分别在序列两端设计 5' (TGF- β 1-5'-GSP/TGF- β 1-5'-NGSP) 和 3' (TGF- β 1-3'-GSP/TGF- β 1-3'-NGSP) RACE 引物(表 1)。使用巢氏 PCR 扩增 5'/3'UTR。第一轮反应体系为 10 μl ,使用 TaKaRa LA TaqTM Hot Start Version 试剂盒,按照使用说明书的比例加样混合,进行 Touchdown PCR 程序反应。将

表 1 本实验所用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
TGF- β 1-F	CCGAATTCATGAAGCTGGCATTCTTGATGCTC	验证内部片段
TGF- β 1-R	CGGAGCTCGCTACACTTGCAGGACTTCACAAT	Verifying the internal fragment
TGF- β 1-5'-GSP	TAATCCCCCACACTTTCTCGTATCACC	5'和 3'端克隆
TGF- β 1-5'-NGSP	CTTGTTTCAGCACCTTGGCGAAG	Cloning the 5' and 3' ends
TGF- β 1-3'-GSP	CTCTGGGACCGTGGGTGCTAGGG	
TGF- β 1-3'-NGSP	GGAAGTGGATACATAAGCCGACG	
TGF- β 1-qRT-F	GCCAGACGAGCGTTGATAGTG	Real-time PCR
TGF- β 1-qRT-R	TTTTTTGCGTGAGGTGAGGTG	
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	内参 Internal reference
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	
TGF- β 1-GM-F1	GAGGGAGGATTTGCTAAGAACC	验证基因片段
TGF- β 1-GM-R1	GAAAGTAACGCACAGCATCAGAC	Verifying the genomic fragment
TGF- β 1-GM-F2	CTGGTCTGATGCTGTGCGTTAC	
TGF- β 1-GM-R2	GGAAGCGAGGTAGCGGGC	
TGF- β 1-GM-F3	GGAAAATAGGGAATGAATGGTG	
TGF- β 1-GM-R3	CCAAAAGTGTCTTCCATCGTG	
TGF- β 1-GM-F4	CTGGTCTGATGCTGTGCGTTAC	
TGF- β 1-GM-R4	CCAGTATTGCCATCTGTGTCATTG	
TGF- β 1-GM-F5	AAGCAACGGGGTTCGGACAGTATG	
TGF- β 1-GM-R5	CGGGAAGCGAGGTAGCGGGC	

第一轮 PCR 反应的产物稀释 20 倍作为模板, 随后进行第二轮普通 PCR 扩增反应。反应体系为 50 μl, 同上按照比例加样混合后进行第二轮普通 PCR 反应。将得到的 PCR 产物根据 1.3.1 中间片段验证的方法进行测序(Wang *et al*, 2019)。

1.3.3 基因组序列的克隆 提取 3 条斑石鲷的脾脏组织的 DNA, 以此为模板, 验证 *TGF-β1* 的基因组。方法与 1.3.1 中间片段的验证类似, 引物(TGF-β1-GM-F1/TGF-β1-GM-R1, TGF-β1-GM-F2/TGF-β1-GM-R2, TGF-β1-GM-F3/TGF-β1-GM-R3, TGF-β1-GM-F4/TGF-β1-GM-R4 和 TGF-β1-GM-F5/TGF-β1-GM-R5)退火温度改设为 55°C, 延伸时间设为 5 min。

1.4 生物学分析及系统发育树的构建

使用 NCBI 对克隆得到的 *TGF-β1* 基因的全长 cDNA 序列进行分析, 预测其开放阅读框(ORF)和氨基酸序列, 并推导出其蛋白的分子量和等电点(图 1)。使用网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对翻译的氨基酸序列进行分析, 包括信号肽, 氨基酸序列跨膜结构域。在 NCBI 中搜索 *TGF-β1* 基因放入同源氨基酸序

列并预测其功能结构域。使用 DNAMAN 软件对 *TGF-β1* 进行氨基酸多重比对, 通过 MEGA 7.0 软件完成其生物系统进化树构建。

1.5 *TGF-β1* 基因的相对表达量检测

通过使用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测健康的斑石鲷不同组织中 *TGF-β1* 基因的相对表达量; 经虹彩病毒感染刺激后 4 个不同时间点、4 个不同组织(肝、肾、脾和头肾)的相对表达量的变化。根据得到的 ORF 序列设计实时荧光定量 PCR 引物(TGF-β1-qRT-F/TGF-β1-qRT-R, 表 1), 再以 *β-actin* 基因(*β-actin*-F/*β-actin*-R, 表 1)作为内参基因, 每个样品设置 3 个生物学重复, 按照 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 说明书介绍的方法进行 *TGF-β1* 基因的定量分析。根据测得的 *Ct* 值(*Ct* 取 3 个平行样品的平均值), 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *TGF-β1* 基因相对表达量, 实验得到的数据均采用 SPSS 软件进行方差分析, 设定 $P < 0.05$ 为差异显著。使用 Origin Pro 8 软件将定量结果作图(Wang *et al*, 2018)。

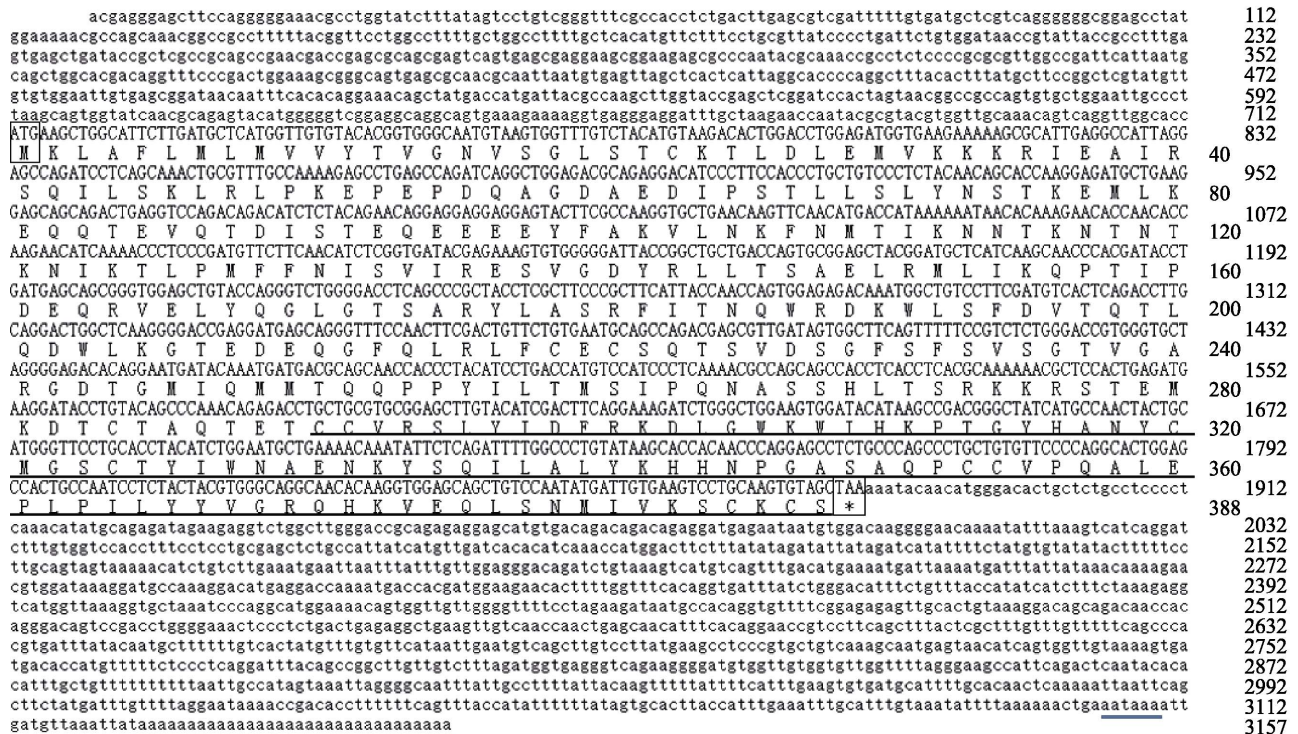


图 1 斑石鲷 *TGF-β1* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. punctatus TGF-β1*

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 用大写字母表示。方框所示为起始密码子(ATG)、星号(*)所示为终止密码子(TGA); 下划线(—)所示为 *TGF-β* 家族结构域; 蓝色下划线(—)所示为终止信号; 黄色下划线(—)所示为 polyA 结构

The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence and expressed in capital letters. The starting codon (ATG), asterisk (*) and termination codon (TGA) are shown in the box, the underline (—) is shown in the *TGF-beta* family domain, the blue underline (—) is shown in the termination signal, and the Yellow underline (—) is shown in the polyA structure

2 结果与分析

2.1 斑石鲷 TGF-β1 基因序列特征

斑石鲷 TGF-β1 基因的 cDNA 全长为 3157 bp, 开放阅读框长 1167 bp, 编码 388 个氨基酸, 5' 非编码区长 712 bp, 3' 非编码区长 1278 bp, 相对分子质量为 44.32 kDa, 预测等电点为 8.178。对 TGF-β1 基因的氨基酸序列进行分析, 发现该基因没有信号肽, 也没有跨膜区, 含有 1 个 TGF-β 前导肽, 为第 19~260 个氨基酸; 含有 1 个 TGF-β 结构域, 为第 291~388 个氨基酸, 长 98 个氨基酸。

2.2 系统进化树分析和氨基酸多序列比对

将斑石鲷的 TGF-β1 基因对应的氨基酸序列通过 NCBI 的 Protein Blast 比对, 从 NCBI 上下载其他物种 TGF-β1 基因的氨基酸序列, 鸟纲 2 种: 鸡 (Gallus gallus) (XP_025000221.1)、大山雀 (Parus major) (XP_015471764.1); 哺乳纲 2 种: 人 (Homo sapiens) (NP_000651.3)、小鼠 (Mus musculus) (NP_035707.1); 爬行纲 2 种: 多疣壁虎 (Gekko japonicus) (XP_015282748.1)、原矛头蝮 (Protobothrops mucrosquamatus) (XP_015680068.1); 两栖纲 1 种: 热带爪蟾 (Xenopus tropicalis) (XP_002939433.1); 鱼纲 9 种:

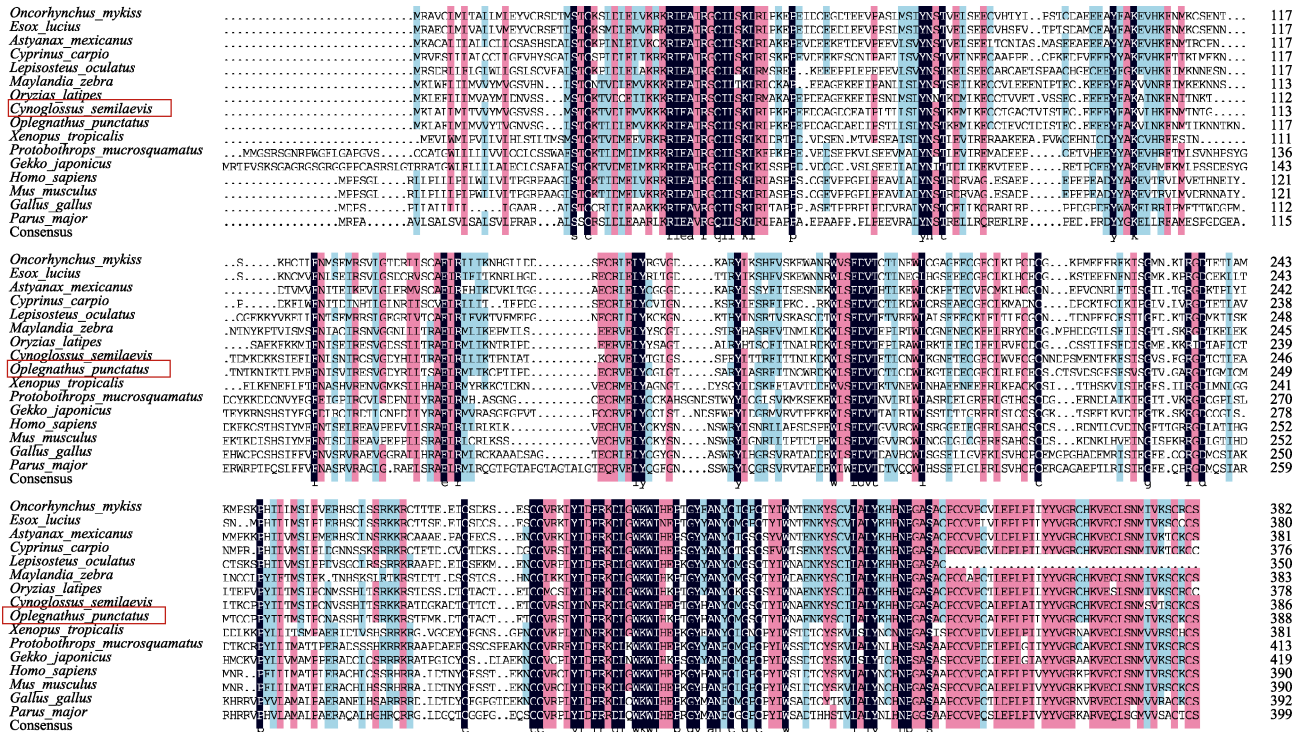


图 2 斑石鲷与其他物种 TGF-β1 氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acids of TGF-β1 among O. punctatus and other different species

青鳉 (Oryzias latipes) (XP_004075270.1)、墨西哥脂鲤 (Astyanax mexicanus) (XP_022531678.1)、斑点雀鲷 (Lepisosteus oculatus) (XP_015196176.1)、虹鳟 (O. mykiss) (XP_021447007.1)、白斑狗鱼 (Esox lucius) (XP_010868815.1)、半滑舌鲷 (Cynoglossus semilaevis) (XP_008307032.1)、欧洲鲤鱼 (Cyprinus carpio) (XP_018927916.1)、斑马拟丽鱼 (Maylandia zebra) (XP_004569626.1), 共计 16 种。多重氨基酸序列比对结果显示, 斑石鲷和其他鱼类物种 TGF-β1 氨基酸序列相对保守, 其中, 特有的 TGF-β 结构域更为保守 (图 2)。系统进化树显示, 鱼纲聚为一大支, 青鳉 (鲱形目青鳉科)、斑石鲷 (鲈形目舌鲷科)、半滑舌鲷 (鲈形目舌鲷科)、斑马拟丽鱼 (鲈形目慈鲷科) 聚为一支; 欧洲鲤 (鲤形目鲤科)、虹鳟 (鲑形目鲑科)、白斑狗鱼 (狗鱼目狗鱼科)、墨西哥脂鲤 (脂鲤目脂鲤科) 聚为一支。鸟纲的鸡 (鸡形目雉科) 和大山雀 (雀形目山雀科) 聚为一支; 哺乳纲的小鼠 (鼠目啮齿科) 和人 (灵长目人科) 聚为一支; 爬行纲的多疣壁虎 (有鳞目壁虎科)、原矛头蝮 (有鳞目蝮科) 聚为一支; 两栖纲的热带爪蟾 (无尾目负子蟾科) 单独聚为一支 (图 3)。经基因组分析发现, 斑石鲷与半滑舌鲷的基因组都包含 6 个外显子和 5 个内含子, 白斑狗鱼和人则含有 7 个外显子和 6 个内含子 (图 4)。

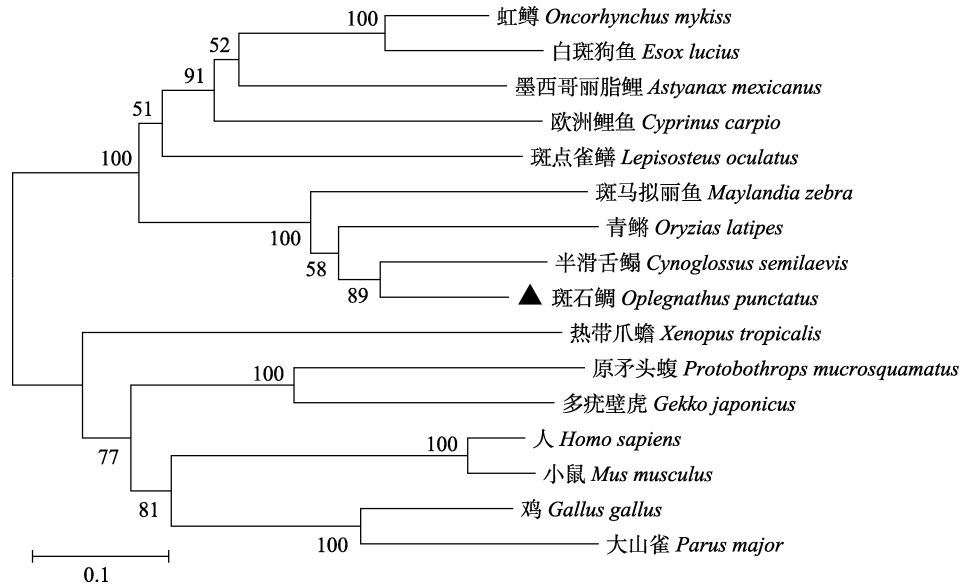


图 3 斑石鲷 *TGF-β1* 与其他物种 *TGF-β1* 系统进化分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of *TGF-β1* among *O. punctatus* and other different species

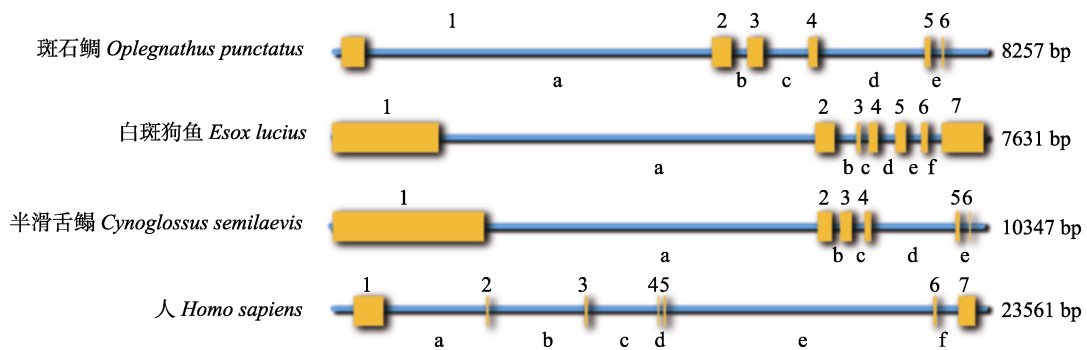


图 4 斑石鲷、白斑狗鱼、半滑舌鲷和人的 *TGF-β1* 基因结构
Fig.4 Structure of *TGF-β1* gene in *O. punctatus*, *E. Lucius*, *C. semilaevis* and *H. sapiens*

黄色方框代表外显子，直线代表内含子。■ exon ■ intron

The yellow box represents the exon and the straight line represents the intron

斑石鲷(*O. punctatus*): 1: 332 bp; 2: 291 bp; 3: 239 bp; 4: 155 bp; 5: 116 bp; 6: 50 bp;

a: 4411 bp; b: 164 bp; c: 541 bp; d: 1332 bp; e: 113 bp.

白斑狗鱼(*E. lucius*): 1: 1295 bp; 2: 270 bp; 3: 80 bp; 4: 147 bp; 5: 154 bp; 6: 115 bp; 7: 532 bp;

a: 4295 bp; b: 198 bp; c: 107 bp; d: 159 bp; e: 153 bp; f: 131 bp.

半滑舌鲷(*C. semilaevis*): 1: 2492 bp; 2: 279 bp; 3: 242 bp; 4: 150 bp; 5: 115 bp; 6: 60bp;

a: 5351 bp; b: 79 bp; c: 154 bp; d: 1326 bp; e: 102 bp.

人(*H. sapiens*): 1: 553 bp; 2: 162 bp; 3: 121 bp; 4: 80 bp; 5: 160 bp; 6: 173 bp; 7: 304 bp;

a: 4234 bp; b: 3429 bp; c: 2497 bp; d: 128 bp; e: 9590 bp; f: 903 bp.

2.3 斑石鲷 *TGF-β1* 基因的相对表达量

2.3.1 *TGF-β1* 基因在正常斑石鲷各组织中的相对表达量 qRT-PCR 健康组织的表达结果显示, *TGF-β1* 基因在斑石鲷各个组织中均有表达, 其中, 在肝脏、头肾、肠、皮肤、鳃中表达量较高, 头肾最高; 在脾脏、肾脏、胃、脑中表达量较低, 脾脏最低(图 5)。

2.3.2 斑石鲷虹彩病毒感染后 *TGF-β1* 基因的相对表达量的变化 在肝脏中呈现出先升高后降低的趋势, 在 4 d 时表达量最高, 约是 0 d 的 2.7 倍; 在头肾中呈现波动的趋势, 0~4 d 升高, 第 4 天是 0 d 的 1.94 倍, 4~7 d 降低, 7~10 d 再度升高, 10 d 时表达量最高, 是 0 d 的 2.5 倍; 脾脏与头肾的趋势类似, 不过在 4 d 时表达量最高, 是 0 d 的 3.1 倍; 在肾脏中呈现先下降后升高的趋势, 0~7 d 下降, 7~10 d

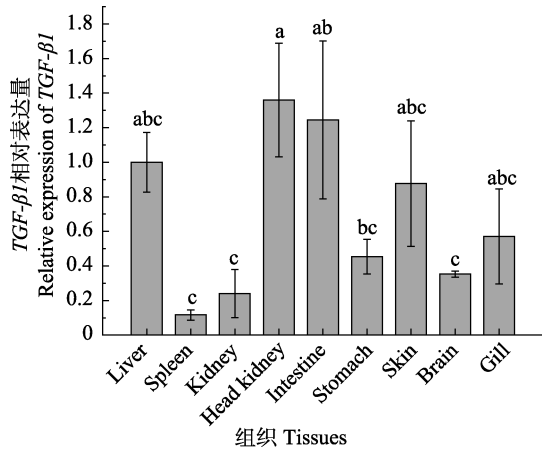


图5 *TGF-β1* 基因在健康斑石鲷组织中的相对表达量
Fig.5 The relative expression of *TGF-β1* gene in normal tissues of *O. punctatus*

a、b 和 c 表示在 SPSS 19.0 软件中的 Duncan 分组。同一字母表示无显著差异 ($P>0.05$), 不同字母表示显著差异 ($P<0.05$)。下同

The letters of 'a, b and c' indicated the Duncan grouping in SPSS 19.0 software. The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), the different letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same applies below

升高, 其中, 7 d 时表达量最低, 是 0 d 的 0.38 倍 (图 6)。

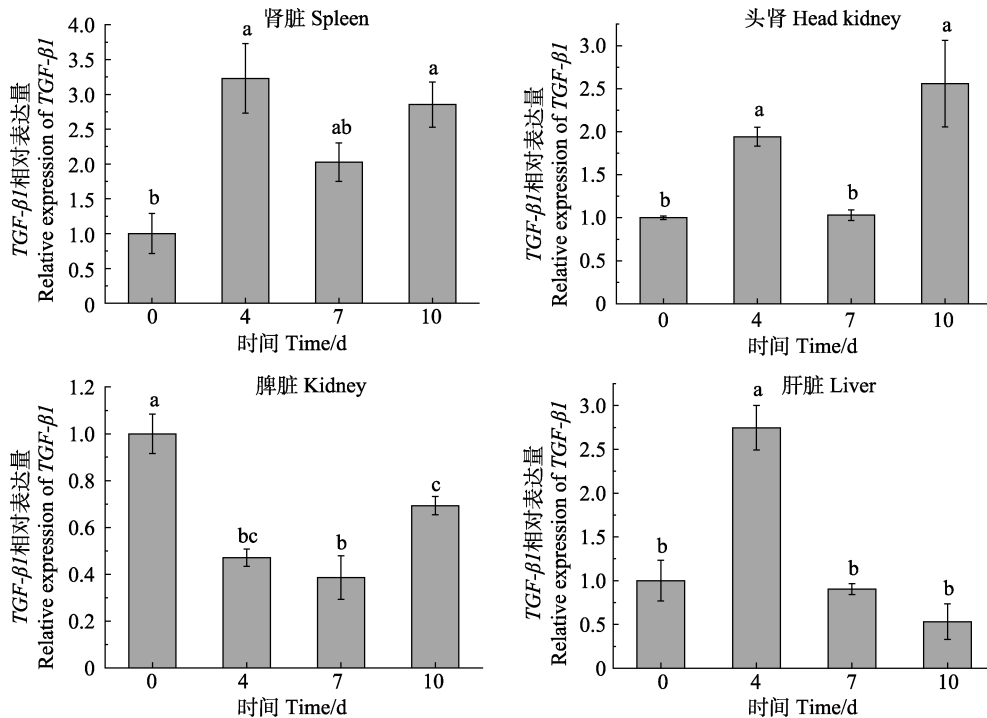


图6 斑石鲷感染斑石鲷虹彩病毒 4 种组织(肝脏、肾脏、头肾和脾脏)中 *TGF-β1* 基因的相对表达量
Fig.6 Relative expression of *TGF-β1* gene in four tissues (liver, spleen, kidney, and head kidney) of *O. punctatus* at different time points after SKIV infection

3 讨论

本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆得到了斑石鲷 *TGF-β1* 基因的 cDNA 全长序列, 研究了斑石鲷在健康组织和响应虹彩病毒刺激后 *TGF-β1* 相对表达量的变化。对 *TGF-β1* 基因的多重氨基酸序列比对结果分析, 发现参与比对的不同物种 *TGF-β1* 蛋白结构比较相似, 都包含 1 个前导肽(第 19~260 氨基酸)和 1 个 *TGF-β* 结构域(第 291~388 氨基酸)。但相对而言, 不同鱼类之间 *TGF-β* 序列更为相似, 而在不同纲之间差异较大, 例如, 斑石鲷与人类 *TGF-β1* 氨基酸序列相似度为 47.34%, 与半滑舌鳎相似度为 76.67%。*TGF-β* 蛋白起初是以未激活的形式从细胞中分泌出来的, 称为休眠 *TGF-β* 或小休眠复合体。对克隆得到的 *TGF-β1* 基因的氨基酸序列分析证明其包含 1 个前导肽。*TGF-β* 家族有 9 个半胱氨酸, 这 9 个半胱氨酸中的 8 个会每 2 个为 1 组形成半胱氨酸结(Cysteine knot), 这个结构是整个 *TGF-β* 超家族所共有的特征, 第 9 个半胱氨酸会通过共价的二硫键与另外一个次单元的半胱氨酸形成二聚体。其他的 *TGF-β* 结构主要以非共价的疏水性相互作用力(Hydrophobic interactions)形成其二级结构。第 5 个与第 6 个半胱氨酸之间含有最多的氨基酸变异区域, 而这段区域是使

TGF-β 分子暴露在外, 使不同的 *TGF-β* 与不同受体分子相互识别并相互结合的区域(Daopin *et al*, 1992)。

鱼类免疫主要以先天性免疫为主。大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 抗体的产生需要 4~6 周时间, 并且依赖温度, 然而病原体的侵袭在短短几天内就可以造成鱼体死亡, 因此, 鱼类抗病原体的免疫应答中, 先天性免疫在感染初期发挥主要作用, 由肾脏、脾脏及粘膜相关淋巴组织(存在于鳃、消化道等富含粘膜层的组织中)执行(Ellis, 2001); 另外, 在许多物种的肝脏移植研究中发现, 肝脏也具有免疫调节功能(Qian *et al*, 1997)。对斑石鲷健康组织相对表达量分析发现, *TGF-β1* 基因在斑石鲷各个组织中均有表达, 并且具有组织特异性, 其中, 头肾表达量最高, 这与罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 健康组织中的情况一致(Zhan *et al*, 2015), 在肝脏、肠、皮肤和鳃中表达量较高, 可能是由于 *TGF-β1* 主要分布在细胞分化旺盛或与外界有直接接触并且含有大量淋巴组织的外周免疫器官之中, 这些组织含有大量的未被激活的 *TGF-β1*, 作为免疫应答的启动因子储存。*TGF-β1* 在斑石鲷头肾、脾脏和肝脏中相对表达量的变化则有可能与 *TGF-β1* 在免疫过程中发挥的双重调节作用有关。其中, 病毒感染后的第 4 天斑石鲷开始发病, 头肾、脾脏、肝脏中的上调可能代表 *TGF-β1* 是促进免疫应答的, 一些研究表明, *TGF-β* 可以在感染部位招募单核细胞和中性粒细胞, 触发促炎性细胞因子表达(如 *TNF-α*、*IL-γ* 等), 激活白细胞促进其对感染细胞的吞噬和抗原的呈递, 放大炎症反应(Li *et al*, 2006; McGeachy *et al*, 2007; Wan *et al*, 2007), 这可以帮助机体对抗病毒的侵袭; 随后表达下降(第 7 天), 但在第 10 天, 脾脏和头肾再度上调可能是与其抑制或终止免疫应答有关, 有研究证明, *TGF-β* 可以直接下调其他促炎性细胞因子的表达, 参与炎症的消退(Roberts *et al*, 1993), 可以避免机体过度炎症反应引起的损伤, *TGF-β* 的双重调节机制可能依赖于作用部位的体液环境, 受调控细胞类型和自身浓度梯度影响。无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 感染罗非鱼的实验中, 头肾 *TGF-β1* 也表现出在 0~4 d 升高, 随后下降的趋势, 但其在 10 d 时并未再度升高, 与本研究肝脏情况一致, VHSV (Viral haemorrhagic septicemia virus) 感染虹鳟的实验中, *TGF-β1* 在头肾组织中也呈现先升高后下降的趋势, 非致病性病毒株感染组在第 3 天达到峰值, 致病性病毒株感染组在第 5 天达到峰值(Maehr *et al*, 2013)。至于病毒感染后肾脏中 *TGF-β1* 表达一直呈下调趋势, 这种变化则十分

有趣。由于虹彩病毒主要感染部位是脾脏和肾脏, 这可能是由于在感染后主要是头肾而非整个肾脏发挥主要免疫作用而造成的。哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染半滑舌鲷的实验中, 感染后的 72 h 内, 半滑舌鲷肝脏、脾脏和肾脏中 *TGF-β1* 呈现先上升后下降的表达趋势, 不同组织达到峰值的时间并不相同, 肝脏 48 h、脾脏 24 h、肾脏 12 h (李雪等, 2016), 而本研究中 *TGF-β1* 表达量在第 4 天时出现显著升高(肝脏、脾脏和肾脏), 随后回落, 这可能是由于感染初期病毒处于潜伏期, 机体免疫应答处于持续增强阶段, 到第 4 天时达到较高水平, 随后, 随着机体免疫功能的自我调节, *TGF-β1* 的表达水平逐渐回落。本研究发现, *TGF-β1* 可能参与了斑石鲷对虹彩病毒的免疫应答, 并在其中发挥一定作用, 希望能为深入研究 *TGF-β1* 基因在斑石鲷免疫应答过程中发挥的作用提供借鉴。

4 结论

斑石鲷 *TGF-β1* 基因 cDNA 序列与半滑舌鲷 *TGF-β1* 基因序列最相似。健康斑石鲷中, *TGF-β1* 基因主要在头肾、肝和肠中表达; 虹彩病毒感染后, *TGF-β1* 基因表达量显著上调, 揭示了 *TGF-β1* 可能与斑石鲷抗虹彩病毒免疫应答有关。

参 考 文 献

- Chou HY, Hsu CC, Peng TY. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathology*, 1998, 33: 201-206
- Chua FHC, Ng ML, Ng KL, *et al*. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease' affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Journal of Fish Diseases*, 1994, 17: 417-427
- Daniels GD, Secombes CJ. Genomic organization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* *TGF-beta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23(2): 139-147
- Daopin S, Piez K, Ogawa Y, *et al*. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: An unusual fold for the superfamily. *Science*, 1992, 257(5068): 369-373
- Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 827-839
- Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, 2009, 130(1): 7-15
- Gibson-Kueh S, Netto P, Nghoh-Lim GH, *et al*. The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129(2-3): 111-119
- Goorhai R, Dixit P. A temperature-sensitive (TS) mutant of frog

- virus 3 (FV3) is defective in second-stage DNA replication. *Virology*, 1984, 136(1): 186–195
- Haddad G, Hanington PC, Wilson EC, *et al.* Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(6): 654–663
- Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nature Immunology*, 2005, 6(12): 1198–1205
- He JG, Wang SP, Zeng K, *et al.* Systemic disease caused by an iridovirus like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 23(3): 219–222
- Inoue K, Yamano K, Maeno Y, *et al.* Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1992, 27: 19–27
- Jung SJ, Oh MJ. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(3): 223–226
- Kehrl JH. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine*, 1986, 163(5): 1037–1050
- Kohli G, Hu S, Clelland E, *et al.* Cloning of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta 1 in oocyte maturation. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1931–1941
- Le Y, Yu X, Ruan L, *et al.* The immunopharmacological properties of transforming growth factor beta. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(13–14): 1771–1782
- Li MO, Wan YY, Shomyseh S, *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2006, (24): 99–146
- Li X, Chen SL, Yang CG, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of transforming growth factor TGF- β 1 and TGF- β 3 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) following stimulation with *Vibrio harveyi*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(6): 889–898 [李雪, 陈松林, 杨长庚, 等. 半滑舌鲷转化生长因子 TGF- β 1 和 TGF- β 3 基因的克隆及受哈维氏弧菌感染后表达分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(6): 889–898]
- Maehr T, Costa MM, Vecino JL, *et al.* Transforming growth factor- β 1b: A second TGF- β 1 paralogue in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that has a lower constitutive expression but is more responsive to immune stimulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 420–432
- Matsuoke S, Inouye K, Nakajima K. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathology*, 1996, 31(4): 233–234
- McCarty-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM. TGF-beta: A balancing act. *International Reviews of Immunology*, 1998, 16(5–6): 553–580
- McGeachy MJ, Cua DJ. T cells doing it for themselves: TGF-beta regulation of Th1 and Th17 cells. *Immunity*, 2007, 26(5): 547–549
- Miyata M, Matsuno K, Jung SJ, *et al.* Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(2): 127–134
- Nakajima K, Sorimachi M. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1994, 29(1): 29–33
- Nakajima K, Inouye K, Sorimachi M. Viral diseases in cultured marine fish in Japan. *Fish Pathology*, 1998, 33(4): 181–188
- Oshima S, Hata JI, Hirasawa N, *et al.* Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 32(2): 87–90
- Qian S, Thai NL, Lu L, *et al.* Liver transplant tolerance: mechanistic insights from animal models, with particular reference to the mouse. *Transplant Reviews*, 1997, 11(3): 151–164
- Qin QW, Shi C, Gin KY, *et al.* Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp. *Journal of Virological Methods*, 2002, 106(1): 89–96
- Roberts AB, Rosa F, Roche NS, *et al.* Isolation and characterization of TGF-beta 2 and TGF-beta 5 from medium conditioned by *Xenopus* XTC cells. *Growth Factors*, 1990, 2(2–3): 135–147
- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors*, 1993, 8(1): 1–9
- Senturk S, Mumcuoglu M, Gursoy-Yuzugullu O, *et al.* Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology*, 2010, 52(3): 966–974
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunology*, 2005, 6(12): 1191–1197
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, *et al.* Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor β 1. *Fish and Shellfish Immunology*, 2003, 14(5): 405–421
- Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 2000, 24(Supplement 1): S70–S77
- Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, *et al.* Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *Journal of Cell Biology*, 1989, 108(2): 661–669
- Wan YY, Flavell RA. ‘Yin-Yang’ functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological Reviews*, 2007, 220(1): 199–213
- Wang RQ, Wang N, Wang RK, *et al.* The identification of tyrp1a and tyrp1b in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the regulation study of tyrp1a and mmu-miR-143-5p_R+2. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 49–58 [王若青, 王娜, 王仁凯, 等. 牙鲆 tyrp1a 和 tyrp1b 的鉴定及 tyrp1a 与 mmu-miR-143-5p_R+2 的调控关系. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 49–58]
- Wang SY, Wang L, Chen ZF, *et al.* Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene in the half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*).

- Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 51–57]
- Wei H, Yin LC, Feng SY, *et al.* Dual-parallel inhibition of IL-10 and TGF-β1 controls LPS-induced inflammatory response via NF-κB signaling in grass carp monocytes/macrophages. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 44(2): 445–452
- Yang M, Wang Y, Wang X, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Foxp1a/1b/2: Evidence for their involvement in the activation of peripheral blood lymphocyte subpopulations. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(2): 289–295
- Yang M, Wang X, Chen D, *et al.* TGF-β1 exerts opposing effects on grass carp leukocytes: Implication in teleost immunity, receptor signaling and potential self-regulatory mechanisms. PLoS One, 2012, 7(4): e35011
- Yang M, Zhou H. Grass carp transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes. Molecular Immunology, 2008, 45(6): 1792–1798
- Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. Journal of Biochemistry, 2010, 147(6): 781–792
- Zhan XL, Ma TY, Wu JY, *et al.* Cloning and primary immunological study of TGF-β1 and its receptors TβR I/TβR II in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Developmental and Comparative Immunology, 2015, 51(1): 134–140

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of *TGF-β1* in Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)

WANG Shan^{1,2}, XU Wenteng¹, LI Ming^{1,2}, WANG Jie^{1,2}, WANG Lei¹, ZHAI Jieming³, CHEN Songlin^{1①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261400)

Abstract Iridovirus has a wide infection spectrum in aquatic animals, which is harmful to aquaculture. In spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*), iridovirus is the major factor causing large-scale mortality. Iridovirus infection results in high mortality rate and thus limits the development of the spotted knifejaw industry. As an important immunoregulatory factor, *TGF-β1* plays a vital role in viral immune response. In order to study its role in the process of iridovirus infection, we have cloned this gene and studied its spatiotemporal expression patterns. The total length of *TGF-β1* gene is 3157 bp, including 5'-untranslated region (UTR) of 712 bp, 3'-UTR of 1278 bp. The open reading frame length is 1167 bp that encodes 388 amino acids, including 6 exons and 5 introns. Homologous alignment showed that the amino acid sequence of *TGF-β1* in spotted knifejaw had a close identity to *Cynoglossus semilaevis*, of about 76.67%. *TGF-β1* is widely distributed in tissues, and high expressed in the head kidney, intestine, liver, skin, but shows a relatively low expression in the spleen and kidney. To further illustrate the expression patterns of *TGF-β1* during viral infection, we have analyzed the expression patterns of *TGF-β1* in the spleen, liver, kidney, and head kidney at different time points after iridovirus infection. In head kidney, spleen and liver, the expression of *TGF-β1* was increased post infection. The peak level in the spleen and liver appeared 4 days post infection (dpi), and in the head kidney the peak appeared at 10 dpi. In the kidney, viral infection seemed to downregulate *TGF-β1* expression. The highest expression was observed at day 0, then decreased at 4 dpi and reach the lowest level at 7 dpi. At 10 dpi, the expression had recovered but still lower than level of day 0. These results suggest that *TGF-β1* could respond to iridovirus infection and may play an important role in the process of viral immunity. However, the different expression pattern of *TGF-β1* in different tissues after viral infection requires further study.

Key words *Oplegnathus punctatus*; Iridovirus; *TGF-β1*

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190226001

http://www.yykxjz.cn/

陶筱帆, 谢婷婷, 李小霞, 罗军涛, 白雅静, 韩兵社, 张俊芳. 低温驯化下斑马鱼 *LINE1* 的表达检测. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 88–93

Tao XF, Xie TT, Li XX, Luo JT, Bai YJ, Han BS, Zhang JF. Expression of *LINE1* in zebrafish (*Danio rerio*) during cold acclimation. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 88–93

低温驯化下斑马鱼 *LINE1* 的表达检测*

陶筱帆¹ 谢婷婷¹ 李小霞¹ 罗军涛¹
白雅静^{1,2} 韩兵社^{1,2,3} 张俊芳^{1,2,3}^①



- (1. 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 上海 201306;
2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;
3. 上海海洋大学 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306)

摘要 长散布核元件-1(Long spread nuclear element-1, *LINE1*)是跳跃基因。前期比较基因组研究发现, 南极鱼经历漫长的低温适应进化后, 与南极圈外的同亚目鱼类相比较, 在基因水平上 *LINE1* 的扩增效率高达 8~300 倍, 但 *LINE1* 的扩增与鱼类抵御寒冷之间的关系尚未明了。本实验对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎成纤维细胞 ZF4 进行了不同时间梯度的低温处理(18℃、5 d 和 18℃、30 d), 同时对斑马鱼成鱼也进行了不同时间的低温处理(10℃、3 h、6 h、1 d、3 d、5 d)。采用 RT-qPCR 检测了 *LINE1* 的 mRNA 水平, 并克隆了斑马鱼 *LINE1* 基因启动子区, 利用 Luciferase 双荧光报告系统, 在 ZF4 细胞中验证 *LINE1* 5'UTR 在低温压力下的生物活性。结果显示, 短时间低温处理下, ZF4 细胞中 *LINE1* mRNA 水平有所降低, 而在长时间低温处理中, *LINE1* 的 mRNA 水平显著升高。在成鱼中, 短时间低温处理下, *LINE1* mRNA 水平降低; 长期低温处理下, *LINE1* mRNA 水平显著升高。在 ZF4 细胞中发现, *LINE1* 5'UTR 具有生物活性。在低温处理(18℃, 3 d)下, 报告基因信号减弱, 间接表明 *LINE1* 启动子活性减弱。研究结果表明, 低温压力会影响 *LINE1* 在鱼类中的表达。本研究为进一步探究 *LINE1* 在鱼类适应低温环境中的作用机制奠定了基础。

关键词 *LINE1*; 低温; 斑马鱼; ZF4 细胞; 启动子

中图分类号 Q74 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)03-0088-06

真核生物基因组中存在大量的转座子元件, 包含 *LINE1*、*Alu* 和 *SVA*。迄今为止, 3 种逆转座子依旧具有活性: *LINE1*、*Alu* 和 *SVA* 元素。*LINE1* 逆转座子包含 5'UTR、2 个开放阅读框及具有 PolyA 尾的 3'UTR (Dombroski *et al*, 1991)。*LINE1* 属跳跃基因, 占人类

基因组约 17%, 为自主转座, 通过 RNA 中间体自我传播; 而 *Alu* 和 *SVA* 为非自主转座(Lander *et al*, 2001)。它们利用“复制-粘贴”机制, 通过 RNA 中间体在整个基因组中繁殖, 这一过程称为逆转录(Lu *et al*, 2016)。逆转座子的转座导致基因组改变, 多数时候给基因组

* 国家自然科学基金项目(31372516; 81770165)、上海市教育委员会“东方学者”计划和上海市人才发展资金项目(201457)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31372516; 81770165), and Project of Shanghai Education Commission “Oriental Scholars” Program, and Shanghai Talent Development Fund Project (201457)].

陶筱帆, E-mail: 512099587@qq.com

① 通讯作者: 张俊芳, 教授, E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-02-26, 收修改稿日期: 2019-03-14

带来负面影响,如:改变基因组结构、影响基因表达、改变基因调控方式等(Gilbert *et al*, 2005; Tubio *et al*, 2014)。因此,宿主基因会通过启动子区域甲基化或者小 RNA 干扰等机制来抑制转座(Kinomoto *et al*, 2007; Levin *et al*, 2011)。但研究表明,转座元件与基因组是互益的(Faulkner *et al*, 2009),逆转座子的转座可导致新基因产生,这对于物种多样性和物种进化具有积极意义(Hamon *et al*, 2011; Volf *et al*, 2000)。

鱼类作为变温动物,水温变化在很大程度上影响其生理及行为(Perry *et al*, 2005)。南极大陆经历了漫长降温,水温常年处于 0℃ 以下(Gordon, 2003),南极圈内与南极圈外同亚目鱼类相比较逆转座子的扩增倍率在 8 倍以上,有些甚至高达 300 倍(Chen *et al*, 2008)。这些基因可能参与了鱼类适应寒冷的过程,在漫长的历史进化中变化。同时,研究发现,在面对环境压力时,逆转座子 *LINE1* 的逆转座活性会受到环境因素影响(Butelli *et al*, 2012)。因此,推测寒冷可能会导致鱼类 *LINE1* 逆转座子扩增,并且可能与鱼类适应寒冷环境相关。

斑马鱼(*Danio rerio*)体型纤细,成体长为 3~4 cm,对水质要求不高。孵出后约 4 个月达到性成熟,成熟鱼每隔几天可产卵一次,卵子体外受精,体外发育,胚胎发育速度快,胚体透明、子代多、遗传背景清楚,容易进行实验操作,易于在实验室内繁殖饲养,与人类基因 87% 相似(Watanabe *et al*, 2016),作为一种模式生物应用于生物学中(Howe *et al*, 2013; Sollars *et al*,

2003)。斑马鱼 ZF4 细胞来自孵化后 1 d 的斑马鱼胚胎(Driever *et al*, 1993),被广泛用于生物学实验中(Hu *et al*, 2015)。为研究低温对 *LINE1* 的影响,本研究检测了斑马鱼 ZF4 细胞 18℃ 培养 5 d 和 30 d、10℃ 培养 3 h、6 h、1 d、3 d、5 d *LINE1* mRNA 水平以及通过报告基因监测 *LINE1* 基因 5'UTR 在 18℃ 3 d 的活性变化,为研究寒冷环境下鱼类基因组中 *LINE1* 的表达变化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 ZF4 细胞和斑马鱼

斑马鱼胚胎成纤维细胞 ZF4 购买于 ATCC (American Type Culture Collection)。斑马鱼由实验室斑马鱼鱼房饲养,恒温循环水系统,水温为 27℃~28℃, pH 为 6.8~7.8,用丰年虫(*Artemia salina*)饲养。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清和胰蛋白酶、DMEM:F12 液体培养基购于 Gibco 公司; T4 连接酶和限制性内切酶购于 New England; SYBR Green 购于罗氏公司; Lipofectamine3000 购于英潍捷基贸易有限公司; RT-qPCR 反转录试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司; 双荧光报告系统试剂盒购于 Promega 公司,引物由上海生工生物工程有 限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增引物
Tab.1 PCR amplification primers

引物 Primer	正向引物序列 Sequence of primer F	反向引物序列 Sequence of primer R
<i>LI-1</i>	CTAGCTAGCGGGCGCTACTGAGCAGGCG	CGGGGTACCTTGGATTTATAGAGAACC
<i>LI-1B</i>	CTAGCTAGCGCTTCCGGTTTGGTCGGC	CGGGGTACCAGCCAATTAGGCTCGAGAAAG
<i>LINE1-1</i>	ATGGCGGGCAAACACTACGTAA	TCAGT GTGTTCGGCTFFCTC
<i>LINE1-1B</i>	ATGGCTG GCAAGCGCAA	GAGGACGAGCTC TTGGTTAGTT
β -actin	CGCGCAGGAGATGGGA ACC	CAACGGAAACGCTCATTGC

主要仪器:细胞低温培养箱(Galaxy170R, eppendorf)、LightCycler 480 II (罗氏); 酶标仪(Bio-Rad 公司); NanoDrop2000 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 实时荧光定量 PCR

应用 IDT 引物设计软件(<http://sg.idtdna.com/sessionTimeout.aspx>)设计 RT-qPCR 引物(*LINE1-1*, *LINE1-1B*, 表 1)。采用 Trizol 方法提取斑马鱼细胞和肌肉组织的 RNA,使用 TaKaRa 反转录试剂盒(货号:RR047A)进行反转录实验,以反转录的 cDNA 为模板,进行 SYBR Green 荧光定量 PCR 实验。PCR 条

件:95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。每个样品 3 个生物学重复, *LINE1* 相对表达量的计算方法用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算, β -actin 作为内参。

1.4 载体构建及报告基因检测

提取斑马鱼细胞基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,上下游引物(*LI-1*, *LI-1B*, 表 1)分别引入酶切位点 *Kpn* I 和 *Nhe* I, 利用 PCR 扩增基因 5'UTR, *Kpn* I、*Nhe* I 酶切后用 T4 连接酶连接至载体 PGL4.10 中,将重组质粒转化到大肠杆菌内。

选择生长状态良好的 ZF4 细胞接种于 6 孔板中, 次日细胞完全贴壁后弃除培养基, 按 Lipofectamine3000 说明书进行转染。

采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 进行双荧光报告基因活性检测, 按说明书进行测定。

1.5 统计分析方法

统计学分析应用 GraphPad Prism 5 (GraphPad software, 美国)软件分析。*LINE1* 的表达数据和双荧光检测数据均来自 3 次独立重复实验, 采用 Student's *t*-test 方法分析统计学差异, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼胚胎成纤维细胞(ZF4)和斑马鱼成鱼在低温处理下 *LINE1* 的表达变化

有研究表明, 长期生活在低温环境的南极鱼基因组与南极圈外同亚目鱼类的基因组相比较, *LINE* 转座家族发生了 8~300 倍的扩增(Chen *et al*, 2008)。本研究选取 *LINE1* 的 2 个基因 *LINE1-1* 和 *LINE1-1B* 进

行实时荧光定量 PCR。在斑马鱼成鱼中, 10°C 为斑马鱼低温生存的临界温度, 因此, 选取 10°C 作为鱼类低温处理温度。与在常温(28°C)饲养的成鱼相比, 在 10°C 低温处理 3 h 和 6 h 的成鱼肌肉组织中 *LINE1-1* 的 mRNA 水平(图 1A)有所下调, 而在 10°C 低温处理 1 d、3 d、5 d 的成鱼肌肉组织中 *LINE1-1* mRNA 水平显著上调, 在成鱼中 *LINE1-1B* 的 mRNA 水平(图 1B)与 *LINE1-1* 的 mRNA 有相同趋势; 在 ZF4 细胞中, 选取 18°C 作为低温环境(Han *et al*, 2016), 与常温(28°C)细胞对比, 在 18°C 低温处理 5 d 的细胞中 *LINE1-1* 的 mRNA 水平有所下调, 而在 18°C 低温处理 30 d 的细胞 *LINE1-1* 的 mRNA 水平显著上调(图 1C)。

2.2 重组质粒构建与检测

实验室前期研究发现, 低温环境会引起 *LINE1* CpG 位点甲基化的改变(Han *et al*, 2016)。猜测低温环境会影响 *LINE1* 5'UTR 区域启动子的活性, 以斑马鱼基因组 DNA 为模板, 将 2 个 *LINE1* 基因的 5'UTR 区域进行 PCR 扩增(图 2)。

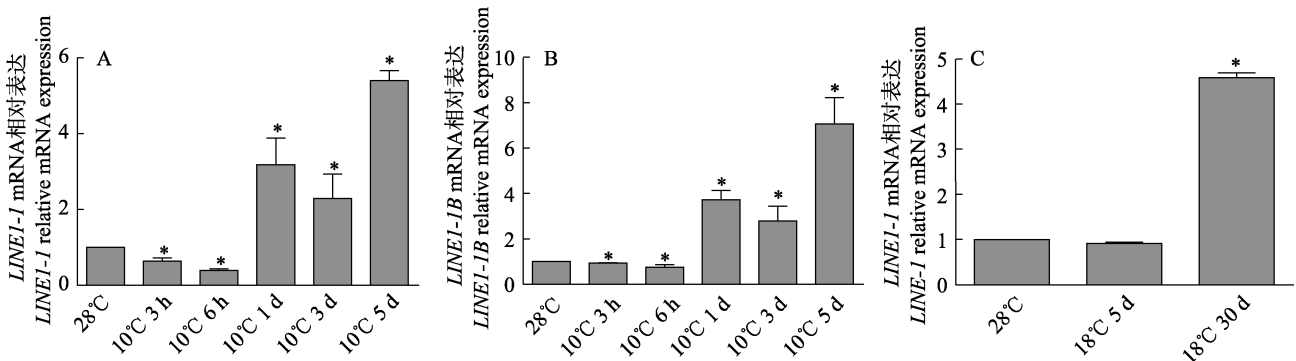


图 1 斑马鱼低温处理下 *LINE1* 表达的变化(*: $P < 0.05$,下同)

Fig.1 Expression changes of *LINE1* in zebrafish under low temperature treatment (*: $P < 0.05$. Same as below)

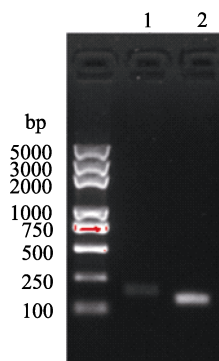


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of PCR products

1: *LINE1-1*-promoter; 2: *LINE1-1B*-promoter

载体 PGL4.10-basic 与 PCR 扩增片段经过 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 将 PCR 扩增产物插入 PGL4.10-basic 载体中(图 3), 将重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果与 PCR 扩增的基因序列相同, 重组质粒构建成功。

2.3 双荧光报告系统检测结果

通过检测相对荧光素酶活性, 间接检测 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性, *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性越高, 荧光素酶活性发光值越高。海肾荧光素作为检测系统内参, 当 *LINE1* 5'UTR 区域启动子没有生物

学活性时,不能检测到荧光素酶活性发光值。将构建的重组质粒转染进常温(28℃)培养 ZF4 细胞中,结果显示,与阴性对照 PGL4.10-basic 相比,重组质粒均能检测到荧光素酶活性发光值,而 PGL4.10-basic 不能检测到荧光素酶发光值,表明 *LINE1* 5'UTR 具有启动子活性(图 4A)。将重组质粒与 PGL4.10-basic 和

PGL3- promoter 转染到 18℃ 低温处理 3 d 的 ZF4 细胞中, PGL4.10-basic 为阴性对照, PGL3-promoter 为阳性对照,结果显示,与常温(28℃)细胞相比,重组质粒在低温处理下荧光素酶活性发光值均有不同程度的下降,表明短期低温处理会影响 *LINE1* 基因 5'UTR 区域启动子活性(图 4B)。

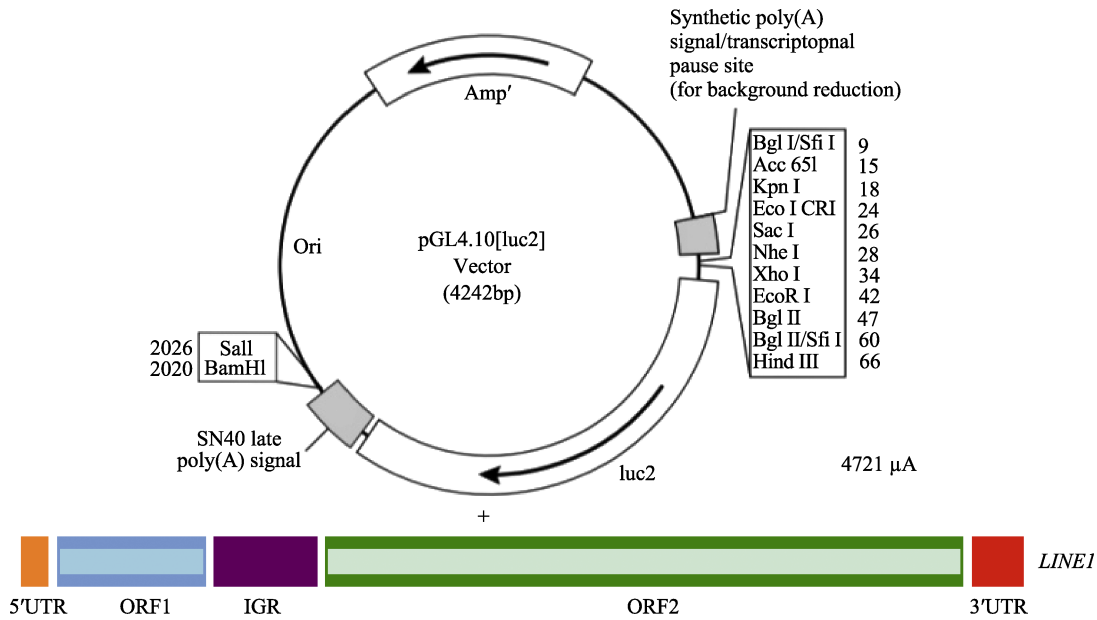


图 3 PGL4.10-*LINE1* 5'UTR 质粒构建

Fig.3 Plasmid construction map of PGL4.10-*LINE1* 5'UTR

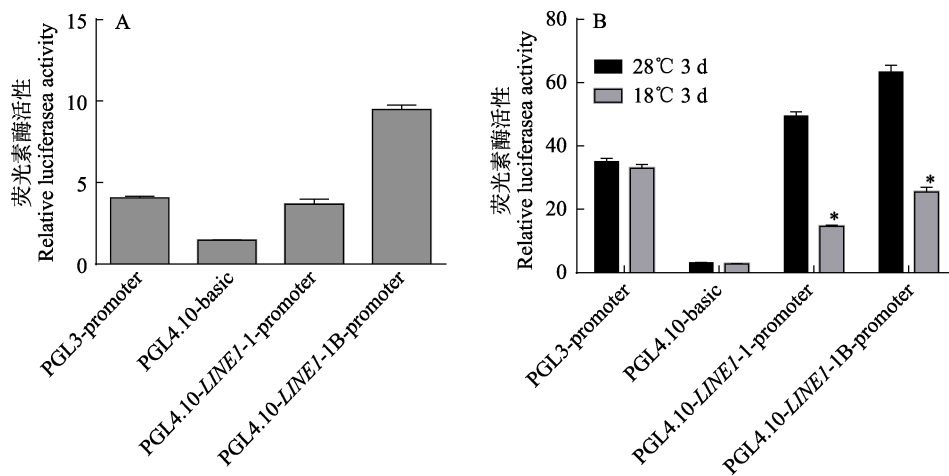


图 4 重组质粒 PGL4.10-*LINE1*-promoter 转染斑马鱼细胞后双荧光素酶相对活性分析

Fig.4 Analysis of relative activity of dual luciferase after transfection of zebrafish cells with recombinant plasmid PGL4.10-*LINE1*-promoter

3 讨论

LINE1 属于最丰富的一类自主转座因子。尽管多数 *LINE1* 被抑制活性,但依旧有很少一部分的 *LINE1* 具有活性, *LINE1* 的插入虽与疾病相关,但 *LINE1*

同样影响基因组的进化(Beck *et al*, 2011)。当面对环境因素刺激时,基因组进行自身进化诱导转座子转座(McClintock, 1984),使生物对环境变化做出适应性改变。在之前研究中发现,南极圈内物种与南极圈外物种转座子扩增效率存在巨大差异。在西西里血橙中,

寒冷诱导逆转座子的扩增(Butelli *et al.*, 2012)。这提示 *LINE1* 的扩增可能与生物体对长期寒冷环境的适应相关。为了研究逆转座子在长期低温环境下的大量扩增是否与生物体对寒冷环境的适应相关,将 ZF4 细胞培养在 18℃ 5 d,发现 ZF4 细胞生长明显停滞,而后 20 d 左右逐渐恢复生长状态,尽管相比 28℃ 依旧缓慢。本研究发现,短期低温处理诱导斑马鱼成鱼及斑马鱼 ZF4 细胞 *LINE1* 的 mRNA 水平下调,长期低温处理诱导斑马鱼成鱼及斑马鱼 ZF4 细胞 *LINE1* 的 mRNA 水平显著上调,推测 *LINE1* 对生物体适应外界低温环境压力可能有积极作用。生物体在寒冷环境下转座子转座水平升高,可能增加生物体基因型的多样性,使其对环境压力产生适应性进化。

在自然界中遵循着优胜劣汰的法则,从生物的进化开始,生物体内有益于适应环境、使生物体更好生存下去的基因会保留,垃圾基因会逐渐被淘汰,那么在长期寒冷环境中, L1 的显著扩增是否是生物体为了适应寒冷环境而选择的一种生物途径?在之前研究中发现, *LINE1* 启动子甲基化水平在低温环境下有所改变: 18℃ 低温处理 ZF4 细胞 5 d, *LINE1* 启动子甲基化水平升高,而低温处理 30 d 时,甲基化水平降低(Han *et al.*, 2016)。生物体会通过甲基化水平来调节 *LINE1* 表达水平, *LINE1* 与甲基化水平呈负相关关系(Hata *et al.*, 1997),因此,甲基化水平升高时, *LINE1* 被抑制, *LINE1* mRNA 水平呈下降趋势;当甲基化水平降低时, *LINE1* 激活, *LINE1* mRNA 水平呈上升趋势。据此推测,低温环境会通过影响 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性,进而影响 *LINE1* 的扩增。构建重组质粒发现,低温确实能引起 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性改变,推测这种调节可能是生物体应对外界低温环境压力的方式之一, L1 对生物体适应外界低温环境压力可能有积极作用。生物体在寒冷环境下转座子转座水平升高,可能增加生物体基因型的多样性,使其对环境压力产生适应性进化。

总之,本研究通过对斑马鱼细胞以及斑马鱼成鱼不同时间的低温处理,研究 *LINE1* 的表达变化,为更好了解 *LINE1* 在鱼类寒冷适应中的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, *et al.* LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2011, 12: 187–215
- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, *et al.* Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1242–1255
- Chen Z, Cheng CH, Zhang J, *et al.* Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(35): 12944–12949
- Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, *et al.* Isolation of an active human transposable element. *Science*, 1991, 254(5039): 1805–1808
- Driever W, Rangini Z. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 1993, 29(9): 749–754
- Faulkner GJ, Carninci P. Altruistic functions for selfish DNA. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 2009, 8(18): 2895–2900
- Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, *et al.* Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(17): 7780–7795
- Gordon AL. Oceanography: The brawnier retroflection. *Nature*, 2003, 421(6926): 904–905
- Hamon P, Duroy PO, Dubreuil-Tranchant C, *et al.* Two novel Tyl1-copia retrotransposons isolated from coffee trees can effectively reveal evolutionary relationships in the Coffea genus (Rubiaceae). *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2011, 285(6): 447–460
- Han B, Li W, Chen Z, *et al.* Variation of DNA methylome of zebrafish cells under cold pressure. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160358
- Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene*, 1997, 189(2): 227–234
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503
- Hu P, Liu M, Zhang D, *et al.* Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(19): 9198–213
- Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, *et al.* All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 2955–2964
- Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860–921
- Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews. Genetics*, 2011, 12(9): 615–627
- Lu XJ, Xue HY, Qi XL, *et al.* LINE-1 in cancer: Multifaceted functions and potential clinical implications. *Genetics in Medicine*, 2016, 18(5): 431–439
- McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 1984, 226(4676): 792–801
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, *et al.* Climate change and distribution

- shifts in marine fishes. *Science*, 2005, 308(5730): 1912–1915
- Sollars V, Lu X, Xiao L, *et al.* Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nature Genetics*, 2003, 33(1): 70–74
- Tubio JMC, Li Y, Ju YS, *et al.* Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science*, 2014, 345(6196): 1251343
- Volff JN, Korting C, Schartl M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(11): 1673–1684
- Watanabe E, Mano S, Nomoto M, *et al.* HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1. *Plant & Cell Physiology*, 2016, 57(11): 2245–2254

(编辑 冯小花)

Expression of *LINE1* in Zebrafish (*Danio rerio*) During Cold Acclimation

TAO Xiaofan¹, XIE Tingting¹, LI Xiaoxia¹, LUO Juntao¹, BAI Yajing^{1,2},
HAN Bingshe^{1,2,3}, ZHANG Junfang^{1,2,3}①

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The long-spread nuclear element-1 (*LINE1*) retrotransposon is a mobile element in genome. Previous comparative genomic studies found that Antarctic Notothenioid fish underwent a long low-temperature adaptation evolution, and compared with Notothenioid fish outside the Antarctic circle, *LINE1* genes were duplicated by 8~300 fold. The link between this augmentation and the resistance of fish to cold is not known. In this study, zebrafish (*Danio rerio*) embryonic fibroblasts ZF4 were exposed to a low temperature (18°C) for 5 days and 30 days, and adult zebrafish were exposed to a low temperature (10°C) for 3 h, 6 h, 1 d, 3 d, and 5 d. The mRNA expression of *LINE1* was examined using RT-qPCR. The promoter regions of zebrafish *LINE1* gene were cloned and the biological activity of *LINE1* 5'UTR at low temperature were verified in ZF4 cells by using the dual-luciferase reporter system. The following results were obtained: (1) In ZF4 cells, *LINE1* mRNA expression was decreased by short-term low temperature treatment, but was significantly increased by long-term low temperature treatment. (2) In adult fish, *LINE1* mRNA expression was decreased by short-term low temperature treatment, but was significantly increased in long-term low temperature treatment. (3) The *LINE1* 5'UTR was found to be biologically active in ZF4 cells. (4) It was found that during low temperature treatment (18°C, 3 d), the reporter gene signal was weakened, which indirectly indicated that the *LINE1* promoter activity was weakened. The results showed that low temperature stress affected *LINE1* expression in fish, which presents a foundation for further study on the mechanism of action of *LINE1* in fish adaptation to a low temperature environment.

Key words *LINE1*; Low temperature; *Danio rerio*; ZF4 cells; Promoter

① Corresponding author: ZHANG Junfang, E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190329001

http://www.yykxjz.cn/

陈炳霖, 肖炜, 邹芝英, 祝璟琳, 李大宇, 喻杰, 杨弘, 胡平各, 马银花. 正反交奥尼罗非鱼形态性状差异及对体质量的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 94-102

Chen BL, Xiao W, Zou ZY, Zhu JL, Li DY, Yu J, Yang H, Hu PG, Ma YH. Correlation analysis and morphological difference and contributions to body weight of reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 94-102

正反交奥尼罗非鱼形态性状差异 及对体质量的影响*



陈炳霖^{1,2} 肖炜^{1,2} 邹芝英² 祝璟琳² 李大宇²
喻杰² 杨弘^{1,2①} 胡平各^{1,2} 马银花^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081)

摘要 为探究不同杂交方式奥尼罗非鱼形态性状对体质量的影响,对埃及尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)与“夏奥1号”奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)正反交子代奥尼罗非鱼群体开展体质量(BW)与全长(TL)、体长(SL)、头长(HL)、体高(BD)、尾柄长(CPL)、尾柄高(CPD)、体厚(BWD)共7个形态性状测定与分析,判断影响奥尼罗非鱼体质量的主要性状,并建立体质量多元回归方程;采用单因素相关性分析、复相关分析、主成分分析等多元分析方法,比较了正反交奥尼罗非鱼的形态差异。结果显示,正交奥尼罗非鱼群体全长、体高和尾柄高3个性状对体质量产生主要影响,回归方程为 $Y_{BW} = -154.286 + 9.016X_{TL} + 10.065X_{BD} + 17.884X_{CPD}$;反交雌性奥尼罗非鱼群体全长和体高2个性状对体质量产生主要影响,回归方程为 $Y_{BW} = -92.582 + 7.415X_{TL} + 8.727X_{BD}$;反交雄性奥尼罗非鱼群体体长和体高2个性状对体质量产生主要影响,回归方程为 $Y_{BW} = -120.299 + 8.661X_{SL} + 16.590X_{BD}$ 。主成分分析构建了2个主成分,第1主成分主要代表TS、BDS、CDS、BWS和HS形态特征,第2主成分主要代表BS和CLS形态特征,对PCA1和PCA2作散点图可将正交雄鱼与反交雌鱼有效区分。研究表明,不同杂交方式、不同性别的奥尼罗非鱼影响体质量的形态特征均存在差别,在亲鱼挑选及子代选育工作中,建议采用多性状综合选育的方式,以提高选育培养结果的准确性和稳定性。

关键词 奥尼罗非鱼; 通径分析; 多元回归方程; 主成分分析; 多性状选育
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0094-09

罗非鱼(Tilapia)是联合国粮农组织(FAO)向全球推广养殖、食用的优质鱼类。自20世纪70年代年以

来,我国成功培养并推广了数个生长速度快、抗病能力强的罗非鱼品种,推动了我国水产养殖的发展。目

* 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(2017JBFZ03)和罗非鱼原良种保种选育(2130315)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-46), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes (2017JBFZ03), and the Fund for Breeding of Tilapia (2130315)].

陈炳霖, E-mail: chenbl_527@foxmail.com

① 通讯作者: 杨弘, 研究员, E-mail: yanghong@ffrc.cn

收稿日期: 2019-03-29, 收修改稿日期: 2019-04-17

前,作为我国罗非鱼主要养殖品种的奥尼罗非鱼是以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)♀和奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)♂为亲本的杂交种,其以雄性率高、生长速度快等特点,深受养殖者的喜爱(杨弘,2010)。在罗非鱼的选育过程中发现,由于环境影响和多种基因差异表达等因素限制,在选育过程中,仅建立体质量标准已很难满足养殖者对优良品种的选育要求(Neira *et al*, 2004; Rutten *et al*, 2005),因此,利用通径分析、回归分析、主成分分析等方法评估各形态特征对体质量的影响程度,筛选与体质量相关性较大的形态性状并以此建立选育标准,对选育成果的稳定性具有重要意义。近年来,在虾类(孙海峰等,2018)、蟹类(Ma *et al*, 2013)、贝类(Luo *et al*, 2013)、鱼类(李炎璐等,2016)等水产动物中均已开展上述相关性研究。目前,对以奥利亚罗非鱼为父本、尼罗罗非鱼为母本进行杂交的正交奥尼罗非鱼(尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)涉及雄性率、基因表达及选育的研究已较为广泛,而对反交奥尼罗非鱼(奥利亚罗非鱼♀×尼罗罗非鱼♂)的研究鲜有报道。对同龄同生长时期正反交奥尼罗非鱼进行形态特征对比分析,有利于探究杂交种的显著差异特征,为进一步提高杂种选育优势提供数据依据。

本研究利用国家罗非鱼产业技术体系保种的埃及尼罗罗非鱼和“夏奥1号”奥利亚罗非鱼进行正反杂交,对繁育的杂交子代各性状及生长数据进行跟踪测量,建立不同杂交方式下子代各性状对体质量影响的最优回归方程,开展了各个比例性状的主成分分析以及综合影响因素分析,以期为提高罗非鱼选育工作的准确性及稳定性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将尼罗罗非鱼埃及品系与“夏奥1号”奥利亚罗非鱼进行6×3(♀×♂)配组,正交和反交各1组。配组中,尼罗罗非鱼为我国从阿斯旺坝地区筛选引进的优良品种,“夏奥1号”奥利亚罗非鱼是以我国从美国引进的优良亲鱼群体为基础,结合遗传标记、杂种优势等方法,经历10代以上的群体选育形成的优良新品种(肖炜等,2012)。将2组在7d内产出的杂交子代鱼苗作为基础实验群体,分别放入相同规格的网箱(长×宽×高为4m×4m×1.5m)养殖1个月后,仔细观察正交子代及反交子代2个基础群体泄殖孔来区分幼鱼性别,由于随机挑选的300尾正交子代中只有雌性个体4尾,个体雄性率达98.67%,因此,本研

究不设置正交雌鱼实验组。挑选体型健壮的正交雄鱼、反交雌鱼和反交雄鱼各300尾,每100尾为1组,共9组,分别放入相同规格的网箱(4m×4m×1.5m)中养殖2个月,根据摄食情况统一投喂粗蛋白质含量高于28.0%的配合饲料,日投喂2次。

1.2 数据测量

采样前禁食24h,随机挑选正交雄鱼、反交雌鱼和反交雄鱼各50尾,使用MS-222麻醉后,用电子天平测量体质量(Body weight, BW)和内脏重(Visceral weight, VW),精确到0.01g;用直尺、游标卡尺测量全长(Total length, TL)、体长(Standard length, SL)、头长(Head length, HL)、体高(Body depth, BD)、尾柄长(Caudal peduncle length, CPL)、尾柄高(Caudal peduncle depth, CPD)、体厚(Body width, BWD)等形态性状,分别精确到0.1cm和0.002cm。

1.3 数据处理

运用Excel 2017和SPSS 24.0软件对各形态特征的统计数据进行分析,计算各形态特征的相关分析数据。

各性状参数平均值=数据总和/个体数

标准差 $SD = \sqrt{s^2}$, s^2 为各自变量的方差。

变异系数 $CV = SD/X \times 100\%$, SD 为标准差, X 为平均值。

脏体指数 $VSI = W_v/W_B \times 100\%$

式中, W_v 为内脏重, W_B 为体质量。

形态性状对体质量的通径系数 $P_i = b_{xi} \times \sigma_{xi} / \sigma_y$

式中, b_{xi} 为自变量的回归系数, σ_{xi} 为自变量的标准差, σ_y 为因变量的标准差。

单个形态性状对体质量的决定系数 $D_j = P_j^2$

式中, P_j 为该性状对体质量的通径系数。

2个性状对体质量的共同决定系数 $D_{ij} = 2r_{ij} \times P_i \times P_j$

式中, r_{ij} 为某2个性状间的相关系数, P_i 、 P_j 为性状对体质量的通径系数。

主成分分析:将各性状特征值与体长(SL)相比生成比例性状数据,对各比例性状数据进行主成分分析,分析体质量与各比例性状之间的关系及分布特征。

2 结果与分析

2.1 生长与形态性状的统计参数

正反交奥尼罗非鱼形态性状表型参数数据见表1。对正反交子代各形态特征进行方差统计及LSD检验,结果显示,反交雄鱼除体质量、全长、体长和尾柄长外,其他各性状特征值均显著高于正交雄鱼($P < 0.05$),正交及反交雄鱼各形态特征值均显著高于

反交雌鱼($P<0.05$)。正反交子代各形态性状中变异系数最大值均为体质量,正交雄鱼、反交雌鱼和反交雄鱼体质量变异系数分别为 17.5%、14.3%和 11.6%,说明各杂交组内体质量的特征值并不稳定,相比于组内其他各形态特征差异,组内体质量的差异较大。正反交子代脏体指数显示,正交雄鱼脏体指数显著高于反交雄鱼,但与反交雌鱼差异不显著($P>0.05$),说明

在相同饲养环境下,同龄反交雄鱼出肉率显著高于正交雄鱼,反交雌鱼出肉率介于正反交雄鱼二者之间。

2.2 形态性状间相关系数分析

正反交奥尼罗非鱼体质量与其他 7 个形态性状特征值之间的 Pearson 相关系数数据见表 2。正反交子代的体质量各形态性状的相关系数均达到了极显著

表 1 正反交奥尼罗非鱼形态性状表型参数

Tab.1 The apparent parameters of body weight and morphological traits for reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

性状 Traits	正交雄鱼 Forward hybrid males		反交雌鱼 Reverse hybrid females		反交雄鱼 Reverse hybrid males	
	Mean±SD	变异系 CV(%)	Mean±SD	变异系 CV(%)	Mean±SD	变异系 CV(%)
体质量 BW(g)	87.8±15.3 ^a	17.5	55.8±8.0 ^b	14.3	91.4±10.6 ^a	11.6
全长 TL(cm)	17.1±1.0 ^a	6.1	14.6±0.7 ^b	4.7	17.1±0.7 ^a	4.2
体长 SL(cm)	13.8±1.1 ^a	8.2	11.9±0.6 ^b	4.9	13.8±0.6 ^a	4.5
头长 HL(cm)	4.3±0.3 ^b	7.0	3.8±0.3 ^c	7.4	4.5±0.3 ^a	6.4
体高 BD(cm)	5.2±0.4 ^b	7.5	4.6±0.3 ^c	6.5	5.6±0.3 ^a	5.6
尾柄 CPL(cm)	1.5±0.2 ^a	10.2	1.3±0.1 ^b	9.5	1.6±0.2 ^a	9.8
尾柄 CPD(cm)	2.0±0.1 ^b	7.0	1.7±0.1 ^c	4.8	2.0±0.1 ^a	5.7
体厚 BWD(cm)	1.956±0.208 ^b	10.642	1.682±0.102 ^c	6.088	2.042±0.144 ^a	7.072
脏体指 VSI(%)	20.0±15.2 ^a	25.8	17.9±6.8 ^{ab}	38.3	16.1±3.9 ^b	24.1

注:同一行内参数后字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Note: The different letters on the parameters within the line mean significant difference ($P<0.05$)

表 2 正反交奥尼罗非鱼形态性状参数相关系数

Tab.2 The correlation coefficients of apparent parameters for reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

项目 Items	性状 Traits	体质量 BW	全长 TL	体长 SL	头长 HL	体高 BD	尾柄长 CPL	尾柄高 CPD	体厚 BWD
正交 Forward hybrid subgroups	体质量 BW		0.937**	0.811**	0.829**	0.837**	0.452**	0.825**	0.495**
	全长 TL			0.852**	0.855**	0.760**	0.510**	0.789**	0.483**
	体长 SL				0.805**	0.713**	0.340*	0.682**	0.332*
	头长 HL					0.744**	0.253	0.708**	0.470**
	体高 BD						0.279*	0.702**	0.388**
	尾柄 CPL							0.368**	0.076
	尾柄 CPD								0.399**
	体厚 BWD								
反交 Reverse hybrid subgroups	体质量 BW		0.864**	0.885**	0.761**	0.882**	0.334*	0.601**	0.499**
	全长 TL	0.880**		0.940**	0.766**	0.813**	0.350*	0.555**	0.560**
	体长 SL	0.845**	0.945**		0.737**	0.787**	0.423**	0.566**	0.574**
	头长 HL	0.454**	0.673**	0.674**		0.749**	0.331*	0.446**	0.383**
	体高 BD	0.790**	0.715**	0.678**	0.304*		0.269	0.645**	0.44**
	尾柄长 CPL	0.236	0.185	0.196	0.149	0.281*		0.203	0.259
	尾柄高 CPD	0.674**	0.681**	0.664**	0.301*	0.572**	0.325*		0.307*
	体厚 BWD	0.397**	0.376**	0.401**	0.207	0.331*	-0.065	0.206	

注:对角线下方为雌鱼表型性状相关系数;对角线上方为雄鱼表型性状相关系数。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$

Note: The apparent statistics below the diagonal were correlation coefficients in female fish; above the diagonal were in male fish. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

水平($P < 0.01$), 体质量与各性状间相关系数依次为全长>体长>体高>头长>尾柄高>体厚>尾柄长。反交子代中, 雌鱼体质量与尾柄长关系不显著($P > 0.05$), 与其他性状的相关系数均达到极显著水平($P < 0.01$), 体质量与各性状间相关系数依次为全长>体长>体高>尾柄高>头长>体厚>尾柄长; 雄鱼体质量与尾柄长关系达显著水平($P < 0.05$), 与其他性状的相关系数均达到极显著水平($P < 0.01$), 体质量与各性状间相关系数依次为体长>体高>全长>头长>尾柄高>体厚>尾柄长。正反交子代中尾柄长与体质量的相关系数最小, 体厚其次, 正交子代全长、头长、尾柄高与体质量的相关系数均高于反交子代, 而反交子代体高与体质量的相关系数均高于正交子代。

2.3 形态性状的回归分析

对正反交奥尼罗非鱼各形态特征进行 Kolmogorov-Smirnov Z 检验, 均满足正态分布($P > 0.05$)假设。使用逐步引入-剔除法, 以体质量为因变量, 各形态性状为自变量进行回归分析, 排除存在共线性的特征值, 并求得各形态特征对体质量的通径系数。各形态性状回归分析相关数据见表 3。正交子代引入了全长、体

高和尾柄高 3 个自变量, 回归方程式为 $Y_{BW} = -154.286 + 9.016X_{TL} + 10.065X_{BD} + 17.884X_{CPD}$, X_{TL} 、 X_{BD} 、 X_{CPD} 分别代表全长、体高和尾柄高。反交子代中, 雌鱼依次引入全长和体高 2 个自变量, 回归方程式为 $Y_{BW} = -92.582 + 7.415X_{TL} + 8.727X_{BD}$, X_{TL} 、 X_{BD} 分别代表全长和体高; 雄鱼依次引入体长和体高 2 个自变量, 回归方程式为 $Y_{BW} = -120.299 + 8.661X_{SL} + 16.590X_{BD}$, X_{SL} 、 X_{BD} 分别代表体长和体高。各个方程中, 回归截距及各自变量的偏回归系数均达到显著水平($P < 0.05$), 表明建立的 3 个回归方程均能精准反映正反交奥尼罗非鱼各保留特征与体质量的多元回归相关性。同时, 各回归方程的自变量、自变量偏回归系数及回归截距均不同, 表明不同杂交方式与不同性别的奥尼罗非鱼影响增重的具体方式不同。

2.4 各形态性状对体质量的影响程度和复相关分析

对正反交奥尼罗非鱼体质量回归分析结果所引入的各性状进行复相关分析数据见表 4。根据单个形态性状对体质量的决定系数和 2 个性状对体质量的共同决定系数, 计算出形态性状对体质量的决定系数数据见表 5。对角线上的数据是单一形态性状对体质量

表 3 正反交奥尼罗非鱼回归分析相关系数
Tab.3 The correlation coefficients of regression analysis for reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

项目 Items	保留性状 Retained traits	未标准化系数 Unstandardized coefficients	标准误差 Std. Error	标准化系数 Standardized coefficients	检验值 <i>t</i>	显著性 Sig.
正交雄鱼 Forward hybrid males	全长 TL	9.016	1.104	0.616	8.170	0.001
	体高 BD	10.065	2.544	0.257	3.956	0.001
	尾柄高 CPD	17.884	7.733	0.159	2.313	0.025
反交雌鱼 Reverse hybrid females	全长 TL	7.415	1.000	0.644	7.411	0.001
	体高 BD	8.727	2.297	0.330	3.799	0.001
反交雄鱼 Reverse hybrid males	体长 BL	8.661	1.451	0.501	5.970	0.001
	体高 BD	16.590	2.853	0.488	5.820	0.001

表 4 正反交奥尼罗非鱼形态性状对体质量的复相关分析
Tab.4 The multiple-correlation coefficients between morphometric traits and body weight for reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

项目 Items	正交雄鱼 Forward hybrid males	反交雌鱼 Reverse hybrid females	反交雄鱼 Reverse hybrid males
相关系数 <i>R</i>	0.961	0.909	0.935
决定系数 R^2	0.923	0.827	0.874
矫正决定系数 Adjusted R^2	0.918	0.819	0.869
标准误差 Std. Error of the Estimate	4.388	3.384	3.853
检验值 <i>F</i>	5.349	14.432	33.868
显著性 Sig.	0.025	0.001	0.001

表 5 正反交奥尼罗非鱼形态学性状对体质量的决定系数
Tab.5 The determinant coefficient of morphometric traits on the body weight for reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

项目 Items	正交 Forward hybrid subgroups			反交 Reverse hybrid subgroups			
	全长 TL	体高 BD	尾柄高 CPL	全长 TL	体长 BL	体高 BD	
雌鱼 Females				全长 TL	0.415	—	0.304
				体高 BD	—	—	0.109
雄鱼 Males	全长 TL	0.379	0.241	0.155	体长 BL	—	0.251
	体高 BD		0.066	0.057	体高 BD	—	0.238
	尾柄高 CPL			0.025			

量的决定系数, 对角线右上方的数据是 2 个性状共同影响下对体质量的决定系数。正交子代中, 各形态特征对体质量的回归分析按影响程度引入全长、体高、尾柄高 3 个自变量, 3 个变量对体质量的相关系数为 0.961, 决定系数为 0.923。全长、体高、尾柄高对正交子代体质量的决定系数由大到小依次为 0.379、0.066、0.025, 性状两两间对体质量影响共同决定系数由大到小依次为 0.241、0.155、0.057, 3 个形态特征协同作用对体质量的总决定系数为 0.923。反交子代中, 雌鱼各形态性状对体质量的回归分析按影响程度引入全长、体高 2 个自变量, 2 个变量对体质量的相关系数为 0.909, 决定系数为 0.827。全长、体高对反交雌鱼体质量的决定系数由大到小依次为 0.451、0.109, 性状两两间对体质量影响共同决定系数为 0.304, 2 个形态特征协同作用对体质量的总决定系数为 0.864; 雄鱼各形态性状对体质量的回归分析按影响程度引入体长、体高 2 个自变量, 2 个变量对体质量的相关系数为 0.935, 决定系数为 0.874。体长、体高对反交雄鱼体质量的决定系数由大到小依次为 0.251、0.238, 性状两两间对体质量影响共同决定系数为 0.385, 2 个形态特征协同作用对体质量的总决定系数为 0.874。复相关分析数据说明, 各杂交组所保留的各性状对体质量均产生较大影响, 且影响程度比回归分析中排除的其他各形态性状更大。

2.5 各形态性状主成分分析

对 7 个比例性状进行主成分分析, 最终提取出 2 个主成分。第 1 主成分 $PCA1=0.395BS+0.764TS+0.469HS+0.731BDS+0.374CLS+0.691CDS+0.563BWS$, 第 2 主成分 $PCA2=0.600BS-0.137TS-0.635HS+0.112BDS+0.348CLS+0.160CDS-0.277BWS$, 2 个主成分的贡献率分别为 34.689%、14.542%, 累积贡献率为 49.230%。根据各因子系数数据绘制散点图见图 1。从图 1 可观察到, 7 个比例性状聚集成上下两部分, 主成分 1 中, TS (全长/体长)、BDS (体高/体长)、

CDS (尾柄高/体长)、BWS (体厚/体长)和 HS (头长/体长) 5 个比例性状影响较大; 主成分 2 中, BS (体质量/体长)和 CLS (尾柄长/体长) 2 个比例性状影响较大。根据各杂交子代个体在 PCA1、PCA2 主成分中的得分, 数绘制性状特征散点图(图 2), 3 个群体中反交雄鱼与正交雄鱼有部分重叠, 而反交雌鱼与正交雌鱼及反交雄鱼重叠部分较少。正反交子代均有少数个体成小簇聚集于大簇四周, 表明在形态特征方面, 正反交子代间既有同源性又存在部分差别。

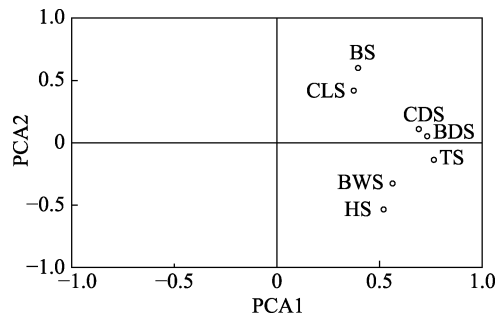


图 1 性状因子主成分得分系数分布
Fig.1 Characteristic coefficients plots of principal components factor scores
BS=BW/SL; TS=TL/SL; HS=HL/SL;
BDS=BD/SL; CLS=CPL/SL
CDS=CPD/SL; BWS=BWD/SL

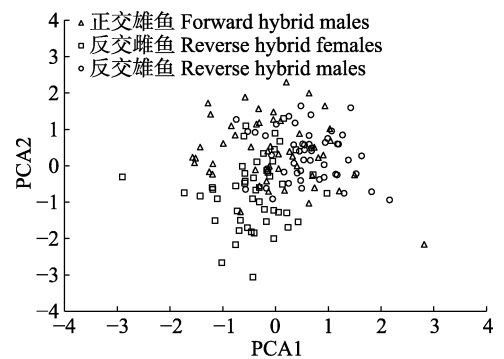


图 2 正反交奥尼罗非鱼群体性状特征主因子散点图
Fig.2 Scatter plots of principal components in reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

3 讨论

3.1 通径分析的必要性及多元回归方程的建立

各形态特征间相关性分析显示,除尾柄长外,正反交奥尼罗非鱼 7 个形态特征与体质量的相关系数均达到极显著水平($P<0.01$)。但经过通径分析并确认回归曲线自变量后,正反交奥尼罗非鱼仅保留 3 个形态性状,反交奥尼罗非鱼仅保留 2 个形态性状。本研究结果表明,表型相关性分析仅能体现各自变量(形态性状)与因变量(体质量)的数据关系,但由于各自变量之间存在多重共线性,相关性分析对各自变量间关系的判断并不准确(李洋等, 2012),因此,仅通过表型相关性分析得到的数据不能直接作为体质量回归方程中各自变量的偏回归系数。通径分析能将自变量和因变量之间的相关系数拆分为直接表达和间接表达,继而判断得出影响体质量的主要形态特征(王标等, 2009)。但通径分析所保留自变量的个数会直接影响回归分析的准确性和复杂程度,自变量保留个数与准确性和复杂程度均成正比,因此,有必要探寻二者之间的平衡程度(肖炜等, 2015)。Luxinger 等(2018)利用通径分析方法对巨骨舌鱼(*Arapaima gigas*)各形态学性状对体质量、头重、空壳重等 7 个质量性状的影响程度进行分析,筛选出对体质量影响程度最大的 5 个形态特征,分别为全长、体长、躯干长(Trunk length)、身体最大部分周长(Largest portion of the body)和胃部周长(Caudal perimeter),并建立基于以上 5 个性状为自变量的体质量回归方程;董浚键等(2018)研究发现,翘嘴鲮(*Siniperca chuatsi*)的体质量主要受到全长、体高、眼径和尾柄全长 4 个形态特征的影响,并以此为依据,利用回归分析建立体质量回归方程。以上各研究成果均建立了以通径分析筛选的形态特征为自变量的体质量回归方程,并根据研究结果对上述水生动物的综合选育提供指导。本研究中,正反交奥尼罗非鱼保留了全长、体高和尾柄高 3 个形态特征,对体质量的相关指数达 0.923;反交雌性子代保留了全长和体高 2 个形态特征,对体质量的相关指数达 0.827;反交雄性子代保留了体长和体高 2 个形态特征,对体质量的相关指数达 0.874。以上各回归分析中,回归常数和各性状偏回归系数均达到显著水平($P<0.05$),说明本研究成功揭示了影响正反交奥尼罗非鱼体质量的主要形态性状,较明确地阐述了不同杂交方式下各形态性状与体质量的真实关系。但本研究仅从形态学角度对正反交奥尼罗非鱼各形态性状对体质量的影响进行了初步探讨,后续仍需进行 SNP 位点、核基因标记等遗传学分析,以获得更多有价值的结果。

3.2 不同杂交方式奥尼罗非鱼影响体质量的主要形态性状

本研究对正反交奥尼罗非鱼进行相关性分析,并在相关性分析的基础上,进行通径分析和多元回归分析。结果显示,正反交奥尼罗非鱼全长、体高和尾柄高 3 个形态特征对体质量的单独决定系数和双性状协同决定系数之和为 0.923,决定体质量增长量变异的 92.3%;反交雌性奥尼罗非鱼全长和体高 2 个形态特征对体质量的单独决定系数和双性状协同决定系数之和为 0.864,决定体质量增长量变异的 86.4%;反交雄性奥尼罗非鱼体长和体高 2 个形态特征对体质量的单独决定系数和双性状协同决定系数之和为 0.874,决定体质量增长量变异的 87.4%。研究表明,当各自变量对因变量的总决定系数(R^2)高于临界点 0.85 时,才能初步判定各自变量为影响因变量的主要变量(刘春雷等, 2011)。本研究中,3 个回归方程中各自变量总决定系数均高于临界点,说明影响正反交奥尼罗非鱼体质量的主要形态特征结果可靠。通径分析结果显示,正反交奥尼罗非鱼保留至回归方程的各形态性状对体质量的综合影响,除尾柄高($P<0.05$)外,均达到极显著水平($P<0.01$),而不同杂交方式对体质量影响较大的各形态性状中均含有体高特征,且对正反交雄鱼和反交雌鱼体质量影响较大的形态性状中均含有全长特征。这一结果与许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*) (韩慧宗等, 2016)、圆斑星鲈(*Verasper variegatus*) (边力等, 2017)、大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*) (李莉等, 2019)、褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*) (黄建盛等, 2017)的研究结果相似。以上结果说明,在对不同杂交方式奥尼罗非鱼进行多性状综合选育时,除了设置体质量这一决定性性状外,还应考虑体高、全长等形态特征,保证综合选育的有效性和稳定性。

3.3 主成分分析对不同杂交方式差异判别和多性状综合选育的指导

目前,体质量依然是传统生产实践中亲鱼挑选或子代选育的主要依据,但随着生产实践的需要,罗非鱼生长速率、鱼类形态性状及特征成为国内外学者研究的热门方向(Trong *et al*, 2013)。由于受到多重基因间的连锁性影响以及环境的限制,单独以体质量为目标鱼类选育结果并不稳定(Carpenter *et al*, 1988),而在选育条件中加入体高、体长等与体质量存在高度相关性的形态性状后,可将单性状选育改良为多性状综合选育,从而有效地提升选育的准确性和稳定性。作为肉量需求较大的商品鱼类,罗非鱼的出肉率同样

是养殖者及消费者重视的特征,目前有研究发现,体质量、体长、体高、体厚等性状与出肉率存在较大相关性(Liere *et al*, 1992; Bolivar *et al*, 2002),因此,在选育过程中,通过对以上形态学性状的选择来提升罗非鱼生长速率和出肉率等指标具有重要的指导作用。统计学中,主成分分析通过降低数据主要原始变量的线性组合来提高多变量数据集的有效维度,从而确定变量与因变量的相关性,是生态数据分析中最常用的工具之一(Peres-Neto *et al*, 2003)。近年来,通过主成分分析对鱼类种内或种间关系及性状与品种相关性的研究也取得了较大进展,于飞等(2008)对 4 个大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)群体各比例性状进行主成分分析,发现各群体间全长、体长、头长、吻长和尾柄长 5 个形态特征已产生了明显差异;杨慧等(2015)对 3 个红罗非鱼群体进行主成分分析并进行了有效种分类判别,发现中国台湾红罗非鱼与另外 2 种红罗非鱼群体在体高、头长、体长和尾柄长等形态特征上存在较大差异;汪开成等(2018)对广西红水河外来红腹罗非鱼(*Coptodon zillii*)进行主成分分析并发现不同地理群体间已产生了明显形态分化,各地区群体形态差异主要集中在头尾轴、躯干部和尾部性状上。本研究通过对正反交奥尼罗非鱼进行各比例性状的主成分分析发现,在体质量、尾柄长 2 项特征性状上,奥尼罗非鱼正交子代与反交雌鱼存在较大差异,反交雄鱼与正交雄鱼、反交雌鱼均存在较小差异;在其他各项可量特征性状上,奥尼罗非鱼反交雌鱼与正反交雄鱼均存在较大差异,正反交雄鱼间存在较小差异。因此,可将上述形态特征差异作为正反交奥尼罗非鱼子代形态特征差异判别和综合选育的主要依据。

参 考 文 献

- Bian L, Liu CL, Chen SQ, *et al*. Path analysis of effects of morphometric traits on body weight in spotted halibut *Verasper variegatus* at different growth stages. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1168–1175 [边力, 刘长琳, 陈四清, 等. 不同生长期圆斑星鲽形态性状对体质量影响的通径分析. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1168–1175]
- Bolivar RB, Newkirk GF. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. *Aquaculture*, 2002, 204(3): 371–381
- Carpenter SR, Kitehell JF. Consumer control of lake productivity. *Bioscience*, 1988, 38(11): 764–769
- Dong JJ, Sun CF, Tian YY, *et al*. Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 76–84 [董浚键, 孙成飞, 田园园, 等. 翘嘴鲻主要形态性状与体质量的相关性及雌雄形态性状差异分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 76–84]
- Han HZ, Jiang HB, Wang F, *et al*. Principal component and path analysis of morphological traits of selective groups at different month ages of *Sebastes schlegeli*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(8): 1163–1172 [韩慧宗, 姜海滨, 王斐, 等. 许氏平鲷不同月龄选育群体形态性状的主成分与通径分析. *水产学报*, 2016, 40(8): 1163–1172]
- Huang JS, Chen G, Zhang JD, *et al*. Principal component and path analysis of morphological traits of *Epinephelus fuscoguttatus* at different month ages. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1105–1115 [黄建盛, 陈刚, 张健东, 等. 褐点石斑鱼不同月龄形态性状的主成分及通径分析. *水产学报*, 2017, 41(7): 1105–1115]
- Li L, Wang X, Jian YX, *et al*. Correlation and path analysis between morphological traits and body mass of *Hexagrammos otakii* at different months of age. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 58–66 [李莉, 王雪, 菅玉霞, 等. 不同月龄大泷六线鱼形态性状与体质量的相关性及通径分析. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 58–66]
- Li Y, Liu P, Li J, *et al*. Correlation and path analysis of morphometric traits on body weight for *Exopalamon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 59–65 [李洋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾形态性状对体质量的相关性及通径分析. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 59–65]
- Li YL, Chen C, Yu H, *et al*. Morphological characteristics and their relationships with the body weight of wild juvenile *Thunnus albacares*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 8–14 [李炎璐, 陈超, 于宏, 等. 中国南海黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)幼鱼形态特征及其与体质量的关系. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 8–14]
- Liu CL, Chang YM, Liang LQ, *et al*. Correlation and path analyses of phenotypic traits and body mass of transgenic carp with growth hormone gene of salmon. *Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(7): 1893–1899 [刘春雷, 常玉梅, 梁利群, 等. 转大麻哈鱼生长激素基因鲤表型性状与体质量的相关性及通径分析. *应用生态学报*, 2011, 22(7): 1893–1899]
- Liere LV, Gulati RD. Restoration and recovery of shallow eutrophic lake ecosystems in the Netherlands: Epilogue. *Hydrobiologia*, 1992, 233(1–3): 283–287
- Luo X, Ke C, You W. Estimates of correlations for shell morphological traits on body weight of interspecific hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* and *Haliotis gigantea*). *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32(1): 115–118
- Luxinger AO, Cavali J, Porto MO, *et al*. Morphometric measurements applied in the evaluation of *Arapaima gigas*, body components. *Aquaculture*, 2018, 489(1): 80–84
- Ma HY, Ma CY, Ma LB, *et al*. Correlation of growth-related

- traits and their effects on body weight of the mud crab (*Scylla paramamosain*). *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(4): 4127–4136
- Neira R, Lhorente JP, Araneda C, *et al.* Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture*, 2004, 241(1): 117–131
- Peres-Neto PR, Somers JK. Giving meaningful interpretation to ordination axes: Assessing loading significance in principal component analysis. *Ecology*, 2003, 84(9): 2347–2363
- Rutten MJM, Bovenhuis H, Komen H. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 2005, 246(1–4): 125–132
- Sun HF, Liu GX, Jiang LY, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight for *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(7): 48–54 [孙海峰, 刘国兴, 蒋连玉, 等. 罗氏沼虾的形态性状对体重的相关性分析. *水产养殖*, 2018, 39(7): 48–54]
- Trong TQ, Mulder HA, Van'Arendonk JAM, *et al.* Heritability and genotype by environment interaction estimates for harvest weight, growth rate, and shape of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in river cage and VAC in Vietnam. *Aquaculture*, 2013, 384–387(384): 119–127
- Wang B, Yu MK, Sun HJ, *et al.* Photosynthetic characters of *Quercus acutissima* from different provenances under effects of salt stress. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(8): 1817–1824 [王标, 虞木奎, 孙海菁, 等. 盐胁迫对不同种源麻栎叶片光合特征的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(8): 1817–1824]
- Wang KC, Wu ZQ, Wu L, *et al.* Morphological variation analysis on redbelly tilapia (*Coptodon zillii*) of Hongshui River in Guangxi. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(10): 2208–2216 [汪开成, 吴志强, 武琳, 等. 广西红水河外来红腹罗非鱼形态差异分析. *西南农业学报*, 2018, 31(10): 2208–2216]
- Xiao W, Li DY, Zou ZY, *et al.* Comparative analysis of growth variations among four hybrid subgroups of *Oreochromis niloticus* ♀ × *O. Aureus* ♂ and their parental strains. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(5): 905–912 [肖炜, 李大宇, 邹芝英, 等. 四种杂交组合奥尼罗非鱼及其亲本的生长对比研究. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 905–912]
- Xiao W, Li DY, Zou ZY, *et al.* Effects of morphometric attributes of xianghu strain of *Oreochromis niloticus* on its body weight. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(1): 433–438 [肖炜, 李大宇, 邹芝英, 等. 湘湖品系尼罗罗非鱼形态性状对体质量的影响. *西南农业学报*, 2015, 28(1): 433–438]
- Yu F, Zhang QW, Kong J, *et al.* Morphological variations and analyses of four imported turbot stocks, *Scophthalmus maximus*. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(5): 27–32 [于飞, 张庆文, 孔杰, 等. 大菱鲆4个进口群体的形态差异分析. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 27–32]
- Yang H, Zhu WB, Dong ZJ, *et al.* Morphological variation analysis of three populations of red tilapia. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(5): 678–684 [杨慧, 朱文彬, 董在杰, 等. 3个红罗非鱼群体的形态差异分析. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(5): 678–684]
- Yang H. Present situation of tilapia industry in our country and construction of modern industrial technology system. *China Fisheries*, 2010(9): 6–10 [杨弘. 我国罗非鱼产业现状及产业技术体系建设. *中国水产*, 2010(9): 6–10]

(编辑 冯小花)

Correlation Analysis and Morphological Difference and Contributions to Body Weight of Reciprocally-Crossed Subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*

CHEN Binglin^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, ZOU Zhiying², ZHU Jinglin²,
LI Dayu², YU Jie², YANG Hong^{1,2①}, HU Pingge^{1,2}, MA Yinhua^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081)

Abstract To study the effect of morphological difference and morphological characteristics on body weight of reciprocally-crossed subgroups of *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*, this study undertook to track and measure body weight and seven growth-related morphological traits, including total length, standard length, head length, body depth, caudal peduncle length, caudal peduncle depth, body width. Fifty individuals were randomly selected in the orthogonal group, and 50 males and 50 females were randomly selected in the backcrossing group for our analysis. All experimental fish are cultured in the same pond. The results showed that the total length, body depth and caudal peduncle depth 3 traits have a major impact on the weight of forward hybrid subgroups, thus establishing a multivariate regression equation related to body weight as $Y_{BW} = -154.286 + 9.016X_{TL} + 10.065X_{BD} + 17.884X_{CPD}$; Meanwhile for female individuals of reverse hybrid subgroups, total length and body depth, were two traits found to have a major impact on body weight, thus establishing a multivariate regression equation related to body weight as $Y_{BW} = -92.582 + 7.415X_{TL} + 8.727X_{BD}$; for male individuals, standard length and body depth are the two traits which have a major impact on body weight, thus establishing a multivariate regression equation related to body weight as $Y_{BW} = -120.299 + 8.661X_{SL} + 16.590X_{BD}$. In order to eliminate the influence of differences in body size among the individuals, we obtained seven proportion characteristics including BS, TS, HS, BDS, CLS, CDS, and BWS, respectively. In the characteristic coefficients plots of principal components factor scores, those seven proportion characteristics were divided into two groups, the first group concluded TS, BDS, CDS, BWS and HS, the other concluded BS and CLS. We drew a scatter plot through the score coefficients of every individuals in principal component factors PCR1 and PCR2. In the plot, the individuals of forward hybrid males could obviously be differentiated with reverse hybrid females. The conclusion showed that the morphological traits affecting body weight were different between different hybridization methods and different genders. In the selection of broodstock and the breeding of progeny, comprehensive traits selection should be adopted to improve the accuracy and stability of the breeding results.

Key words *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*; Path analysis; Multiple regression equation; Principal component analysis; Multi-trait breeding

① Corresponding author: YANG Hong, E-mail: yanghong@ffrc.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190123001

http://www.yykxjz.cn/

李旭鹏, 栾生, 曹宝祥, 罗坤, 谭建, 孔张伟, 孟宪红, 孔杰. 凡纳滨对虾 6 个国内群体的遗传背景分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 103-110

Li XP, Luan S, Cao BX, Luo K, Tan J, Kong ZW, Meng XH, Kong J. Genetic background analysis of six groups of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in China using SSR markers. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 103-110

凡纳滨对虾 6 个国内群体的遗传背景分析*

李旭鹏^{1,2} 栾生^{1,2} 曹宝祥¹ 罗坤^{1,2}
谭建¹ 孔张伟¹ 孟宪红^{1,2①} 孔杰^{1,2①}



(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

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

摘要 本研究选取了来自国内 6 个不同育苗场的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体, 对 8 个 SSR 位点的基因型信息进行分析。结果显示, 观察等位基因数(N_a)平均值为 3.67~9.33, 有效等位基因数(N_e)平均值为 2.20~5.67, 观察杂合度(H_o)平均值为 0.12~0.71, 期望杂合度(H_e)平均值为 0.41~0.81, 多态性信息含量(PIC)平均值为 0.36~0.76。聚类分析结果显示, 来自于同一个育苗场的对虾聚在一个分支。不同品牌来源的对虾分别聚在几个不同分支。6 个群体间的遗传一致度为 0.4229~0.8265, 遗传距离为 0.1905~0.8607。遗传分化系数(F_{ST})是 0.1837, 群体内近交系数(F_{IS})是 0.2514, $H_o < H_e$, 研究表明, 6 个群体总的遗传多态性较高, 但也提示品牌内不同群体间的遗传距离可能较近, 近交情况可能存在。

关键词 凡纳滨对虾; 遗传多态性; 遗传距离; SSR

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0103-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的野生群体分布在太平洋东岸(墨西哥、厄瓜多尔、秘鲁等)。从 20 世纪末被引入我国开展养殖后, 凡纳滨对虾已经发展成为国内最主要海水养殖对虾种类, 产量占海水养殖对虾总量的 80%。国内养殖业对于凡纳滨对虾亲虾的依赖巨大。由于国内亲虾不足以满足生产, 每年需要从国外进口大量成本高的亲虾。但是, 通常这些亲虾的遗传背景和系谱信息无法得知。使用这些亲虾配对生产的后代苗种可能存在遗传多态性低的情况, 随着培育代数的增加, 近交变的更易发生, 经济性性状衰退明显。因此, 培育国内优质凡纳滨对虾新品

种意义重大。目前, 已经证明遗传多态性的降低和近交情况能够增加隐性有害等位基因的表达, 对选育群体的生长、存活、抗逆等性状造成近交衰退现象(Spielman *et al*, 2004; Moss *et al*, 2007; Goyard *et al*, 2008; Luo *et al*, 2014; 喻驰方等, 2013)。因此, 在凡纳滨对虾遗传选育工作中, 为维持育种群体的遗传多样性, 避免近交, 需要认清不同群体甚至个体间的分子遗传背景差异, 为制定合理配种方案提供参考。

微卫星(SSR)标记是一种广泛存在于生物基因组内的共显性标记, 拥有遗传多态性高的特点。研究表明, SSR 适合于遗传多样性分析(Valles-Jimenez *et al*,

* 国家自然科学基金联合基金项目(U1706203)、泰山学者种业人才团队项目、国家自然科学基金面上项目(41676148; 31572616)、现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)和山东省农业良种工程(2017LZN011)共同资助 [This work was supported by Joint Fund of National Natural Science Foundation of China (U1706203), Taishan Scholar Program for Seed Industry, National Natural Science Foundation of China (41676148; 31572616), China Agriculture Research System (CARS-48), and Shandong Province Agricultural Seed Improvement Project (2017LZN011)]. 李旭鹏, E-mail: patrickxp@163.com

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

收稿日期: 2019-01-23, 收修修改稿日期: 2019-04-21

2004; Perez-Enriquez *et al.*, 2009; Rezaee *et al.*, 2016)。国内在 21 世纪初期已有利用 SSR 对黄渤海不同中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)群体的遗传多样性进行调查, 区分不同地理群体间的亲缘关系距离, 为种质资源利用和新品种选育提供了很好的参考(刘萍等, 2004; 孟宪红等, 2008)。由于 SSR 位点信息量大、分型技术成本低的优点, 近年来依然被应用在对虾遗传多样性分析中(王军等, 2018; 赵志英等, 2018)。本研究使用 8 对 SSR 引物, 随机对采集于我国的 6 个凡纳滨对虾群体进行分析, 为遗传育种工作中对不同遗传背景的凡纳滨对虾资源的利用提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机从 6 家育苗场共收集 133 尾凡纳滨对虾, 对其遗传背景进行分析。来自于 6 家育苗场的对虾分别编号为 CP-1、CP-2、CP-3、CP-4、PRI 和 SIS 群体。其中, CP-1、CP-2、CP-3、CP-4 群体来自于同一个品牌。PRI 和 SIS 群体分别来自 2 个不同品牌。21 尾凡纳滨对虾来自 CP-1 群体; 20 尾来自 CP-2 群体; 11 尾来自 CP-3 群体; 10 尾来自 CP-4 群体; 61 尾来自 PRI 群体; 10 尾来自 SIS 群体。所有群体的对虾都孵化于同一年。在养殖场用消毒的剪刀取一条对虾游泳足, 保存于 95%酒精, 带回实验室用于 DNA 提取和分析。

1.2 DNA 提取

使用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根)从对虾游泳足的肌肉组织中提取DNA。分别使用分光光度计和琼脂糖电泳检测DNA的质量。合格的DNA用于后期SSR分型实验。

1.3 SSR 分型

使用8对已公开发表的凡纳滨对虾SSR引物(Meehan *et al.*, 2003; Alcivar-Warren *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007)进行实验。引物序列信息详见表1。PCR反应体系包括 12.5 μ l Premix *Taq*TM (TaKaRa *Taq*TM Version 2.0) (TaKaRa *Taq* 0.625 U、dNTPs 0.4 mmol/L、Tris-HCl 20 mmol/L、KCl 100 mmol/L、MgCl₂ 3 mmol/L) (TaKaRa), 1 μ l模板DNA (200 ng/ μ l), 1 μ l正向引物(10 μ mol/L), 1 μ l反向引物(10 μ mol/L), 9.5 μ l去离子水。反应程序如下: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸 3 min。使用ABI 3730XL测序仪(Applied Biosystems, 美国)获得每个SSR位点的基因型信息。

表 1 引物信息

Tab.1 Primer information

引物名称 Primer name	序列 Sequence
M1103-F	GGCTGTGTTTGC GGGTAGTTT
M1103-R	TCATACGATAATGGCATAGAAGG
TuMXLv7.121-F	GGCACACTGTTTAGTCCTCG
TuMXLv7.121-R	CGAACAGAATGGCAGAGGAG
Lv12-F	GATCATTGCCCCCTCTTTTT
Lv12-R	ATCTACGGTTCGAGAGCAGA
TuMXLv10.33-F	CGAAGAGATTTATCCAGGG
TuMXLv10.33-R	CGTGCATTATTATCCTTTCC
TuMXLv8.256-F	GGACTCACACTTCTGGTTC
TuMXLv8.256-R	GGCTGCACCTTGTAAGTC
TuMXLv7.56-F	CCATGGCTTTCCTCTTCTTTC
TuMXLv7.56-R	AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG
TuMXLv9.103-F	CACCAAAACGAACGAAACG
TuMXLv9.103-R	GGATAAAAACGAATTGTATACCG
TuMXLv9.90-F	GACCAAAGGATATTGGCTCG
TuMXLv9.90-R	GTAATCAGGAGATGGTCCGC

1.4 遗传多样性分析

观察等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、HWE检验、遗传一致度、遗传距离和*F*-统计量使用POPGene (Version 1.32) 软件(<https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>)进行计算。使用NTSYSpc (Version 2.10)软件(<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>)进行UPGMA聚类分析。使用Cervus (Version 3.0.7)软件(<http://www.fieldgenetics.com>)计算多态性信息含量(PIC)。

2 结果

2.1 遗传多态性分析

6 个凡纳滨对虾群体的遗传多态性信息见表 2。其中, N_a 平均值为 3.67~9.33。 N_e 平均值为 2.20~5.67。 H_o 平均值为 0.12~0.71。 H_e 平均值为 0.41~0.81。除了在 CP-4 群体中的 Lv12 位点只检测到 1 种等位基因, 其他 SSR 位点在 6 个群体中的等位基因数都大于 1。8 个 SSR 位点的 PIC 平均值为 0.36~0.76。M1103 位点在 CP-1、CP-3 和 PRI 群体中都显著偏离 HWE ($P < 0.05$)。Lv12 位点在 CP-2 和 PRI 群体中都极显著偏离 HWE ($P < 0.01$)。TuMXLv10.33 位点在 CP-2、CP-3、CP-4 和 PRI 群体中都极显著偏离 HWE ($P < 0.01$)。TuMXLv8.256 位点在 CP-4 群体中显著偏离 HWE ($P < 0.05$); 在 CP-1、CP-2、CP-3 和 PRI 群体中极显著偏离 HWE ($P < 0.01$)。TuMXLv7.56 位点在 CP-4 群

表 2 遗传多样性分析
Tab.2 Genetic diversity analysis

位点 Locus	参数 Indices	群体 Populations						平均值 Mean
		CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	PRI	SIS	
M1103	H_o	0.19	0.45	0.45	0.20	0.72	0.40	0.40
	H_e	0.42	0.38	0.60	0.19	0.79	0.51	0.48
	N_a	2.00	3.00	3.00	2	10.00	2.00	3.67
	N_e	1.69	1.60	2.35	1.22	4.65	1.92	2.24
	P	0.01	0.50	0.04	0.74	0.01	0.49	0.30
	PIC	0.33	0.34	0.48	0.16	0.76	0.37	0.41
TuMXLv7.121	H_o	0.57	0.55	0.81	0.60	0.64	0.70	0.65
	H_e	0.60	0.59	0.77	0.51	0.70	0.67	0.64
	N_a	4.00	4.00	6.00	2.00	10.00	4.00	5.00
	N_e	2.42	2.37	3.84	1.92	3.32	2.74	2.77
	P	0.81	0.20	0.54	0.52	0.14	0.48	0.45
	PIC	0.51	0.53	0.70	0.37	0.66	0.57	0.56
Lv12	H_o	0.48	0.30	0.45	0.00	0.32	0.40	0.33
	H_e	0.70	0.70	0.45	0.00	0.78	0.72	0.56
	N_a	7.00	6.00	4.00	1.00	10.00	4.00	5.33
	N_e	3.13	3.11	1.77	1.00	4.33	3.17	2.75
	P	0.21	0.00	0.63	NC	0.00	0.06	0.18
	PIC	0.63	0.64	0.39	0.00	0.73	0.63	0.50
TuMXLv10.33	H_o	0.14	0.20	0.00	0.00	0.28	0.10	0.12
	H_e	0.22	0.70	0.42	0.19	0.80	0.10	0.41
	N_a	3.00	5.00	2.00	2.00	11.00	2.00	4.17
	N_e	1.27	3.16	1.66	1.22	4.77	1.11	2.20
	P	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.23
	PIC	0.20	0.63	0.32	0.16	0.76	0.09	0.36
TuMXLv8.256	H_o	0.14	0.45	0.09	0.30	0.31	0.30	0.27
	H_e	0.62	0.61	0.54	0.71	0.69	0.63	0.63
	N_a	3.00	4.00	4.00	4.00	5.00	5.00	4.17
	N_e	2.51	2.49	2.07	3.08	3.18	2.50	2.64
	P	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.14	0.03
	PIC	0.53	0.55	0.45	0.61	0.63	0.54	0.55
TuMXLv7.56	H_o	0.95	0.75	0.64	0.30	0.90	0.70	0.71
	H_e	0.90	0.82	0.91	0.59	0.85	0.80	0.81
	N_a	14.00	9.00	11.00	4.00	13.00	5.00	9.33
	N_e	8.48	4.97	7.56	2.30	6.51	4.17	5.67
	P	1.00	0.97	0.94	0.01	0.98	0.15	0.68
	PIC	0.87	0.77	0.86	0.51	0.83	0.72	0.76
TuMXLv9.103	H_o	0.67	0.80	0.73	0.80	0.69	0.40	0.68
	H_e	0.89	0.85	0.84	0.81	0.74	0.72	0.81
	N_a	11.00	8.00	8.00	5.00	10.00	5.00	7.83
	N_e	7.67	5.88	5.04	4.35	3.72	3.13	4.97
	P	0.56	0.72	0.69	0.12	0.37	0.06	0.42
	PIC	0.86	0.81	0.78	0.73	0.71	0.62	0.75
TuMXLv9.90	H_o	0.71	0.65	0.27	0.90	0.46	0.13	0.52
	H_e	0.84	0.82	0.75	0.78	0.74	0.83	0.79
	N_a	6.00	7.00	5.00	5.00	6.00	7.00	6.00
	N_e	5.44	5.00	3.56	3.92	3.82	4.76	4.42
	P	0.11	0.06	0.03	0.48	0.00	0.51	0.20
	PIC	0.79	0.77	0.67	0.71	0.69	0.76	0.73

体中显著偏离HWE($P<0.05$)。TuMXLv9.90位点在CP-3群体中显著偏离HWE($P<0.05$)；在PRI群体中极显著偏离HWE($P<0.01$)。TuMXLv7.21和TuMXLv9.103位点在所有群体中都没有发生偏离HWE。

2.2 分子遗传距离分析

图 1 是个体的聚类分析结果。所有来自于 CP-1、CP-3 和 CP-4 群体的凡纳滨对虾集中在第 1 分支。其余

来自于 CP-2、SIS 和 PRI 群体的凡纳滨对虾分别集中于另外 3 个分支。除了个体水平，在群体水平也进行了聚类分析(图 2)，在 2 个水平的聚类分析结果是相符的。6 个群体间的遗传一致度和遗传距离结果见表 3。从表 3 可以看出，遗传一致度为 0.4229~0.8265。遗传距离为 0.1905~0.8607。其中，CP-1 和 CP-4 群体间的遗传一致度最高，遗传距离最近。CP-2 和 SIS 群体间的遗传一致度最低，遗传距离最远。

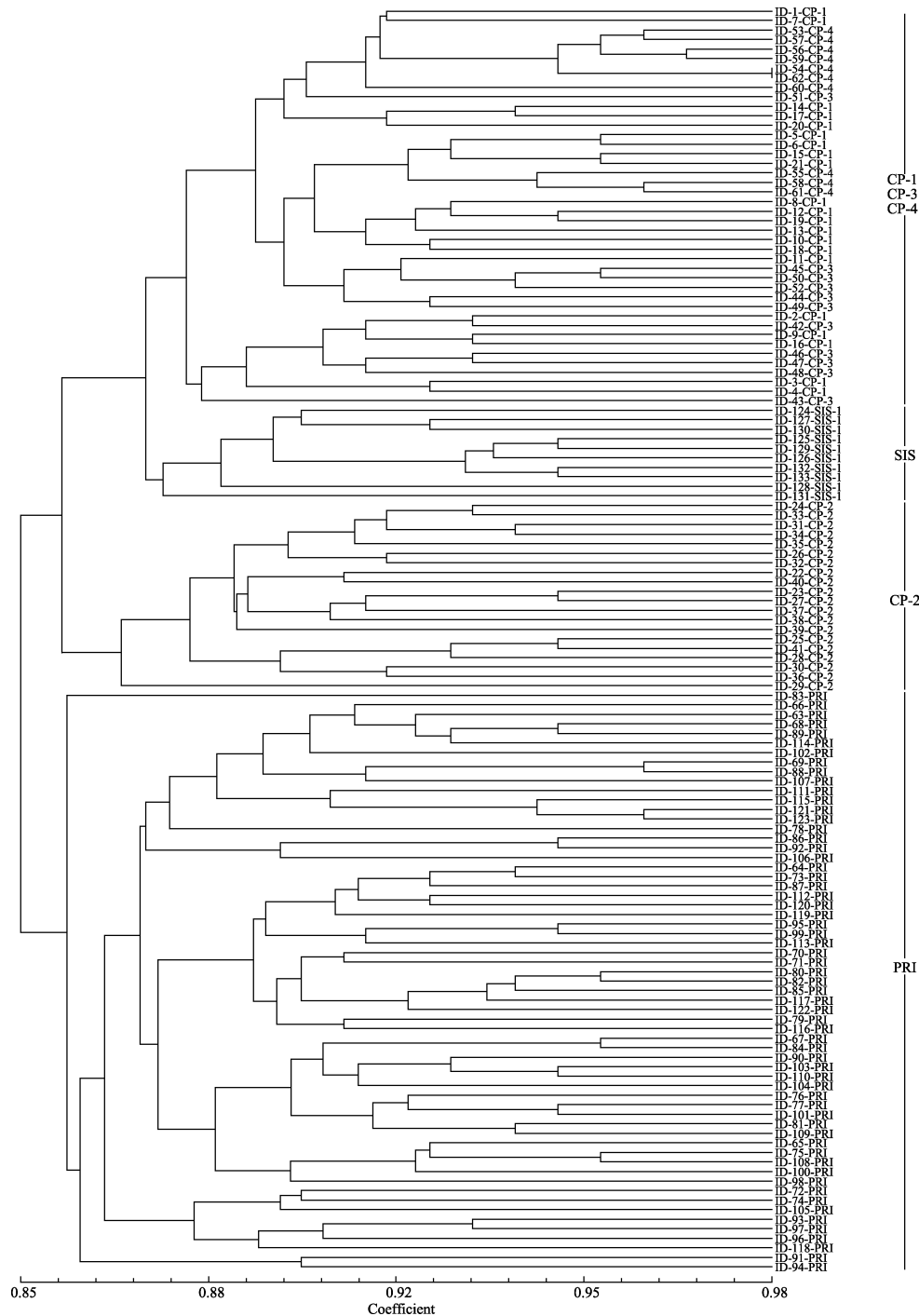


图 1 个体水平聚类分析

Fig.1 The cluster analysis of individual *L. vannamei* from six populations

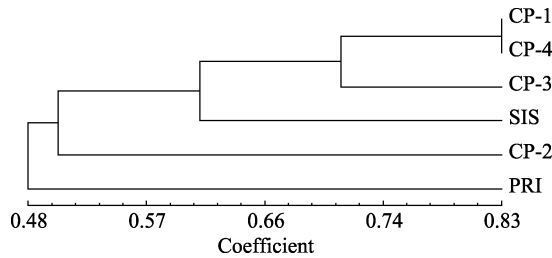


图 2 群体水平聚类分析

Fig.2 The cluster analysis of six populations of *L. vannamei*

表 3 遗传一致度和遗传距离
Tab.3 Genetic identity and genetic distance

群体 Population	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	PRI	SIS
CP-1	/	0.6055	0.8108	0.8265	0.5163	0.6742
CP-2	0.5016	/	0.4809	0.5151	0.4509	0.4229
CP-3	0.2053	0.7321	/	0.6109	0.4885	0.5637
CP-4	0.1905	0.6633	0.4929	/	0.4361	0.5884
PRI	0.6611	0.7965	0.7164	0.8298	/	0.5311
SIS	0.3942	0.8607	0.5732	0.5303	0.6328	/

注: 对角线上方为遗传一致度, 下方为遗传距离

Note: The numbers above the diagonal line are genetic identities, and the numbers below the diagonal line are genetic distances

2.3 F-统计量

对 6 个凡纳滨对虾群体进行 F -统计量分析(表 4)。结果表明, 8 个 SSR 位点的群体内近交系数(F_{IS})值为 $-0.0426 \sim 0.6943$ 。多数位点的 $F_{IS} > 0$ 。 F_{IS} 平均值是 0.2514。8 个 SSR 位点的总群体近交系数(F_{IT})值为 $0.0416 \sim 0.7665$, F_{IT} 平均值为 0.3889。8 个 SSR 位点的遗传分化系数(F_{ST})值为 $0.0808 \sim 0.3003$ 。 F_{ST} 平均值为 0.1837。

表 4 F -统计量分析
Tab.4 The F -statistics analysis

位点 Locus	群体内近 交系数 F_{IS}	总群体近 交系数 F_{IT}	遗传分化 系数 F_{ST}
M1103	0.1374	0.3965	0.3003
TuMXLv7.121	-0.0426	0.0416	0.0808
Lv12	0.3968	0.5674	0.2829
TuMXLv10.33	0.6943	0.7665	0.2363
TuMXLv8.256	0.5662	0.6181	0.1195
TuMXLv7.56	0.1016	0.2413	0.1555
TuMXLv9.103	0.1282	0.2749	0.1683
TuMXLv9.90	0.1763	0.2863	0.1336
平均值 Mean	0.2514	0.3889	0.1837

2.4 等位基因的差异

韦恩图(图3)展示的是3个品牌凡纳滨对虾8个 SSR 位点的等位基因的分布情况。8 个 SSR 位点共计获得等位基因个数是 126。其中, 只有 12 个等位基因类型是在 3 个品牌的凡纳滨对虾中都有发现。CP、PRI、SIS 品牌的凡纳滨对虾各有 36、29、4 个等位基因类型是各自特有的, 分别占各自所有等位基因类型的比例是 40.9%、38.7% 和 12.5%。单独对 CP 的 4 个群体(CP-1、CP-2、CP-3 和 CP-4)进行分析(图4), 4 个群体共计有 88 个等位基因类型, 其中, 4 个群体共有的有 10 种。CP-1、CP-2、CP-3 和 CP-4 群体各自拥有 14、20、10、4 种特有的等位基因, 分别占各自所有等位基因类型的比例是 28.0%、44.4%、23.8% 和 16.0%。

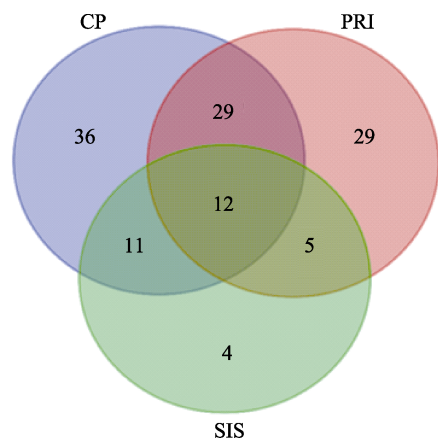


图 3 3 个品牌间 SSR 等位基因类型分布
Fig.3 The allele distribution of SSRs of *L. vannamei* in the three different brands

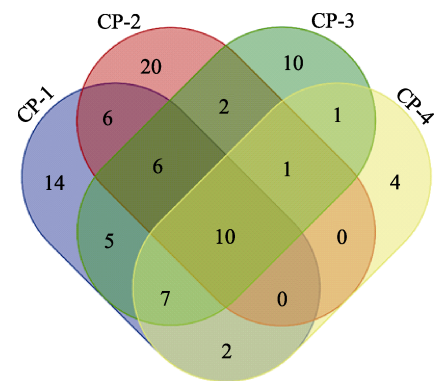


图 4 CP 品牌的 4 个群体 SSR 等位基因类型分布
Fig.4 The allele distribution of SSRs of *L. vannamei* in the four populations from CP brand

3 讨论

SSR 标记广泛应用于生物的遗传多样性调查。在前期研究中, Xu 等(2001)利用 6 对 SSR 引物对菲律

宾的野生斑节对虾(*Penaeus monodon*)遗传多样性进行研究,结果显示,其中 1 个野生群体的遗传多样性要明显低于其他 3 个野生群体,研究结果为了解斑节对虾的野生资源情况提供了参考。Rumisha 等(2017)利用 SSR 标记调查了斑节对虾的遗传多态性与当地水域金属污染水平的相关性,结果显示,遗传多态性的改变与金属污染存在显著的相关性。王军等(2018)利用 SSR 对中国对虾人工选育群体和野生群体进行比较分析,结果显示,人工选育群体与野生群体间发生弱遗传分化。

本研究中, N_a 平均值为 3.67~9.33。在 Perez-Enriquez 等(2009)研究中,凡纳滨对虾 SSR 的 N_a 平均值为 8.98。Cruz 等(2004)和 Rezaee 等(2016)的研究中,凡纳滨对虾 SSR 的 N_a 值为 5~10。上述研究结果和本研究结果相近。但是有趣的是,凡纳滨对虾与其他几种对虾相比,SSR 的 N_a 值显得偏低很多。例如,Wang 等(2016)研究表明,中国对虾的 N_a 为 6~63。Zhang 等(2015)研究表明,中国对虾 SSR 的 N_a 平均值为 36.5。Luan 等(2006)研究表明,日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*) SSR 的 N_a 平均值为 7.5~13.5。Xu 等(2001)关于斑节对虾的报道中,SSR 的 N_a 值为 6~54。上述对虾种类都比凡纳滨对虾 SSR 的 N_a 值高。考虑到凡纳滨对虾 SSR 位点普遍存在 N_a 值偏低的情况,在进行遗传多样性分析时,最好能选用多态性高的 SSR 位点,或者适当增加分析位点的个数。已有报道中凡纳滨对虾 SSR 位点 N_a 值偏低的现象是否与人工选择相关也值得探索。

聚类分析结果表明,来自 6 个群体的凡纳滨对虾主要分为 4 支。其中,来自 CP-1、CP-3 和 CP-4 群体的凡纳滨对虾组成第 1 分支,表明这 3 个群体来源的对虾遗传距离较近。来自 CP-2、PRI 和 SIS 群体的对虾分别聚在其他 3 个分支,提示这 3 个群体来源的对虾之间遗传距离较远。有趣的是,CP-1、CP-2、CP-3 和 CP-4 群体都是来源于同一个品牌,但 CP-2 群体与 CP-1、CP-3 和 CP-4 群体的遗传距离较远,甚至比 SIS 群体与 CP-1、CP-3 和 CP-4 群体的距离还远,显示该品牌群体间遗传背景较为丰富,品牌内遗传距离甚至高于品牌间遗传距离。通过聚类分析结果可以看出,使用本研究的 8 对 SSR 引物,可以将不同品牌间的个体准确区分开。但同一个品牌的群体间个体,还不能被全部准确区分开,原因可能是这些群体的亲本亲缘关系太近。

本研究中, H_o 值为 0.12~0.71。8 个位点的杂合度在不同群体中的差别较大。PIC 值为 0.36~0.76,SSR 位点的多态性较高,达到中高度水平(Botstein *et al.*,

1980),适合遗传多样性分析。 F_{ST} 平均值为 0.1837,表明群体间已经达到高度遗传分化水平(0.15~0.25)(Balloux *et al.*, 2002),18.37%的遗传分化存在于各群体间。

对于等位基因类型在不同品牌凡纳滨对虾中的分布情况,3 个品牌共有的等位基因类型并不多。尤其是 CP 和 PRI 2 个品牌的凡纳滨对虾特有的等位基因类型比例较高。提示这 2 个品牌的对虾拥有更独特的遗传信息。但是与 CP、PRI 2 个品牌的对虾相比,SIS 品牌的对虾特有的等位基因类型比例较低。CP 品牌的 4 个群体中,CP-2 特有的等位基因类型最高,达到 44.4%,说明 CP-2 与其他 3 个 CP 品牌群体的遗传背景差异较大,这个结果和聚类分析的结果是一致的。假如在遗传选育中要将这 6 个群体引入基础选育群体,那么参考 SSR 分型结果,可将 CP-1、CP-3、CP-4 群体合并成 1 个群体看待,CP-2、SIS、PRI 各自是 3 个独立群体。制定配种方案可优先考虑在这 4 个新定义的群体间进行个体间配对,尽量避免群体内部个体的配对。

已有研究表明,控制近交在对虾育种中的重要性。近交对于凡纳滨对虾生长、存活、抗病毒等性状具有显著影响(Moss *et al.*, 2007)。在中国对虾的研究中同样也表明,近交对于生长和存活性状具有显著影响(Luo *et al.*, 2014)。在没有系谱参考的情况下,经过几代人工选育群体内近交水平就可能达到极高水平。而遗传信息丰富的基础选育群体也是保证人工选育更好开展的前提。因此,在以未知遗传背景的群体作为选育对象时,借助分子标记技术对群体、个体间的分子遗传背景进行分析,可以为配种方案制定提供重要的参考。本研究中计算的 $F_{IS} > 0$,表明群体内存在杂合度降低现象;综合考虑 $H_o < H_e$ 的结果,表明群体内已经存在一定程度的近交现象,提醒在人工选育过程中,可以适当增加基础群体的丰富性,避免遗传多样性的丢失,同时,要严格控制近交程度,避免性状衰退。

4 结论

本研究表明,不同品牌来源的凡纳滨对虾间的分子遗传距离较远,利用 SSR 标记可以准确区分。但是相同品牌的对虾,即使来自于不同群体,个体间的分子遗传距离可能很近。本研究检测的群体内可能已经存在一定近交现象。在遗传选育或者生产扩繁苗种过程中,为了控制近交、提高遗传多样性,在缺少候选亲本遗传背景信息时,可以尝试利用 SSR 标记对

群体或个体的分子遗传背景进行调查, 并计算分子遗传距离用于配种方案参考。

参 考 文 献

- Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Park SW, *et al.* ShrimpMap: A low-density, microsatellite-based linkage map of the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Identification of sex-linked markers in linkage group 4. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(4): 1259–1277
- Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 155–165
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Cruz P, Ibarra AM, Mejia-Ruiz H, *et al.* Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology*, 2004, 6(2): 157–164
- Goyard E, Goarant C, Ansquer D, *et al.* Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture*, 2008, 278(1–4): 43–50
- Liu P, Meng XH, He YY, *et al.* Genetic diversity in three wild populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow and Bohai Seas as revealed by microsatellite DNA. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(3): 252–257 [刘萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 252–257]
- Luan S, Kong J, Wang QY. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Research*, 2006, 37(8): 785–792
- Luo K, Kong J, Luan S, *et al.* Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2014, 420–421(3): 32–37
- Meehan D, Xu Z, Zuniga G, *et al.* High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biotechnology (New York)*, 2003, 5(4): 311–330
- Meng XH, Kong J, Wang QY, *et al.* Study on seven geographic populations of prawn *Fenneropenaeus chinensis* based on microsatellite DNA. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(5): 1–10 [孟宪红, 孔杰, 王清印, 等. 微卫星技术对黄、渤海海域 7 个不同地理群体中国对虾的遗传结构和遗传分化研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 1–10]
- Moss DR, Arce SM, Otsoshi CA, *et al.* Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2007, 272(S1): 30–37
- Perez-Enriquez R, Hernández-Martínez F, Cruz P. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture*, 2009, 297(1–4): 44–50
- Rezaee S, Farahmand H, Nematollahi MA. Genetic diversity status of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using SSR markers in Iran. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 479–489
- Rumisha C, Leermakers M, Elskens M, *et al.* Genetic diversity of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in relation to trace metal pollution at the Tanzanian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114(2): 759–767
- Spielman D, Brook BW, Briscoe DA, *et al.* Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conservation Genetics*, 2004, 5(4): 439–448
- Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(5): 475–484
- Wang M, Wang W, Xiao G, *et al.* Genetic diversity analysis of spawner and recaptured populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during stock enhancement in the Bohai Bay based on an SSR marker. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(8): 51–56
- Wang J, Wang QY, Kong J, *et al.* SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 104–111 [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 104–111]
- Xu Z, Primavera JH, de la Pena LD, *et al.* Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 2001, 199(1): 13–40
- Yu CF, Luan S, Zhang ZW, *et al.* Growth performance comparison of different inbreeding levels of families in *Artemia sinica*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 75–79 [喻驰方, 栾生, 张志伟, 等. 中华卤虫不同近交水平家系生长性能比较. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 75–79]
- Zhao ZY, Liang LY, Bai LR. Analysis of genetic diversity among three wild populations of *Penaeus monodon* using microsatellite marker. *Journal of Tropical Oceanography*, 2018, 37(3): 65–72 [赵志英, 梁丽运, 白丽蓉. 斑节对虾 3 个野生群体遗传多样性的微卫星标记分析. *热带海洋学报*, 2018, 37(3): 65–72]
- Zhang K, Xiao G, Wang W, *et al.* Genetic variation analysis across six life periods in a natural population of the Chinese shrimp "*Fenneropenaeus chinensis*" in Bohai Bay using

SSR markers. Russian Journal of Marine Biology, 2015, 41(1): 10–16
Zhang L, Yang C, Zhang Y, *et al.* A genetic linkage map of

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. Genetica, 2007, 131(1): 37–49

(编辑 马瑾艳)

Genetic Background Analysis of Six Groups of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* in China Using SSR Markers

LI Xupeng^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang¹, LUO Kun^{1,2},
TAN Jian¹, KONG Zhangwei¹, MENG Xianhong^{1,2}①, KONG Jie^{1,2}①

(1. 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 Controlling the inbreeding level is an important task in animal breeding. Genetic analysis such as genetic diversity and genetic distance estimate could provide information for the artificial selection of animals. In the present study, the genetic information of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* from six different populations in China were analyzed using genotyping data of eight SSR loci. The results showed that the mean N_a ranged from 3.67 to 9.33, the mean N_e range from 2.20 to 5.67, the mean H_o ranged from 0.12 to 0.71, the mean H_e ranged from 0.41 to 0.81, and the mean PIC ranged from 0.36 to 0.76. The cluster analysis results showed that the individual shrimps from populations of different companies were clustered in different nodes. The individual shrimps from three hatcheries from the same company were clustered in one node. Among the six populations of *L. vannamei*, the genetic identity ranged from 0.4229 to 0.8265, and the genetic distance ranged from 0.1905 to 0.8607. The mean value of F_{ST} was 0.1837. The F_{IS} value was 0.2514. And the H_o value was smaller than the H_e value. The results suggested that genetic diversity between *L. vannamei* from different populations could be high, while, genetic relationship of *L. vannamei* in populations of the same company might be quite close. There might be an inbreeding phenomenon.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Genetic diversity; Genetic distance; SSR

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190214001

http://www.yykxjz.cn/

陈维, 魏守祥, 李禹含, 潘鲁青. 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 111-118
Chen W, Wei SX, Li YH, Pan LQ. Isolation and identification of subcellular fractions from digestive glands of *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 111-118

栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术*

陈 维 魏守祥 李禹含 潘鲁青^①

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)



摘要 采用匀浆、差速离心、镜检和标志酶测定等方法,研究了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术。结果显示,经 Hoechst 33258 染色,在匀浆 2 min 对照组中,观察到大量栉孔扇贝消化盲囊完整细胞,呈圆形或椭圆形,细胞膜完整,荧光强度较高;在匀浆 3、4、5 min 实验组中,完整细胞数目逐渐减少,且出现许多形态较小、荧光强度弱、轮廓模糊的细胞碎片。通过血球计数板法得到的细胞破碎结果与上述染色结果一致,随着匀浆时间(2~5 min)的增加,细胞破碎率升高,当匀浆时间达到 5 min 时,细胞破碎率升至 94.24%。利用 Hoechst 33258 染色栉孔扇贝消化盲囊亚细胞分离组分(S2、C2、C4、S5 和 C5),镜检发现,C2 组分荧光强度最强,荧光颗粒数目多,而其他组分荧光强度弱,且基本观察不到荧光颗粒。由此推测,细胞核主要存在于 C2 组分中;同时,细胞膜(5'-核苷酸酶)、线粒体(琥珀酸脱氢酶)、细胞质(乳酸脱氢酶)和微粒体(葡萄糖-6-磷酸酶)标志酶活力在其他亚细胞组分中有少量检出,但它们在 S2、C4、S5 和 C5 组分中的标志酶活性比例较高(分别为 63.90%、64.89%、77.82%和 67.55%)。由此推测,S2、C2、C4、S5 和 C5 分离组分分别为细胞膜、细胞核、细胞质、线粒体和微粒体。本研究成功构建了栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术方法,为贝类生理机制研究提供技术支持。

关键词 栉孔扇贝;消化盲囊;亚细胞组分;分离鉴定

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0111-08

细胞是生物体结构和功能的基本单位,由具有一定形态、在细胞内执行特定功能的亚细胞组分构成,包括细胞膜、细胞质、细胞器、细胞核等。亚细胞组分是细胞内生理代谢反应的主要场所,分布着许多重要的生化代谢酶。目前,关于亚细胞组分的生化组成、特定功能和超微结构等研究已成为热点(赵艳芳等, 2013; 陈扬等, 2017; Jadot *et al*, 2017),而亚细胞组分分离技术则是研究的前提与关键,主要的分离方法有超速离心、电泳(Heidrich *et al*, 1976; Islinger *et al*, 2011)、亲和纯化(Vitale *et al*, 1998; Takemoto *et al*,

2002; Merino *et al*, 2012)等,其中,超速离心是最常用的亚细胞组分分离技术(贺芳等, 2005)。在哺乳动物中,通过超速离心已能分离出细胞核、细胞膜、细胞质、线粒体、微粒体、溶酶体等多种亚细胞组分。同时,采用标志酶、蛋白质印迹、电镜观察等方法,建立了亚细胞组分种类鉴定、纯度分析的技术方法(Fleischer *et al*, 1974; Cooper *et al*, 2010; Lieb *et al*, 2010)。王伟等(2012)用超速离心法从新生大鼠(*Rattus norvegicus*)右侧大脑皮质组织中分离得到线粒体和胞浆 2 种亚细胞组分,并通过测定凋亡蛋白 Smac、

* 山东省 2018 年重点研发计划(公益性科技攻关类)(2018GHY115007)资助 [This work was supported by Shandong Province 2018 Key Research and Development Plan (Public Welfare Science and Technology Research) (2018GHY115007)].
陈 维, E-mail: 2209236262@qq.com

^① 通讯作者: 潘鲁青, 教授, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-02-14, 收修改稿日期: 2019-03-04

Diablo 蛋白在其中的表达,探究大鼠 H/I 后神经元 Smac/Diablo 的亚细胞器转移与神经元凋亡的作用机制; Jiang 等(2004)离心分离了大鼠肝脏粗制线粒体、纯化线粒体、胞质等亚细胞组分,通过亚细胞蛋白质组学分析,鉴定了共 564 个蛋白质,又根据物理化学特征和功能对其进行了详细的生物信息学注释; Kiri 等(2005)通过蔗糖密度梯度离心得到高度富集的牛心脏线粒体,发现了来自不同年龄牛心脏的线粒体制剂的蛋白质谱存在显著差异。

目前,贝类亚细胞组分分离技术和功能研究也受到广泛关注。Keiichi 等(2013)从长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和日本蚶(*Corbicula japonica*)组织中离心分离了线粒体、微粒体,通过体外实验发现这 2 种亚细胞组分提取物在冈田酰化反应中起到关键作用; Livingstone 等(1984)分离了紫贻贝(*Mytilus edulis*)微粒体、线粒体、细胞质等亚细胞组分,但仅在微粒体及线粒体中检测到混合功能氧化酶(MFO)及苯并[a]芘(BaP)代谢相关酶活性; Siebert 等(2017)离心分离了牡蛎(*Crassostrea brasiliana*)鳃和消化盲囊的微粒体、细胞质,也仅在微粒体中检测到乙氧基脱嘌呤 O-脱乙酰酶(EROD)的活性。目前,获得贝类亚细胞组分的方法仍主要参照哺乳动物亚细胞组分分离方法的研究,通过超速离心能够获得细胞核、细胞质、线粒体、微粒体等亚细胞组分中的 1~2 个组分,但之后极少有开展亚细胞组分种类鉴定及纯度分析的研究,因此分离效率低,准确性难以保证。

本研究以栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)为对象,在已有的哺乳动物和贝类亚细胞组分分离技术的基础上,依据栉孔扇贝消化盲囊特有的组织细胞特征,开展组织匀浆液制备和检验技术的研究,探究贝类亚细胞组分超速离心分离与鉴定技术,不仅可为贝类亚细胞组分的生理功能研究提供技术支持,也可为贝类亚细胞组分标准化分离技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用栉孔扇贝于 2018 年 4 月购自山东省青岛市崂山区沙子口养殖场,壳高为(6.15±0.50) cm。采用青岛近海自然海水暂养 10 d,温度为(18±1)℃,海水盐度为 31, pH 为 8.1,连续充气,日换水量为 1/2,投喂螺旋藻粉,日投饵量为 3 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 消化盲囊组织匀浆液的制备 配制匀浆缓冲液, A 液: 0.02 mol/L Tris、0.15 mol/L KCl、1 mmol/L

DTT、0.5 mol/L 蔗糖, pH 调至 7.7, 于 4℃ 保存; B 液: 150 mmol/L MgCl₂, 于 4℃ 保存; C 液: 100 mmol/L PMSF, 于 -20℃ 保存。

选择健康、活力强的栉孔扇贝,解剖并称取消化盲囊组织 2 g,剪碎后,放入预冷的玻璃匀浆器中,加入 10 ml A 液、100 μl B 液和 10 μl C 液,4℃ 冰水浴下研磨,经预实验设置匀浆时间分别为 2、3、4、5 min,然后采用医用纱布挤压过滤,滤液放入预冷的 15 ml 离心管中。

1.2.2 细胞裂解率检验 取 100 μl 过滤液,用匀浆缓冲液 A 液稀释 10 倍。再取 100 μl 稀释后的过滤液,加入 100 μl 10 μg/ml 的 Hoechst 工作液,混匀,暗处理 10 min,之后,取 2.5 μl 均匀涂片,在荧光显微镜(Nikon50i,蓝色滤光片,荧光激发波长为 346~352 nm,发射波长为 460~461 nm)下观察细胞形态及大小,以匀浆 2 min 染色结果为对照组,其他匀浆时间与之比较,观察完整细胞形态并计数。

吸取 2.5 μl 上述稀释的匀浆液,滴于血球计数板上,在荧光显微镜光镜下(10×40 倍)观察细胞形态并计数。细胞破碎率公式:破碎率(%)=1-实验组完整细胞个数/对照组完整细胞个数,当破碎率达 90%以上时,视为匀浆质量良好,可用于亚细胞组分的分离实验。

1.2.3 消化盲囊亚细胞组分的分离 参照 Livingstone 等(1984)和 Song 等(2006)的分离方法,并根据预实验情况对缓冲液和具体离心步骤进行调整和优化,所有分离过程温度均控制在 0℃~4℃,具体操作步骤如图 1 所示。

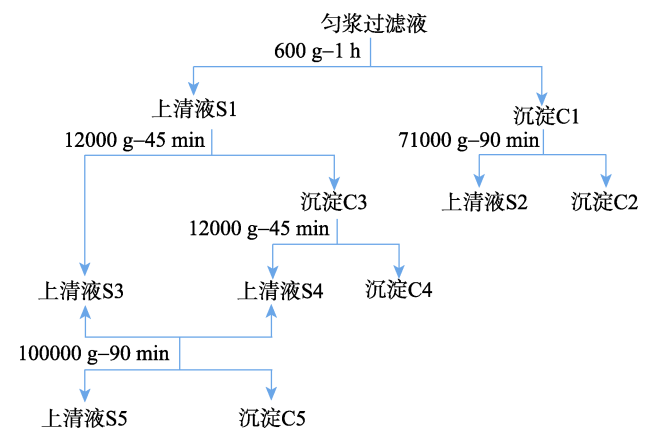


图 1 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离流程
Fig.1 Subcellular fraction centrifugation process of digestive glands tissues of *C. farreri*

取匀浆质量良好的过滤液 10 ml,加入 10 μl C 液,混匀,于 600 × g 离心 1 h,分离上清液 S1 和沉淀 C1。C1 中加入 0.5 ml D 液和 4.5 ml E 液重悬,重悬液于 71000 × g 离心 90 min,分离上清液 S2 和沉淀 C2。S1

于 $12000 \times g$ 离心 45 min, 分离获得上清液 S3 和沉淀 C3, C3 加入 2 ml 匀浆缓冲液重悬, 于 $12000 \times g$ 离心 45 min, 分离获得沉淀 C4 和上清液 S4, S4 与 S3 合并后于 $100000 \times g$ 下离心 90 min, 分离获得上清液 S5 和沉淀 C5。沉淀 C2、C4、C5 中加入 2 ml 储备缓冲液 F 液和 0.4 g 储备缓冲液 G 液, 悬浮沉淀, 置于 -80°C 保存。

离心步骤中用到的缓冲液配方如下, D 液: 0.3 mol/L 蔗糖溶液、50 mmol/L Tris、1.5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.7; E 液: 1.98 mol/L 蔗糖溶液、50 mmol/L Tris、1.5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.7; F 液: 20 mmol/L Tris、1 mmol/L DTT, pH 7.7, 均在 4°C 保存; G 液: 甘油。

1.2.4 细胞核纯度及活性检验 取 S2、C2、C4、S5 和 C5 各 100 μl , 稀释 10 倍后, 分别按 1.2.2 中步骤进行 Hoechst 染色, 在荧光显微镜下观察细胞核形态和大小。

1.2.5 亚细胞组分标志酶的活性测定 按照 Beneking 等(1978), 测定细胞膜标志酶 5'-核苷酸酶(5'-NT); 参照 Storrie 等(1990), 测定细胞质标志酶乳酸脱氢酶(LDH); 依据 Klaassen 等(1969), 测定微粒体标志酶葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase); 采用南京建成试剂盒, 测定线粒体标志酶琥珀酸脱氢酶(SDH)。蛋白质含量的测定按照 Bradford(1976), 以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白。

1.3 数据处理与分析

所有实验数据均以 4 个平行组数据的平均值 \pm 标准差(Means \pm SD)表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、差异显著性分析用 Duncan 检验法, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果

2.1 栉孔扇贝消化盲囊组织细胞匀浆与检验技术

由图 2 可以看出, Hoechst 33258 染色后, 在荧光显微镜下, 消化盲囊组织在匀浆后完整, 细胞形态饱满, 呈圆形或椭圆形, 细胞膜完整, 荧光强度较强; 而破碎细胞形态较小, 荧光强度弱, 细胞轮廓模糊。在匀浆 2 min 对照组中, 可以观察到大量完整的细胞, 随着匀浆时间的增加, 完整细胞个数减少, 荧光强度弱的颗粒数增加, 匀浆 5 min 实验组中基本没有完整细胞的存在。随着匀浆时间(2~5 min)的增加, 栉孔扇贝消化盲囊组织细胞破碎率升高, 以匀浆 2 min 为对照组, 匀浆时间为 5 min 时, 细胞破碎率达到

94.24% (表 1)。

表 1 栉孔扇贝消化盲囊在不同匀浆时间下细胞破碎率
Tab.1 Broken rate of digestive gland cells of *C. farreri* at different homogenization time

匀浆时间 Homogenization time (min)	平均完整细胞数量 Average cell number (ind.)	破碎率 Broken rate (%)
2	556 \pm 9.91 ^a	0
3	433 \pm 6.55 ^b	22.12
4	86 \pm 5.12 ^c	84.53
5	32 \pm 3.30 ^d	94.24

注: 匀浆 2 min 作为对照组, 同一列标有不同上标字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: 2 min homogenization group was the control group, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$)

2.2 栉孔扇贝消化盲囊组织亚细胞组分的鉴定

将栉孔扇贝消化盲囊亚细胞分离组分(S2、C2、C4、S5 和 C5)进行 Hoechst 33258 染色, 在荧光显微镜下观察, C2 组分荧光强度最强, 视野中荧光颗粒数多, 颗粒间粘黏比例低, 说明细胞核提纯质量较好(图 3); 其他组分荧光强度弱, 基本观察不到荧光颗粒。因此, 细胞核主要存在于 C2 组分中, 其他组分中不存在细胞核。

由表 2 可知, 细胞膜(5'-NT)、线粒体(SDH)、微粒体(G-6-Pase)和细胞质(LDH)标志酶在栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分(S2、C2、C4、S5 和 C5)中显示有不同的分布, 其中, 5'-NT、SDH、LDH 和 G-6-Pase 分别在 S2、C4、S5 和 C5 组分中占有高比例(63.90%、64.89%、77.82%和 67.55%)的标志酶活性(图 4), 由此推测, S2、C4、S5 和 C5 分离组分分别为细胞膜、细胞质、线粒体和微粒体。虽然 4 种亚细胞组分标志酶在 C2 中均有微量检出, 但结合细胞核 Hoechst 33258 染色结果, 确定为细胞核。综合标志酶检测和 Hoechst 33258 染色细胞核的结果, 本实验得到的 S2、C2、C4、S5 和 C5 分别为细胞膜、细胞核、线粒体、细胞质和微粒体。

3 讨论

3.1 贝类组织细胞匀浆方法

动物组织细胞匀浆质量直接关系到亚细胞组分的充分释放和完整程度, 实验材料处理方法、匀浆方法和匀浆介质等是影响组织匀浆质量的重要因素。新鲜动物肝脏是亚细胞组分分离的最佳材料(Mootha

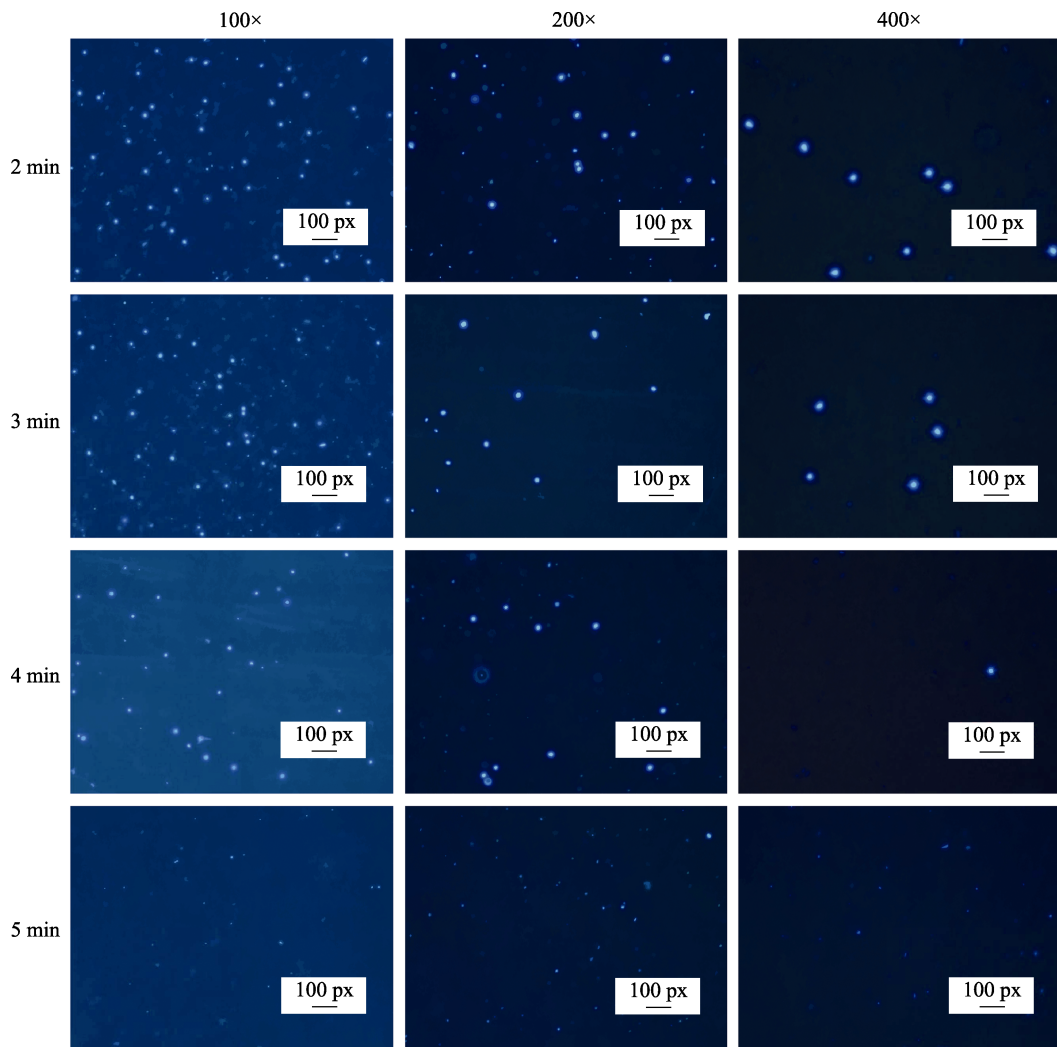


图 2 在不同匀浆时间下的栉孔扇贝消化盲囊细胞 Hoechst 33258 染色

Fig.2 Hoechst 33258 staining of digestive gland cells of *C. farreri* at different homogenization time

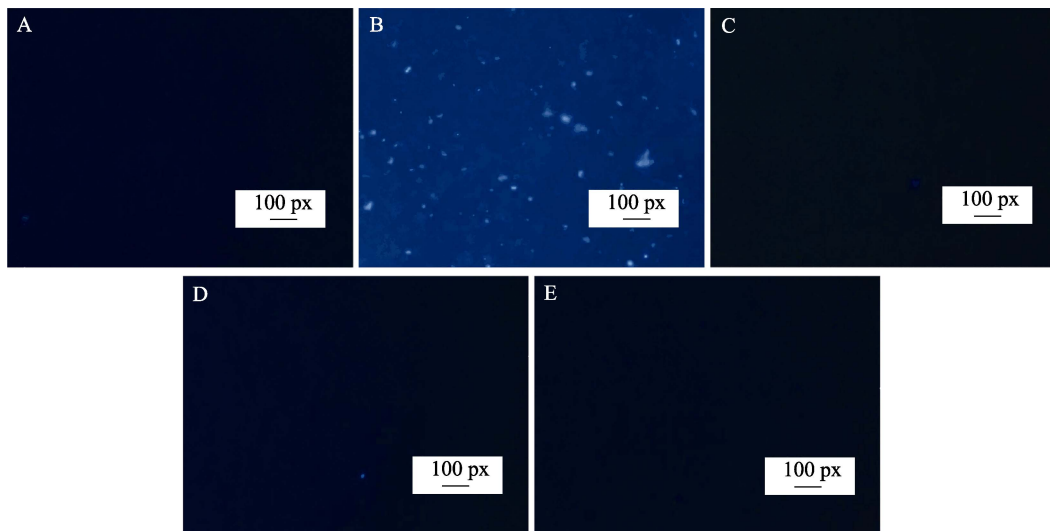


图 3 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分的 Hoechst 33258 染色

Fig.3 Hoechst 33258 staining of digestive glands subcellular fractions of *C. farreri*

A: S2; B: C2; C: C4; D: S5; E: C5

表2 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分标志酶分布
Tab.2 Distribution of marker enzymes in subcellular fractions of digestive glands of *C. farreri*

标志酶 Marker enzymes	分离亚细胞组分 Subcellular fractions				
	S2	C2	C4	S5	C5
5'-核苷酸酶活力 5'-nucleotidase [nmol/(min·mg prot)]	21.73±0.14 ^e	0.81±0.01 ^a	2.55±0.03 ^c	7.78±0.30 ^d	1.14±0.02 ^b
琥珀酸脱氢酶活力 Succinate dehydrogenase (U/mg prot)	0.78±0.11 ^b	0.26±0.01 ^a	4.91±0.12 ^d	1.1±0.08 ^c	1.16±0.07 ^c
乳酸脱氢酶活力 Lactate dehydrogenase (U/mg prot)	1.19±0.07 ^b	0.09±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a	6.35±0.66 ^c	0.46±0.01 ^{ab}
葡萄糖-6-磷酸酶活力 Glucose-6-phosphatase [nmol/(min·mg prot)]	2.55±0.02 ^c	0.65±0.04 ^a	1.14±0.01 ^b	5.47±0.01 ^b	12.07±0.24 ^d

注: 同一行中标有不同上标字母表示差异性显著($P<0.05$)

Note: Different superscripts in the same line indicate significant differences ($P<0.05$)

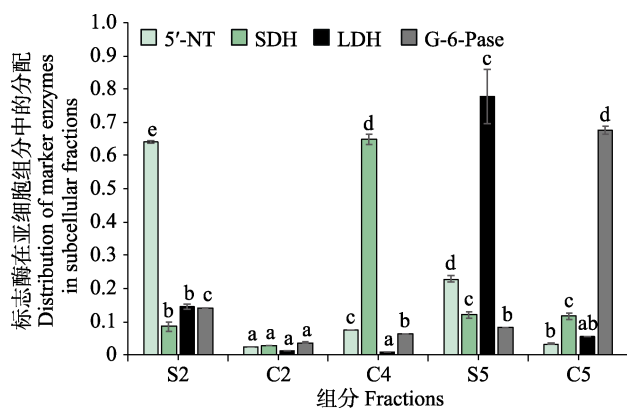


图4 栉孔扇贝消化盲囊的5种亚细胞组分标志酶活性比例

Fig.4 Distribution of marker enzymes in five subcellular fractions of digestive glands tissues of *C. farreri*

以栉孔扇贝消化盲囊亚细胞各分离组分(S2、C2、C4、S5和C5)标记酶活性总和为参照,计算各分离组分所占标记酶活性的比例。同一颜色柱子标有不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)

The total activity of marker enzymes in subcellular fractions (S2, C2, C4, S5, and C5) of digestive glands of *C. farreri* was used as a reference to calculate the proportions of the marker enzymes activity in each isolated fraction. Different letters in the column of the same color indicate significant differences ($P<0.05$)

et al., 2003; Kikuchi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Bagshaw *et al.*, 2005), 但有时因为实验条件限制, 低温冷冻的实验材料也被用来离心分离亚细胞组分(Hoffmann *et al.*, 2005)。Song等(2006)研究显示, 小鼠(*Mus musculus*)冷冻肝脏制备的亚细胞组分回收率显著低于新鲜肝脏组和冷冻均质肝脏组。Nielsen等(2005)研究显示, 冷冻处理导致细胞核破碎释放DNA, 会引起其他膜系细胞器的聚集, 不利于细胞膜和其他

亚细胞组分的分离。因此, 不建议冷冻肝脏用于亚细胞组分分离研究。此外, 还应根据待均质化的组织类型和实验的具体目的, 合理选择玻璃匀浆、过滤、研磨、超声处理、酶溶解等匀浆方法。本研究以新鲜栉孔扇贝消化盲囊组织作为实验材料, 采用玻璃匀浆法研磨组织细胞, 整个匀浆、分离过程严格控制实验温度在 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$, 亚细胞组分分离效果好、损伤小。

动物组织匀浆介质的选择和制备要考虑渗透压、pH、蛋白质保护剂等条件, 这对于亚细胞组分的分离及完整性至关重要。已有研究表明, 在蔗糖溶液中加入低浓度的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 可防止细胞核团簇(Anderson *et al.*, 1951; Hogeboom *et al.*, 1952), 但 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的存在对线粒体的功能有害(Graham *et al.*, 2006); 因而, 在匀浆缓冲液中加入100 mmol/L KCl, 或在细胞核分离步骤完成后, 往上清液中加入EDTA, 可平衡 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等引起的核粘连以及核和其他碎片粘连(费一楠等, 2007)。本研究中, 栉孔扇贝消化盲囊组织细胞匀浆缓冲液已经过预实验优化, 结果显示, 匀浆液中不加细胞核稳定剂 MgCl_2 , 会发生细胞核大面积团簇现象, 而加入 MgCl_2 的实验组, 得到的细胞核分散、形态清晰、个体完整, 这与上述一些研究结果类似。与Livingstone等(1984)在紫贻贝上和Siebert等(2017)在牡蛎上所用匀浆缓冲液相比, 其优点在于能更好地保护膜蛋白, 且协调了 MgCl_2 能减少细胞核破裂、结块的优点和影响其他细胞器功能缺点之间的矛盾。

3.2 贝类组织细胞匀浆破碎率检验方法

目前, 动物组织细胞匀浆破碎率大多利用形态学手段如台盼蓝染色(Lepvrier *et al.*, 2017)、相差显微镜观察(Huber *et al.*, 2003)等方法检验, 通过测定完整细胞的数量和观察细胞核的聚集情况, 来评估均质化的

质量,但这些方法存在观察结果模糊、对比不明显等缺点。Hoechst 33258 是一种毒性较低的蓝色荧光染料,因其能穿透细胞膜与核酸结合,常用于细胞凋亡检测和活细胞标记(谢兴文等, 2012; 吴彪等, 2013; 王净等, 2015)。本研究利用 Hoechst 33258 染色的特性,通过该方法观察不同匀浆时间里的完整细胞数量,结果显示,经玻璃匀浆 5 min 时完整细胞数目最少,匀浆效果较好。同时,将 Hoechst 33258 染色结果与血球计数板计数结果进行比较,验证了 Hoechst 33258 染色法检验匀浆破碎率的可行性。由此,建立了栉孔扇贝(贝类)消化盲囊组织细胞匀浆破碎率 Hoechst 33258 染色检验方法。

3.3 贝类组织亚细胞组分鉴定与纯度分析

亚细胞组分分离技术在过去的几十年中得到了很大完善,同时,也发展出了一系列提纯亚细胞组分的方法,如重复洗涤、密度梯度离心或其他蛋白质纯化程序(Pasquali *et al*, 1999),但要得到纯净的亚细胞组分仍然是现在细胞生物学中很难实现的目标。提纯亚细胞组分的每一步操作都以损失亚细胞组分的活性为代价,因此,分离纯化亚细胞组分的纯度只要达到实验要求即可。

标志酶、蛋白质印迹、电镜观察等方法是常用的动物组织细胞亚细胞组分鉴定与纯度分析方法(Fleischer *et al*, 1974; Cooper *et al*, 2010; Lieb *et al*, 2010),其中,标志酶法通过检测各个亚细胞分离组分的标志酶活性大小和酶活性贡献比率,获得亚细胞组分纯度和分布信息(Andreyev *et al*, 2010),如某一目标亚细胞组分中检测到有对应的标记酶以外的其他标志酶活性,则表明存在其他亚细胞组分,通过计算标记酶的酶活性贡献比率,可以得到亚细胞组分富集和分布情况。Siebert 等(2017)未对牡蛎消化盲囊组织离心得到的微粒体和细胞质进行鉴定和纯度分析,难以保证实验精确性; Livingstone 等(1984)利用琥珀酸脱氢酶(SDH)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6PASE)、丙酮酸激酶(PK)对紫贻贝消化盲囊线粒体、细胞质、微粒体进行鉴定,且用标志酶活性大小表示它们的富集情况,结果显示, G6PASE 酶活性在分离得到的其他几个组分中都有较高的检出,微粒体富集程度不理想。

本研究通过 5'-核苷酸酶、琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶和葡萄糖-6-磷酸酶鉴定了细胞膜、线粒体、细胞质、微粒体 4 种亚细胞组分的种类,且通过标志酶活力大小和酶活性贡献比率显示 4 种标志酶分别在 S2、C4、S5 和 C5 组分中占有高比例(63.90%、64.89%、77.82%和 67.55%)的标志酶活性。由此确定, S2、C2、

C4、S5 和 C5 组分分别为细胞膜、细胞核、细胞质、线粒体和微粒体。另外,本研究将分离组分(S2、C2、C4、S5 和 C5)用 Hoechst 33258 染色,镜检发现, C2 组分荧光强度最强,荧光颗粒数目多,其他组分荧光强度微弱,荧光颗粒数目稀少,由此推出细胞核存在于 C2 组分中。由此说明,本研究不仅分离、鉴定出 5 个栉孔扇贝消化盲囊组织亚细胞组分,还获得了活性良好的细胞核,充分证明本研究建立的栉孔扇贝组织细胞亚细胞组分分离、鉴定方法是可行的,对于贝类组织细胞亚细胞组分分离鉴定和生理机制研究具有重要意义。

参 考 文 献

- Anderson NG, Wilbur KM. Studies on isolated cell components: II. The release of a nuclear gel by heparin. *Journal of General Physiology*, 1951, 34(5): 647-655
- Andreyev AY, Shen Z, Guan Z, *et al*. Application of proteomic marker ensembles to subcellular organelle identification. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2010, 9(2): 388-402
- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 4(2): 133-143
- Beneking M, Schmidt H, Weiss G. Subcellular distribution of a factor inactivating tyrosine aminotransferase. *FEBS Journal*, 1978, 82(1): 235-243
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254
- Chen Y, Yu L. Research progress of membranous organelles and their subcellular structures in China. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(19): 2055-2062 [陈扬, 俞立. 膜性细胞器及其亚结构的动态调控机制国内研究进展. *科学通报*, 2017, 62(19): 2055-2062]
- Cooper S, Hare L, Campbell PG. Subcellular partitioning of cadmium in the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, after separate short-term exposures to waterborne or diet-borne metal. *Aquatic Toxicology*, 2010, 100(4): 303-312
- Fei YN, Zhang Z, Cao C, *et al*. The culture of tobacco suspension cells and the isolation of organelles. *Journal of Capital Normal University (Natural Science)*, 2007, 28(2): 68-74 [费一楠, 张钊, 曹聪, 等. 烟草悬浮系培养与细胞器的分离. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 28(2): 68-74]
- Fleischer S, Kervina M. Subcellular fractionation of rat liver. *Methods in Enzymology*, 1974, 31(Pt A): 6-41
- Graham J, Harris JR. Isolation and functional analysis of organelles. *Cell Biology Protocols*. John Wiley and Sons,

- Ltd, 2006, 87–151
- He F, He DC. The development of the techniques of subcellular isolation. *Modern Instruments*, 2005, 11(2): 1–5 [贺芳, 何大澄. 亚细胞器分离纯化技术的发展. *现代仪器*, 2005, 11(2): 1–5]
- Heidrich HG, Dew ME. Preparative free-flow electrophoresis for the isolation of membrane, organelle and cell fractions from rabbit kidney cortex. *Current Problems in Clinical Biochemistry*, 1976, 6(S2): 108–112
- Hoffmann K, Blaudszun J, Brunken C, *et al.* New application of a subcellular fractionation method to kidney and testis for the determination of conjugated linoleic acid in selected cell organelles of healthy and cancerous human tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381(6): 1138–1144
- Hogeboom GH, Schneider WC, Striebich MJ. Cytochemical studies. V. On the isolation and biochemical properties of liver cell nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, 196(196): 111–120
- Huber LA, Pfaller K, Vietor I. Organelle proteomics: Implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circulation Research*, 2003, 92(9): 962–968
- Islinger M, Kirsch J, Angermüller S, *et al.* Subcellular fractionation of brain tissue using free-flow electrophoresis. *Neuroproteomics*, 2011 in Li K. (eds) *Neuroproteomics. Neuromethods*, vol 57. Humana Press, Totowa, NJ
- Jadot M, Boonen M, Thirion J, *et al.* Accounting for protein subcellular localization: A compartmental map of the rat liver proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2017, 16(2): 194
- Jiang XS, Zhou H, Zhang L, *et al.* A high-throughput approach for subcellular proteome identification of rat liver proteins using subcellular fractionation coupled with two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry and bioinformatic analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2004, 3(5): 441
- Keiichi K, Tatsuya O, Ryuichi W, *et al.* *In vitro* acylation of okadaic acid in the presence of various bivalves' extracts. *Marine Drugs*, 2013, 11(2): 300–315
- Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, *et al.* Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(1): 421–428
- Kiri AN, Tran HC, Drahos KL, *et al.* Proteomic changes in bovine heart mitochondria with age: Using a novel technique for organelle separation and enrichment. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2005, 16(4): 371
- Klaassen CD, Plaa GL. Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1, 1, 2-trichloroethane and 1, 1, 1-trichloroethane. *Biochemical Pharmacology*, 1969, 18(8): 2019–2027
- Lepvrier E, Martin S, Collet B. Production of the non-apoptotic metalloprotease-cleaved CD95L and its cytotoxic recombinant counterpart designed Ig-CD95L. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1557: 1–10
- Li KW, Hornshaw MP, van der Schors RC, *et al.* Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density: Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(2): 987–1002
- Lieb B, Gebauer W, Gatsogiannis C, *et al.* Molluscan megahemocyanin: An ancient oxygen carrier tuned by a 550 kDa polypeptide. *Frontiers in Zoology*, 2010, 7(1): 14
- Livingstone DR, Farrar SV. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed- function oxygenase and benzo [a] pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Science of the Total Environment*, 1984, 39(3): 209–235
- Merino V, Kumar NS. Isolation, affinity purification and biochemical characterization of a lysosomal cathepsin D from the deuterostome *Asterias rubens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(3): 240–246
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, *et al.* Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 2003, 115(5): 629–640
- Nielsen PA, Olsen JV, Podtelejnikov AV, *et al.* Proteomic mapping of brain plasma membrane proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 4(4): 402–408
- Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, 722(1–2): 89–102
- Siebert MN, Mattos JJ, Piazza CE, *et al.* Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 203: 115–121
- Song Y, Hao Y, Sun A, *et al.* Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, 2006, 6(19): 5269–5277
- Storrie B, Amadden E. Isolation of subcellular organelles. *Methods in Enzymology*, 1990, 182: 203–225
- Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, *et al.* A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *American Journal of Pathology*, 2002, 161(3): 799–805
- Vitale N, Horiba K, Ferrans VJ, *et al.* Localization of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) in lysosomes and Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(15): 8613–8618
- Wang J, Han YP, Yang RF, *et al.* Optimization of labeling and localizing bacterial membrane and nucleus with FM4-64 and Hoechst dyes. *Acta microbiologica Sinica*, 2015, 55(8): 1068–1073 [王净, 韩延平, 杨瑞馥, 等. FM4-64 和 Hoechst 染料在活细菌胞膜和拟核标记定位中的条件优

- 化与应用. 微生物学报, 2015, 55(8): 1068–1073]
- Wang W, Wang J, Xue L. Expression of Smac/Diablo in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage and protective mechanism of Shenfu injection. *Apoplexy and Nervous Diseases*, 2012, 29(9): 790–793 [王伟, 王军, 薛莉. HIBD 新生大鼠线粒体凋亡蛋白 Smac/Diablo 的亚细胞器表达及参附注射液的干预作用. 中风与神经疾病, 2012, 29(9): 790–793]
- Wu B, Yu T, Yang AG, *et al.* Cytological observations on fertilization of *Scapharca broughtonii* from China and Korea. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 64–68 [吴彪, 于涛, 杨爱国, 等. 不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 64–68]
- Xie XW, Hou FY, Li N, *et al.* Hoechst33342 for labeling rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2012(49): 9146–9151 [谢兴文, 侯费祎, 李宁, 等. Hoechst33342 对大鼠骨髓间充质干细胞的标记. 中国组织工程研究, 2012(49): 9146–9151]
- Zhao YF, Shang DR, Ning JS, *et al.* Subcellular distributions of trace metals in *Sargassum fusiforme*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 118–123 [赵艳芳, 尚德荣, 宁劲松, 等. 羊栖菜中微量金属元素的亚细胞分区分布. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 118–123]

(编辑 马璀璨)

Isolation and Identification of Subcellular Fractions from Digestive Glands of *Chlamys farreri*

CHEN Wei, WEI Shouxiang, LI Yuhan, PAN Luqing^①

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract In this study, homogenization, centrifugation, microscopy, and marker enzyme assays were used to study the separation and identification techniques for subcellular fractions of the digestive gland tissues of *Chlamys farreri*. The results showed that after Hoechst 33258 staining, a large number of intact cells, which were round or elliptical, with complete cell membrane and high fluorescence intensity, were observed in the 2 min homogenization group. In the 3, 4, and 5 min homogenization group, the number of intact cells gradually decreased, and many cell fragments with small morphology, weak fluorescence, and blurred outline appeared. Additionally, the blood cell counting results were consistent with the Hoechst staining results. With the increase in homogenization time (2~5 min), the broken cell rate was increased under an optical microscope and when the 2 min homogenization group was used as the control group, the broken cell rate reached 94.24% in the 5 min homogenization group. There were more fluorescent particles in C2 with appropriate size, and clear structure, and fewer fluorescent particles were observed in other separated fractions, when fractions (S2, C2, C4, S5, and C5) of the digestive gland tissues of *C. farreri* were stained with Hoechst 33258. Therefore, the nucleus mainly presented in the C2 fraction. At the same time, the marker enzyme activity of the cell membrane (5'-nucleotidase), mitochondria (succinate dehydrogenase), cytoplasmic (lactate dehydrogenase), and microsomes (glucose-6-phosphatase) accounted for a high proportion (63.90%, 64.89%, 77.82%, and 67.55%) in the S2, C4, S5, and C5 fractions, respectively; however, there were also a small amount found in other subcellular fractions. As a result, the separated fractions of S2, C2, C4, S5, and C5 were cell membrane, nucleus, mitochondria, cytoplasm, and microsomes, respectively, and the technical methods for separation and identification of subcellular fractions of the digestive gland tissues of *C. farreri* were successfully determined.

Key words *Chlamys farreri*; Digestive glands tissues; Subcellular fractions; Isolation and identification

① Corresponding author: PAN Luqing, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190225001

http://www.yykxjz.cn/

徐涵, 薛素燕, 李加琦, 丁敬坤, 霍恩泽, 张雯雯, 毛玉泽, 方建光. 短期高盐胁迫对脆江蓠抗氧化酶活性及光合酶活性的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 119–124

Xu H, Xue SY, Li JQ, Ding JK, Huo EZ, Zhang WW, Mao YZ, Fang JG. Effects of short period high-salinity stress on antioxidant enzyme activities and photosynthesis enzyme activities of *Gracilaria chouae*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 119–124

短期高盐胁迫对脆江蓠抗氧化酶活性 及光合酶活性的影响*



徐 涵^{1,3} 薛素燕^{1,2} 李加琦^{1,2} 丁敬坤^{1,3}
霍恩泽^{1,3} 张雯雯^{1,3} 毛玉泽^{1,2①} 方建光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 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用实验生态学方法, 研究了脆江蓠(*Gracilaria chouae*)相关酶活性对短期高盐胁迫的响应, 旨在为提高脆江蓠规模化养殖育苗效率提供理论依据。实验设置 5 个盐度梯度(40、45、50、55 和 60), 自然海水作为对照组, 研究了高盐处理 0.5 h 及自然海水恢复 12 和 24 h 对脆江蓠抗氧化酶和光合酶活性的影响。结果显示, 高盐胁迫 0.5 h 后, 随盐度的升高, 脆江蓠的抗氧化酶中, 超氧化物歧化酶(SOD)活性逐渐升高($P<0.05$), 过氧化物酶(POD)活性呈波动变化($P<0.05$), 过氧化氢酶(CAT)活性逐渐降低但差异不显著($P>0.05$), 丙二醛(MDA)含量随盐度升高显著升高($P<0.01$), 上述抗氧化酶活性均在盐度 50~55 时出现极值; 脆江蓠光合作用关键酶 Rubisco 活性随盐度升高逐渐降低($P<0.01$), 碳酸酐酶(CA)含量随盐度增加略有增加($P<0.05$)。随恢复时间的增加, 脆江蓠 SOD、POD 和 CAT 活性逐渐升高($P<0.05$), MDA 含量显著降低($P<0.05$); Rubisco 活性逐渐升高($P<0.05$), CA 含量呈波动变化。研究表明, 短期高盐胁迫显著影响脆江蓠藻体抗氧化酶和光合酶活性, 藻体通过提高抗氧化酶活性以及加强对无机碳的吸收利用来应对高盐胁迫, 胁迫去除后逐渐恢复至正常水平。

关键词 脆江蓠; 高盐胁迫; 抗氧化酶; 光合酶

中图分类号 S968 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)03-0119-06

脆江蓠(*Gracilaria chouae*)是我国特有的暖水种经济红藻, 具有较高的研究价值。前期研究表明, 短

期高盐海水浸泡脆江蓠使其藻体软化, 用于实际育苗生产的前处理方法是可行的, 该方法育苗牢固, 对藻

* 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创新团队项目(LMEES-CTSP-2018-4)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2019ZD0105)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017010)和山东省海洋与渔业科技创新计划项目共同资助 [This work was supported by Creative Team Project of the Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao)(LMEES-CTSP-2018-4), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD0105), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017010), and Marine and Fishery Science and Technology Innovation Project of Shandong Province]. 徐 涵, E-mail: m160111259@st.shou.edu.cn

① 通讯作者: 毛玉泽, 研究员, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-02-25, 收修改稿日期: 2019-04-11

体损伤小,且可在短期内恢复正常。但高盐度诱发活性氧积累会造成海藻损伤,而海藻抗氧化系统清除活性氧能力在海藻耐盐能力中起着重要作用。对高等植物研究发现,盐胁迫可增加植物体内活性氧的产生,造成氧化胁迫(Heidari *et al.*, 2011)。在大型红藻的研究中也发现,盐度胁迫会引起藻体内抗氧化酶活性的升高(李晓蕾等, 2019; Kumar *et al.*, 2010)。抗氧化酶活性与藻类的抗逆性之间有着重要的相关性(Dummermuth *et al.*, 2003)。在系统进化中,藻类进化出一套自由基清除系统来去除体内过多的氧自由基,抵抗氧化胁迫,从而避免藻体损伤。植物的抗氧化系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等酶促抗氧化系统和包括抗坏血酸、类胡萝卜素和脯氨酸等在内的非酶促抗氧化系统。

通常盐碱胁迫会减弱植物的光合作用,而藻类的生长发育及产量与光合作用密切相关(徐涵等, 2019)。高盐胁迫下,植物细胞发生水分亏缺,光合作用能力与叶绿体内的光合酶活性有关(Kaiser *et al.*, 2015)。研究表明,细胞在缺水条件下,光合作用的下调与抗氧化酶的活性有关,此时,细胞内活性氧自由基(ROS)大量积累,抗氧化系统作用减弱,造成细胞膜脂过氧化损伤,从而导致了植物光合碳同化能力下降(闻志彬等, 2015)。植物光合碳同化途径可以随环境改变发生适应性变化(Hibberd *et al.*, 2004),大型海藻的光合碳代谢除了 C_3 途径外,通常还同时存在不一定完整的 C_4 途径(芦笛, 2013)。作为 C_3 途径的补充, C_4 植物具有高光合效率、低 CO_2 补偿点、几乎没有光呼吸等特点(李卫华等, 1999),尤其在干旱、盐碱胁迫下, C_4 植物具有明显的生长优势及水分和营养利用率(Hatch, 1987)。

目前,有关盐度对脆江蓠影响的研究甚少,主要为低盐对脆江蓠生长、光合色素含量及抗氧化酶活性等影响方面的少数研究(金玉林等, 2012; 解修俊等, 2014)。但高盐胁迫对脆江蓠影响的研究还未见报道。本研究通过测定不同高盐度和不同处理时间对脆江蓠抗氧化酶以及光合作用相关酶含量的变化,探讨高盐胁迫对脆江蓠光合作用相关酶活性的影响以及脆江蓠抗氧化酶活性对短期盐度胁迫的调控作用,为大型藻类耐盐机制的研究提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

脆江蓠取自山东省青岛市城阳水产批发市场,低温运回实验室。选取生长状况良好,形态一致的藻体,

灭菌海水反复冲洗至表面无杂质, GXZ 智能光照培养箱(宁波江南仪器厂)预培养 7 d。培养海水取自胶州湾养殖区(盐度为 32, pH 为 7.99, 无机氮浓度为 $56.9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 无机磷浓度为 $2.16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), 1 L 培养液放入 1 g 藻体, 温度为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度为 $(70 \pm 10) \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 光照周期为 12 L : 12 D。每天更换一次培养液。

1.2 浸泡处理

使用 NaCl 溶解于灭菌自然海水的方法, 调节水体盐度至 40、45、50、55 和 60。将脆江蓠浸泡于上述盐度海水中, 光照培养箱培养(培养条件与暂养一致) 0.5 h 后, 置于自然灭菌海水中恢复 12、24 h, 每个处理设置 3 个重复。选取健康、生长一致藻体, 无菌海水冲洗 3 次并吸干表面水分, 进行酶活测定实验, 自然海水作为对照组。

1.3 抗氧化相关酶活性的测定

脆江蓠 SOD、POD、CAT 和丙二醛(MDA)活性使用南京建成酶活试剂盒测定, 具体方法参见试剂盒使用说明书。

1.4 光合碳代谢相关酶活性的测定

脆江蓠 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性使用索莱宝酶活试剂盒测定, 碳酸酐酶(CA)活性使用 Melson 检测试剂盒测定, 具体方法参见试剂盒使用说明书。

1.5 数据处理和统计学分析

使用 Excel 2013 进行数据处理; 采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 使用 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为显著标准。

2 结果

2.1 高盐处理对脆江蓠抗氧化相关酶、MDA 活性的影响

如图 1~图 4 所示, 盐度胁迫显著影响脆江蓠抗氧化酶活性及 MDA 含量($P < 0.05$)。高盐处理 0.5 h 后, SOD 活性随盐度升高, 呈先降低后升高趋势($P < 0.05$), 盐度为 55 时达最大值。POD 活性随盐度升高波动变化($P < 0.05$)。CAT 活性随盐度升高略有降低, 但与对照组间差异不显著($P > 0.05$)。MDA 含量随盐度升高呈先降低后升高($P < 0.01$), 盐度为 40 时含量最低, 盐度为 55 时达最大值。

恢复 12 h 后, 脆江蓠抗氧化酶系统活性变化见图 1~图 4, 随盐度的升高, SOD 活性逐渐升高

($P < 0.01$)(图 1), 盐度为 55 时含量最高。POD 活性随盐度升高呈与高盐处理 0.5 h 相反的趋势波动变化 ($P < 0.05$)(图 2)。CAT 活性随盐度升高逐渐降低 ($P < 0.01$)(图 3), 盐度为 55 时含量最低。MDA 含量变化趋势与盐处理 0.5 h 相同($P < 0.01$), 较盐处理 0.5 h 含量低(图 4)。

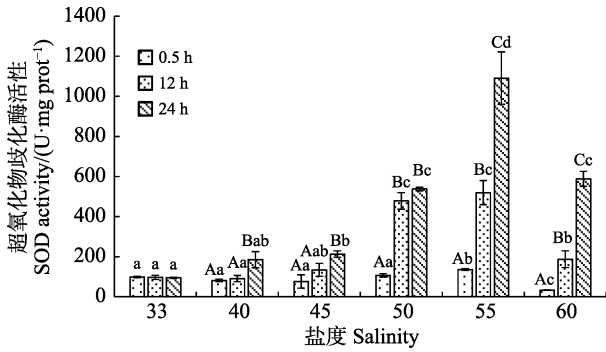


图 1 盐度对脆江蓼超氧化物歧化酶活性的影响
Fig.1 The effect of salinity on SOD activity of *G. chouae*

不同小写字母表示同一处理时间下不同盐度处理组间差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一盐度处理组在不同处理时间下差异显著($P < 0.05$)。下同
Different lowercases indicate significant difference ($P < 0.05$) among different groups at the same time. Different uppercases lowercases indicate significant difference ($P < 0.05$) at different time point of the same group. The same as below

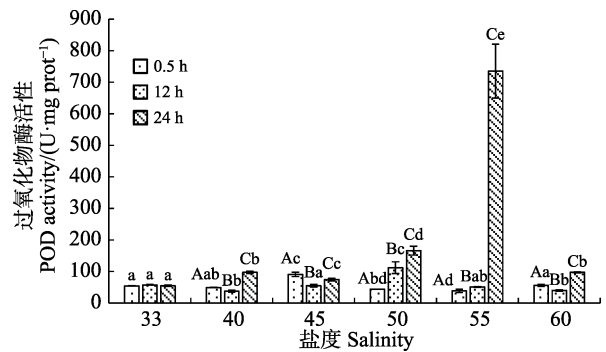


图 2 盐度对脆江蓼过氧化物酶活性的影响
Fig.2 The effect of salinity on POD activity of *G. chouae*

胁迫去除后, 随恢复时间的增加, 藻体内抗氧化酶活性显著升高($P < 0.01$), MDA 含量明显降低(图 1~图 4)。SOD 活性随恢复时间的增加显著升高($P < 0.01$), 恢复 24 h 后, 随盐度的增加显著升高($P < 0.01$)。POD 活性随恢复时间的增加而升高($P < 0.01$), 恢复 24 h 后, POD 活性波动变化总体呈升高趋势($P < 0.05$), 盐度为 55 时达最大值。除盐度 40 组外, 各盐度处理组 CAT 活性随恢复时间的增加而升高, 盐度为 50 和 55 时最为显著($P < 0.01$), 且随恢复时间的增加而升高。MDA 含量与盐处理 0.5 h 相比明显降低。

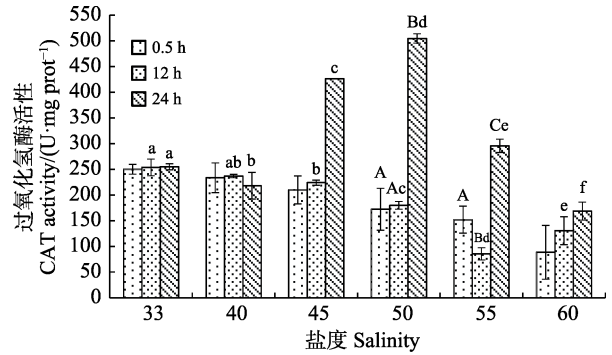


图 3 盐度对脆江蓼过氧化氢酶活性的影响
Fig.3 The effect of salinity on CAT activity of *G. chouae*

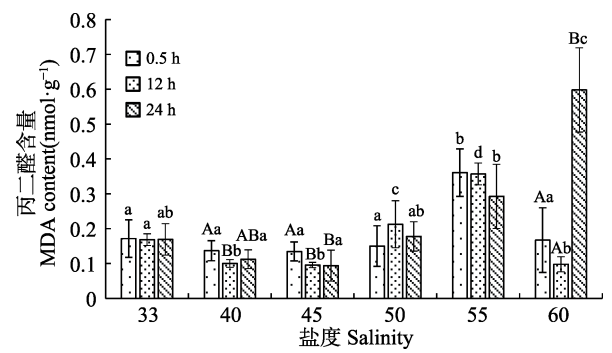


图 4 盐度对脆江蓼丙二醛含量的影响
Fig.4 The effect of salinity on MDA content of *G. chouae*

2.2 高盐处理对脆江蓼光合作用关键酶活性的影响

盐处理 0.5 h 及恢复 24 h 后脆江蓼 Rubisco 活性变化见图 5。盐处理 0.5 h 后, 随着盐度增加, Rubisco 活性呈先增加后减少的趋势($P < 0.01$)。经过 24 h 恢复, 盐度为 40、50 及 60 组 Rubisco 活性显著增加($P < 0.01$)。

盐处理 0.5 h 后(图 6), 盐度 55 组 CA 含量显著低于对照组($P < 0.05$), 其余各处理组与对照组相比 CA 含量有所增加。恢复 24 h 后, 与盐处理 0.5 h 相比, 盐度 45、50 和 60 组中 CA 含量开始降低, 盐度为 55 组 CA 含量显著增加($P < 0.05$)。

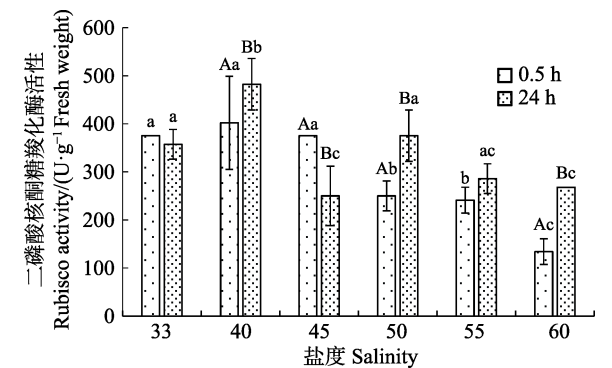


图 5 盐度对脆江蓼二磷酸核酮糖羧化酶活性的影响
Fig.5 The effect of salinity on Rubisco activity of *G. chouae*

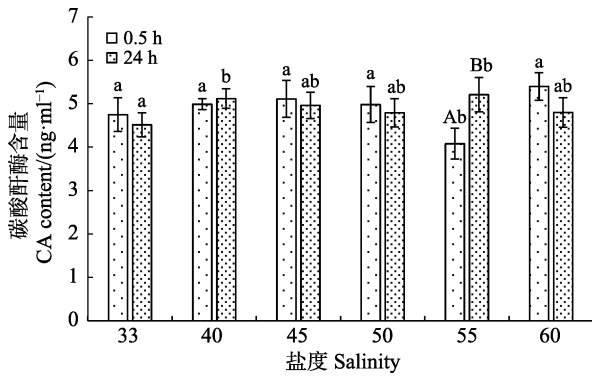


图6 盐度对脆江蓼碳酸酐酶含量的影响

Fig.6 The effect of salinity on CA content of *G. chouae*

3 讨论

3.1 脆江蓼抗氧化酶系统对短期高盐胁迫的调控作用

高渗透压胁迫下,在不同光、重金属等环境胁迫,大型藻类藻体会发生快速、强烈但短期的活性氧(ROS)猝发(Dring, 2005)。ROS的大量积累,会引起植物膜结构和功能的破坏、DNA突变及蛋白质降解(Bowler *et al.*, 1992)等生物损伤。大型藻类在逆境胁迫下进化出一套自由基清除系统,通过增加细胞内抗氧化物、SOD、POD、CAT等抗氧化酶的含量清除过多的活性氧,减少细胞损伤(Dring, 2005)。本研究中,盐度处理0.5 h,藻体SOD活性在盐度为45以后随盐度增加而升高,盐度为55时达最大值,这与金玉林(2012)的研究结果相似。SOD是抗氧化酶抵御不良环境的第一道防线,其活性增加是对体内氧自由基增加的应急解毒措施(罗广华等, 1987),在一定盐度胁迫范围内,SOD活性可随胁迫强度的增加而升高,迅速清除ROS,从而达到对机体的保护作用。POD对环境变化尤其敏感(刘晓培等, 2012),但盐度胁迫需要依赖细胞的完整性才能诱导POD酶活性(柯德森等, 2006)。本研究中,POD活性随盐度增加呈波动变化,推测其原因可能是,藻体内积累的活性氧造成细胞膜结构和功能的破坏,POD不能完全发挥作用而导致的。CAT活性随盐度增加逐渐降低,可能是由于CAT酶蛋白更易受到损伤,这与高NaCl可引起螺旋藻CAT失活的结果相似(刘志礼等, 1998)。

当机体自由基清除系统不能及时清除大量ROS时,会产生大量的脂质过氧化产物MDA,其极易与细胞内各种成分反应,从而引起细胞膜及胞内酶的严重损伤,MDA是衡量脂质损害程度的重要指标(王爱国等, 1986)。本研究中,盐处理0.5 h,盐度不超过45时,脆江蓼体内MDA含量随盐度升高呈先

减少后增加的趋势,说明在一定范围内升高盐度,脆江蓼体内自由基清除系统能有效发挥作用,降低MDA含量。当盐度继续增加,机体来不及清除体内过多ROS,MDA含量随盐度增加而升高,与冯琛等(2004)对条斑紫菜的研究结果相一致。

盐度为60时,脆江蓼藻体SOD、POD以及CAT活性都显著降低。可能是藻体受到极端胁迫时,破坏了自由基清除系统,对生物体的保护功能降低(王建华等, 1989)。当胁迫停止,随恢复时间的增加,藻体SOD、POD及CAT活性明显升高,MDA活性显著降低,表明胁迫去除后,抗氧化酶类活性增加,藻体保护系统又逐步恢复作用,大量清除ROS,藻体逐渐恢复。藻类抗氧化酶系统和抗逆性之间存在着重要的联系(Dummermuth *et al.*, 2003),抗氧化酶系统或许可以作为藻类抗逆的指标,但对藻类抗氧化酶系统抵御盐度胁迫机制的了解还不够,还需进一步研究。

3.2 短时间高盐处理对脆江蓼光合作用相关酶含量的影响

盐碱胁迫通常会减弱植物的光合作用,细胞缺水条件下,光合作用的下调与抗氧化酶的活性有关,此时细胞内ROS大量积累,抗氧化系统作用减弱,造成细胞膜脂过氧化损伤,从而导致了植物光合碳同化能力下降。影响光合作用的各种生态因子都通过Rubisco而起作用(Brüggenmann *et al.*, 1992)。本研究中,盐处理0.5 h后,轻微的盐度增加,使藻体Rubisco活性有所增加,可能是因为轻微盐度刺激ATP和呼吸产生的还原能量,增强了藻体解毒系统对活性氧释放的反应活性。盐度超过40,Rubisco活性随盐度增加显著降低,可能是因为氧化的Rubisco是一种更好的蛋白酶底物,盐度胁迫可能会增强AOS造成的Rubisco降解(Ishida *et al.*, 1997)。Rubisco可以通过调节光合作用和光呼吸来决定光合效率,高盐胁迫可能限制了藻体ATP的供应,影响了活化酶对Rubisco的激活,使Rubisco活性下降,进而对胁迫下的光合作用产生调控。有研究认为,在盐度胁迫下,鱼腥藻(*Anabaena*) Rubisco蛋白表达量增加,可能是由于离子胁迫和氧化损伤的积累效应(Rai *et al.*, 2013)。大多数红藻对CO₂和HCO₃⁻都能利用(Maberly, 1990),CA与大型海藻高效的CO₂浓缩机制(CCM)密切相关。CA通过催化CO₂和HCO₃⁻之间的相互转化,加速无机碳向羧化酶活性部位的扩散,还能增加1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)的羧化活性,降低其加氧活性,从而提高CO₂的固定速率。本研究中,盐处理0.5 h,盐度45以后,

脆江蕨体内 CA 含量随盐度增加逐渐降低, 表明高盐胁迫对藻体无机碳吸收产生了影响, CA 能对环境胁迫进行适应性调节(张震林等, 1992)。

参 考 文 献

- Bowler C, van Montagu M, Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 1992, 43(1): 83–116
- Brüggemann W, van der Kooij TAW, van Hasselt PR. Long-term chilling of young tomato plants under low light and subsequent recovery. *Planta*, 1992, 186(2): 172–178
- Dring MJ. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: The role of reactive oxygen metabolism. *Advances in Botanical Research*, 2005, 43(5): 175–207
- Dummermuth AL, Karsten U, Fisch KM, *et al.* Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 289(1): 103–121
- Fen C, Lu XZ, Yu WG. Biochemical and physiological effects of adversity stress on *Porphyra yezoensis*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(3): 22–26 [冯琛, 路新枝, 于文功. 逆境胁迫对条斑紫菜生理生化指标的影响. *海洋湖沼通报*, 2004(3): 22–26]
- Hatch MD. C₄ photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Reviews on Bioenergetics*, 1987, 895(2): 81–106
- Heidari M, Jamshidi P. Effects of salinity and potassium application on antioxidant enzyme activities and physiological parameters in pearl millet. *Journal of Integrative Agriculture*, 2011, 10(2): 228–237
- Hibberd JM. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist*, 2004, 161(2): 341–370
- Ishida H, Nishimori Y, Sugisawa M, *et al.* The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(4): 471–479
- Jin YL. Preliminary study on experimental ecology of *Gracilaria chouae*. Master's Thesis of Shantou University, 2012, 1–61 [金玉林. 大型红藻脆江蕨实验生态学初步研究. 汕头大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–61]
- Jin YL, Wu WT, Chen WZ. Effects of different temperature and salinity on growth and biochemical constituents of *Gracilaria chouae*. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(2): 51–57 [金玉林, 吴文婷, 陈伟洲. 不同温度和盐度条件对脆江蕨生长及其生化组分的影响. *南方水产科学*, 2012, 8(2): 51–57]
- Kaiser E, Morales A, Harbinson J, *et al.* Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(9): 2415–2426
- Ke DS, Wang ZX, Yang LX. Effects of environmental factors on proteins and activity of peroxidase in *Gracilaria lemaneiformis*. *Proceedings of the 2th National Workshop on Genetic Diversity Gene Discovery of Tropical and Subtropical Plant Resources*, 2006 [柯德森, 王正询, 杨礼香. 环境因素对龙须菜蛋白质及 POD 活性的影响. 第二届热带亚热带植物资源的遗传多样性与基因发掘利用研讨会论文集, 2006]
- Kumar M, Kumari P, Gupta V, *et al.* Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 391(1): 27–34
- Li WH, Hao NB, Ge QY, *et al.* Advances in study on C₄ pathway in C₃ plant. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(2): 97–106 [李卫华, 郝乃斌, 戈巧英, 等. C₃ 植物中 C₄ 途径的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(2): 97–106]
- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, *et al.* Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 156–163]
- Liu XP, Zhang YJ, Li Y, *et al.* Effect of different salinity on physiological features of *Vallisneria natans*. *Ecological Science*, 2012, 31(6): 606–612 [刘晓培, 张饮江, 李岩, 等. 不同盐度对苦草生理特征的影响. *生态科学*, 2012, 31(6): 606–612]
- Liu ZL, Li PY. The effect of NaCl stress on the antioxidant activities and growth of *Spirulina maxima*. *Chinese Bulletin of Botany*, 1998, 15(3): 43–47 [刘志礼, 李鹏云. NaCl 胁迫对螺旋藻生长及抗氧化酶活性的影响. *植物学通报*, 1998, 15(3): 43–47]
- Lu D. Progress on photosynthetic carbon metabolism types in marine macroalgae. *Chinese Journal of Nature*, 2013, 35(4): 264–273 [芦笛. 大型海藻光合碳代谢类型的研究进展. *自然杂志*, 2013, 35(4): 264–273]
- Luo GH, Wang AG, Shao CB, *et al.* The injury of high oxygen concentration to seeds germination and seedlings growth. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1987, 13(2): 161–167 [罗广华, 王爱国, 邵从本, 等. 高浓度氧对种子萌发和幼苗生长的伤害. *植物生理学报*, 1987, 13(2): 161–167]
- Maberly SC. Exogenous source of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *Journal of Phycology*, 1990, 26(3): 439–449
- Rai S, Singh S, Shrivastava AK, *et al.* Salt and UV-B induced changes in *Anabaena PCC 7120*: Physiological, proteomic and bioinformatic perspectives. *Photosynthesis Research*, 2013, 118(1–2): 105–114
- Wang AG, Shao CB, Luo GH. Inquiry into malondialdehyde as index of peroxidation of plant lipids. *Plant Physiology Communications*, 1986(2): 55–57 [王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. *植物生理学通报*, 1986(2): 55–57]
- Wang JH, Liu HX, Xu T. The role of superoxide dismutase(SOD) in stress physiology and senescence physiology of plant.

- Plant Physiology Communications, 1989(1): 1-7 [王建华, 刘鸿先, 徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通报, 1989(1): 1-7]
- Wen ZB, Zhang ML. C₄ photosynthetic enzymes and antioxidant enzymes activities in two photosynthetic subtypes of C₄ desert plants under soil drought stress. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(9): 1815-1822 [闻志彬, 张明理. 干旱胁迫对 2 种光合类型 C₄ 荒漠植物叶片光合特征酶和抗氧化酶活性的影响. 西北植物学报, 2015, 35(9): 1815-1822]
- Xie JX, Kuang JX, Chen SM, *et al.* Effects of environmental factors on the growth of four species of *Gracilaria*. Guangxi Sciences, 2014(6): 596-599 [解修俊, 邝继鲜, 陈世明, 等. 环境因子对 4 种江蓠生长的影响. 广西科学, 2014(6): 596-599]
- Xu H, Li JQ, Xue SY, *et al.* Effects of short period high-salinity stress on photosynthetic characteristic of *Gracilaria chouae*. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(4): 722-728 [徐涵, 李加琦, 薛素燕, 等. 短时间高盐处理对脆江蓠光合生理生化指标的影响. 中国水产科学, 2019, 26(4): 722-728]
- Zhang ZL, Gao YZ, Wang Z. The role of carbonic anhydrase in photosynthetic carbon metabolism in higher plants. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1992, 8(2): 7-12 [张震林, 高煜珠, 王忠. 碳酸酐酶在高等植物光合碳代谢中的作用. 江苏农业学报, 1992, 8(2): 7-12]

(编辑 陈 辉)

Effects of Short Period High-Salinity Stress on Antioxidant Enzyme Activities and Photosynthesis Enzyme Activities of *Gracilaria chouae*

XU Han^{1,3}, XUE Suyan^{1,2}, LI Jiaqi^{1,2}, DING Jingkun^{1,3}, HUO Enze^{1,3},
ZHANG Wenwen^{1,3}, MAO Yuze^{1,2①}, FANG Jianguang¹

(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 Eco-Environment, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The effects of acute hypersalinity stress on the antioxidant and photosynthetic enzyme activities of *Gracilaria chouae* were studied. Plants were exposed to different levels of salinity ranging from 33 (control) to 60 under laboratory conditions. After incubation, plants were then transferred to seawater with a controlled level of salinity and recovered after 12 or 24 hours, respectively. The activity of antioxidant enzyme SOD increased ($P < 0.05$), the activity of POD was fluctuated ($P < 0.05$), the activity of CAT gradually decreased without significant difference ($P > 0.05$) but the content of MDA was significantly increased ($P < 0.01$). The activity of SOD、POD、CAT and MDA reached the maximum in 50~55 psu groups but decreased significantly at salinity 60; The activity of Rubisco, a key enzyme in photosynthesis of C₃, gradually decreased with the increase of salinity ($P < 0.01$). The content of CA slightly increased with the increase of salinity ($P < 0.05$). With the increase of recovery time, SOD, POD and CAT activities gradually increased ($P < 0.05$), and the activity of each antioxidant enzyme showed a maximum value in 50~55 psu groups, but MDA content decreased considerably ($P < 0.05$). Rubisco activity was significantly higher than that in 0.5 h ($P < 0.05$), and CA content fluctuated with salinity. Short period high-salinity stress significantly affected the activities of antioxidant enzymes and photosynthetic enzymes in *G. chouae*. Algae responded to hypersalinity stress by increasing the activities of antioxidant enzymes, and enhancing the absorption and utilization of inorganic carbon by CA. The alga gradually returned to the normal level after the stress was removed. The purpose of this study is to provide a theoretical basis for improving the efficiency of large-scale cultivation of *G. chouae*, and to provide basic data for the study of salt tolerance mechanism of macroalgae.

Key words *Gracilaria chouae*; High-salinity stress; Antioxidant enzyme; Photosynthetic enzymes

① Corresponding author: MAO Yuze, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190513001

http://www.yykxjz.cn/

潘雪, 茅云翔, 王俊皓, 曹敏, 毕桂萁, 杜国英. UV-B 紫外辐射对条斑紫菜生理生化的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 125-132

Pan X, Mao YX, Wang JH, Cao M, Bi GQ, Du GY. Effects of UV-B ultraviolet radiation on the physiology and biochemistry of *Pyropia yezoensis*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 125-132

UV-B 紫外辐射对条斑紫菜生理生化的影响*

潘 雪 茅云翔 王俊皓 曹 敏 毕桂萁 杜国英^①

(中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)



摘要 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)作为一种生长在潮间带的经济海藻,在适应干露失水时的高紫外辐射上有其独特的特性。本研究以无 UV-B 辐射为对照组,0.5 W/m²(低)和 2 W/m²(高)UV-B 辐射为实验组,检测条斑紫菜对 UV-B 紫外辐射响应的叶绿素荧光光合参数、多光谱荧光参数以及酪氨酸酶活性的变化。结果显示,受到 UV-B 辐射的条斑紫菜的叶绿素荧光光合参数(QY_max、NPQ_Lss、qP_Lss 和 R_{fd}_Lss)随辐照时间呈不同程度的下降趋势,并且高辐射强度下的各光合参数值低于低辐射强度,表明条斑紫菜光合作用受到辐射的负面影响;极早期胁迫参数 F440/F690 和 F440/F740 的差异表明,2 W/m² UV-B 辐射组条斑紫菜比 0.5 W/m² 辐照组更早(1 h)进入胁迫状态,且 UV-B 辐射下条斑紫菜酚醛类物质减少;与叶绿素浓度呈负相关的参数 F690/F740 变化表明,0.5 W/m² 辐照组叶绿素浓度高于对照组,而在辐照 3 h 内低于 2 W/m² 辐照组,2 W/m² 辐照组叶绿素浓度则先上升,并在辐照 4 h 下降,至 6 h 呈显著降低,说明藻体可耐受较低 UV-B 辐射,而高 UV-B 长时间辐照对藻体造成明显的伤害;对酪氨酸酶的活性检测结果表明,受到 UV-B 辐照的条斑紫菜酪氨酸酶活性显著高于对照组,且高辐照组的酶活性高于低辐照组的酶活性。

关键词 条斑紫菜; UV-B; 光合作用; 叶绿素荧光; 酪氨酸酶

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0125-08

近年来,由于大气层中臭氧层的破坏加剧,导致到达地球表面的太阳紫外辐射 UV-B 增强。有研究表明,臭氧浓度每减少 1%,到达地表的 UV-B 辐射量会增加 2%。研究日渐增强的 UV-B 对营光合作用生长的生物影响一直以来备受关注(李梅, 2013; 郭秀林等, 2001)。

UV-B 辐射对海洋藻类的生理生化影响首先体现在对其光合作用的影响上:一是破坏反应系统,光合作用的原初光化学反应在反应中心进行,光能被捕获

天线色素吸收后,经过色素间的能量传递最后到达反应中心。类囊体膜上存在 2 种光系统:光系统 I (PS I)和光系统 II (PS II)。虽然 UV-B 辐射对 PS 有影响,但 UV-B 辐射对植物的主要作用部位是 PS II,已有很多实验证据支持这一结论(师生波等, 2011)。UV-B 辐射会引起电子传递效率下降,导致光合作用被抑制,使叶绿体的放氧活性下降。其原因是:(1) 增强的 UV-B 辐射导致叶绿素(包括叶绿素 a 和叶绿素 b)和类胡萝卜素含量下降。(2) PS II 的蛋白被破坏,

* 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0302-5)资助 [This work was supported by the Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao) (2018SDKJ0302-5)]. 潘 雪, E-mail: 545166507@qq.com

^① 通讯作者: 杜国英, 副教授, E-mail: duguoguo923@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-05-13, 收修改稿日期: 2019-05-31

电子传递受阻,叶绿素吸收光而激发的高能电子传不出去,积累的能量导致叶绿素的卟啉环发生氧化—开环,光系统反应中心失活, Hill 反应活力下降, PS II 的电子传递效率降低。二是使光合作用的关键酶含量和酶活性下降,导致 CO₂ 羧化效率降低。三是引起参与卡尔文循环的酶的活性发生变化。在种子植物中, UV-B 能够引发 2 个独立的效应:一种是针对损伤的应答反应;另一种是通过磷酸化的 UV-B 感光受体,来引发光形态建成(高淑清等, 2004; Frohnmeyer *et al.*, 2003; Ulm *et al.*, 2005)。引发的反应与受到 UV-B 的波长、通量和持续时间有关。本研究中应用的叶绿素荧光检测技术是一种简便、快捷、可靠、无损伤的光合作用研究方法,在植物的光合作用、胁迫生理学、水生生物学等方面都得到了广泛的应用(简敏菲等, 2016)。

另一方面,在紫外辐射诱导下,生物体内会有相应的生化代谢产物响应。在植物中,响应紫外辐射的方式主要体现为次生代谢物的变化(陈梦, 2018);在动物中, UV-B 辐射可影响其鞘脂类代谢、核酸代谢、亚油酸代谢、氨基酸代谢等通路(王恩鹏等, 2016);在微生物中,紫外诱变改变了菌株次级代谢产物的种类(韦云, 2016)。不同种植物的叶绿素对 UV-B 紫外线辐射的敏感度不同,同种植物的叶绿素含量对不同 UV-B 辐射强度的敏感度也不同(蒋鹤鸣等, 2012; 王龙飞, 2013; 耿予欢等, 2006)。本研究使用的多光谱荧光成像技术不仅可以作为植物生物和非生物胁迫的诊断指标,其荧光参数 F440/F690 和 F440/F740 还可以表示植物次级代谢产物酚醛类化合物的变化; F690/F740 与叶绿素浓度负相关,可以表示叶绿素浓度的变化,在植物和藻类中得到了广泛应用(Granum *et al.*, 2015)。

酪氨酸酶能够结合铜离子来催化初始的单酚类物质(如酪氨酸)羟基化反应,并进一步氧化二元酚物质(如 DOPA 与 DHI)来产生醌类物质,是植物黑色素合成过程中的关键酶(Zhang *et al.*, 2006)。正常的黑色素合成和沉着具有保护表层细胞、防御紫外线辐射和防止内部组织过热等作用。已有研究表明, UV-B 辐射条件下的酪氨酸酶活性与黑色素含量有明显提高(吴姗姗等, 2016),酪氨酸酶的活性高低将直接影响黑色素的合成(宋康康, 2007)。

藻类受 UV-B 辐射的影响,除以上在光合作用及次级代谢物的影响外,还包括植物酶系统、蛋白含量的变化、金属元素含量的变化等方面(蔡恒江等, 2006; 缪锦来等, 2004)。在对红藻抗紫外辐射的研究中,多聚焦在类菌孢素氨基酸(MAA)物质合成和抗辐射机制上(Brawley *et al.*, 2017)。本实验室在条斑紫菜

(*Pyropia yezoensis*)的基因组研究中,除了发现 MAA 合成机制外,还发现酪氨酸酶基因在紫菜中呈显著扩张,预示着紫菜可能通过该家族基因扩张在应对紫外辐射产生了适应性(毕桂萁, 2018)。

条斑紫菜作为一种生长在浅海潮间带的大型海藻,在退潮期间,藻体完全暴露在空气中接受太阳照射,因此,随着全球范围紫外辐射的逐渐增强,条斑紫菜藻体会比被海水覆盖的海藻受到更强烈、更直接的 UV-B 辐射(姜红霞, 2007);而其作为我国主要的养殖海藻,具有极高的经济价值(高淑清等, 2004),研究 UV-B 辐射对条斑紫菜影响极为必要。

本研究拟应用叶绿素荧光成像及多光谱荧光成像技术,检测条斑紫菜在不同强度 UV-B 辐照下的光合作用及生理生化特征的变化,并同时检测酪氨酸酶活性的变化,以深入解析条斑紫菜对紫外辐射的响应及防御机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用本实验室条斑紫菜纯系 RZ 品系叶状体为实验材料,于光照为 35~45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 、光周期为 12 L: 12 D、10℃通气条件下培养。挑选生长一致、长度约为 5 cm 且状态良好的藻体进行辐照实验。

1.2 实验内容及方法

1.2.1 UV-B 系统设置 如图 1 所示, UV-B 辐射系统空间分为左右 2 个部分,左侧为对照组系统,右侧为实验组系统,各组中间使用不透光黑布隔开,防止紫外线穿过。辐射体系采用德国飞利浦生产的 UV-B 紫外灯,紫外灯外用上海生化试剂公司生产的 0.12 mm 乙酸纤维素薄膜包裹,目的是除去 280 nm 短波长紫外线。同时,为了防止乙酸纤维素薄膜的老化,所用薄膜每周更新一次。整个 UV-B 辐射系统在正式实验前连续照射 72 h 以上,以减少光源的不稳定性。实验组和对照组上方分别悬挂可见光源,使用光照计测量可见光光强,调整光源距离,确保实验组系统的可见光强始终为 35~45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 。在 UV-B 系统实验组的上方加挂 UV-B 光源,并使用山东师范大学生产的 UV-B 型紫外辐射强度仪测定辐照强度,调整 UV-B 光源距离,确保实验 A 组的 UV-B 光强恒定为 0.5 W/m^2 ,实验 B 组的 UV-B 光强始终为 2 W/m^2 。每个实验组光源下放置 5 个直径为 15 cm 的玻璃平皿,每个平皿中加入适量海水,海水中均匀分散放置 10 片完整条斑紫菜叶片(即 5 个平行),使每片藻体互

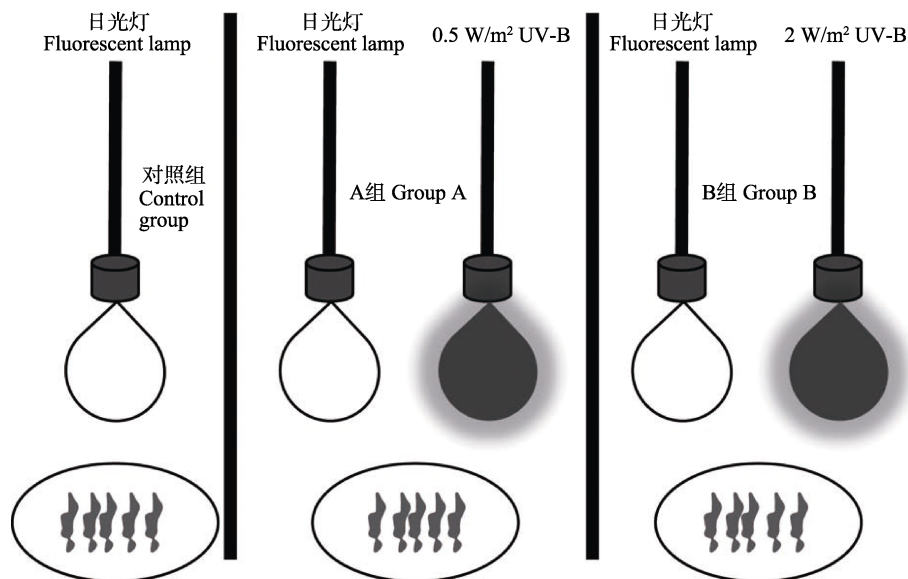


图1 实验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of the experimental device

不遮挡。设置时间梯度为0、1、2、3、4、5和6 h，每隔1 h从对照组、实验A组和实验B组的培养皿中各采集一次藻体样本。

1.2.2 生理生化指标测定 叶绿素荧光参数和多光谱参数测定：每次随机收取5片叶状体，按照对照组、实验A组、实验B组的顺序分别放入提前准备好的无菌小平皿中，用无菌镊子使其排列整齐，并展平。同时，为使藻体表面能够保持湿润状态，在展平过程中要时刻注意藻体的状态，并用无菌刷子补充水分。放入叶绿素荧光成像仪 Fluor Cam 系统(Fluor Cam 800MF, 北京易科泰生态技术有限公司)、多光谱荧光成像仪(Multi-color Fluor Cam, 北京易科泰生态技术有限公司)。15 min 暗适应后，进行多种荧光参数的测定。叶绿素荧光成像仪 Fluor Cam 系统设定快门 shutter=1，敏感度 Sensitivity=45，光化光光强 Act1=21，饱和光光强 Super=45，测定参数包括最大光量子效率(QY_{max}，评估 PS II 最大光合效率)、非光化学淬灭(NPQ_{Lss}，评估藻体光保护能力)、光化学淬灭(qP_{Lss}，PS II 中处于开放状态的反应中心的比例)和稳态荧光衰减率(R_{fd}_{Lss}，评估藻体活力)。多光谱荧光成像系统设定快门 shutter=5，敏感度 Sensitivity=6.2，紫外光 UV=100。测定参数包括极早期胁迫参数 F440/F690、F440/F740 和叶绿素负相关参数 F690/F740。

酪氨酸酶活性测定：使用北京索莱宝科技有限公司的酪氨酸酶活性检测试剂盒(微量法)进行测定。

1.2.3 数据处理 图片绘制使用 R 语言的 ggplot2

包和 ggpubr 包，组间差异显著性比较使用 R 语言的 Wilcoxon 秩和检验，使用默认双侧检验。

2 结果

2.1 叶绿素荧光光合参数

对照组、0.5 W/m² 实验 A 组、2 W/m² 实验 B 组中的叶绿素荧光动力学数据分析结果见图 2。与对照组相比(图 2a)，在 0.5 W/m² 和 2 W/m² 辐射条件下，QY_{max} 在 1~6 h 逐渐下降，0.5 W/m² 条件下，QY_{max} 从 0.59 下降至 0.218 ($P < 0.05$)；2 W/m² 条件下 QY_{max} 从 0.59 下降至 0.072 ($P < 0.05$)。与各时间段的对照组相比(图 2b)，0.5 W/m² 和 2 W/m² UV-B 辐射条件下的 NPQ_{Lss} 值均呈下降趋势，0.5 W/m² 辐射条件下，NPQ_{Lss} 值从 0 h 的 0.15 下降到了 6 h 的 0.05 ($P < 0.05$)，但在 2 h 数值有小幅度回升($P > 0.1$)，3~6 h 持续下降。2 W/m² 辐射条件下，NPQ_{Lss} 值从 0 h 的 0.15 下降到了 6 h 的 0.03 ($P < 0.05$)，但在 3 h 数值有小幅度回升($P > 0.1$)，从 2 h 开始趋于平稳；0.5 W/m² 条件下，qP_{Lss} 值在 0~1 h 的均值图(图 2c)中无显著变化($P > 0.1$)，与此时对照组的数值大体一致；在 1 h 后 qP_{Lss} 值开始下降($P < 0.01$)，但幅度相较于 2 W/m² 辐射条件下缓和；qP_{Lss} 在 2 W/m² 辐射条件下 1 h 处的值与 0.5 W/m² 条件下的 6 h 处的值相似($P > 0.05$)；不同强度紫外线都会降低条斑紫菜叶状体的 R_{fd}_{Lss} 值(图 2d)，0.5 W/m² R_{fd}_{Lss} 缓慢匀速下降；2 W/m² 照射条件下在 0~1 h 中，R_{fd}_{Lss} 值受到的影响显著 ($P < 0.01$)，1~6 h 时间段内 R_{fd}_{Lss} 值缓慢降低。

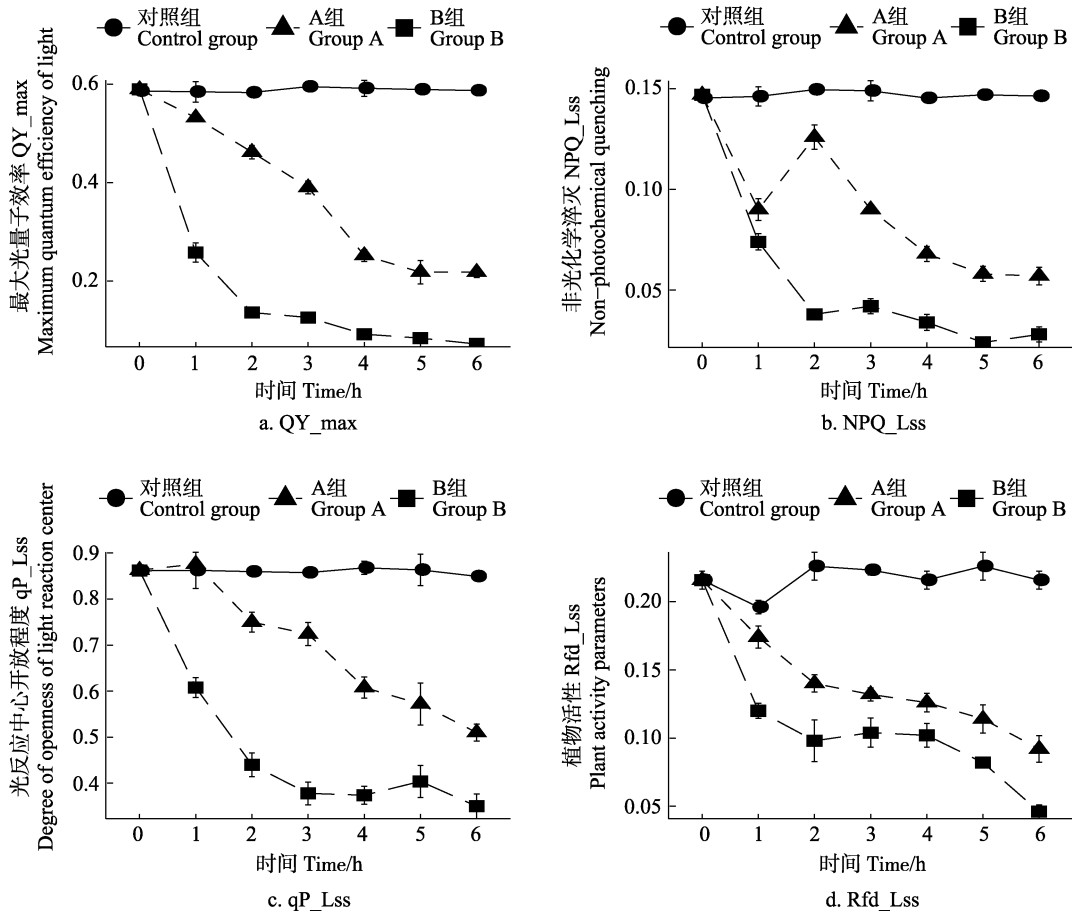


图 2 不同处理条件下条斑紫菜叶绿素荧光参数变化

Fig.2 Changes of chlorophyll fluorescence parameters of *P. yezoensis* under different treatment conditions

2.2 多光谱荧光参数

在 F440/F690(图 3a)和 F440/F740(图 3b)图中, 0.5 W/m² 辐射条件下 0~2 h 均略高于对照组, 在 3 h 的时间点上, 均值下降但并不显著($P>0.05$), 3~6 h 不再下降, 趋于稳定。2 W/m² 紫外辐射条件下, F440/F690 和 F440/F740 的均值在 2 h 处便与对照组有显著差异 ($P<0.05$), 开始有明显的下降趋势。这相比于 0.5 W/m² 条件下提前 1 h 左右。在图 3c 中, 0.5 W/m² 紫外辐

射条件下的 6 h 内, F690/F740 值在总体水平上降低, 但并不显著($P>0.05$), 而在 2 W/m² 的辐射条件下, F690/F740 值在 0~3 h 下降, 于 4 h 后迅速上升, 于 5 h 开始高于对照组($P<0.05$)。

2.3 酪氨酸酶活性

未照射 UV-B 的对照组显示, 条斑紫菜在 0~6 h 时间内的酶活力较为稳定, 数值在 35 U/g 上下波动; 与对照组相比, 经 UV-B 处理的 2 个实验组在 1 h 后

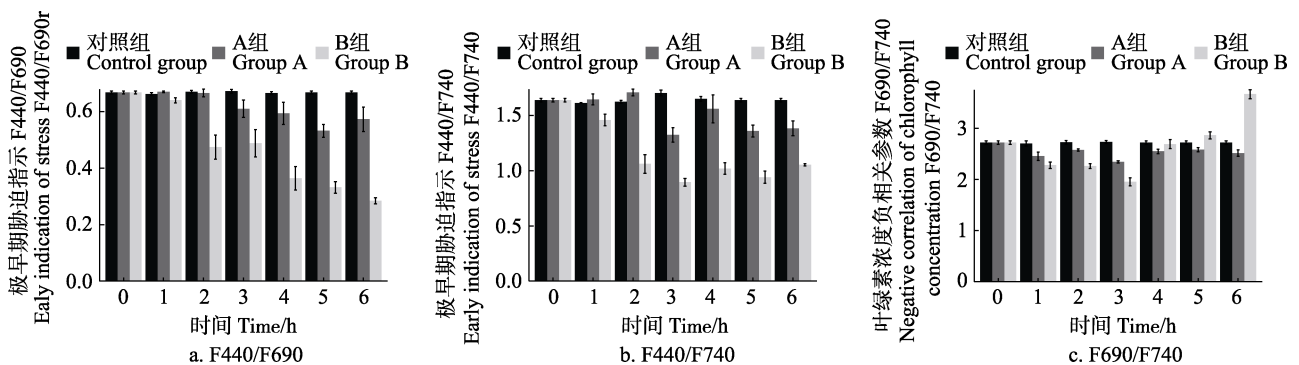


图 3 不同处理条件下条斑紫菜多光谱参数变化

Fig.3 Multi-spectral parameters of *P. yezoensis* under different treatment conditions

酪氨酸酶的活性明显升高($P<0.01$), 0.5 W/m^2 实验组的酪氨酸酶活性上升至 67.38 U/g , 2 W/m^2 实验组的酪氨酸酶活性上升至 77.55 U/g , 2 个实验组的酪氨酸酶活在随后的时间内分别在 $64.90\sim 70.78$ 和 $65.54\sim 77.55\text{ U/g}$ 范围内波动(图 4a)。

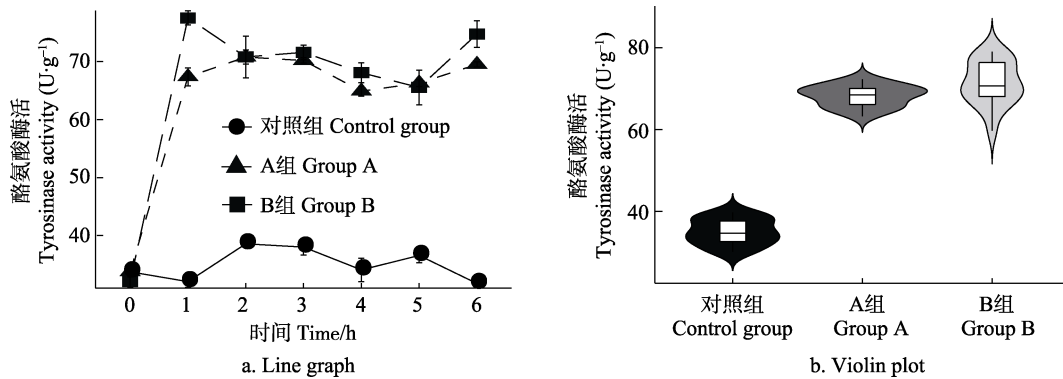


图4 UV-B 照射条件下 0~6 h 酪氨酸酶活力的变化
Fig.4 Changes in tyrosinase activity in UV-B irradiation for 1~6 h

3 讨论

随着臭氧空洞的不断扩大, 能够到达地表的 UV-B 辐射也逐渐增强。条斑紫菜作为一种生长在潮间带的大型经济海藻, 紫外辐射的变化直接影响到其生长和发育。

已有研究表明, UV(主要是 UV-B)会对藻类光合系统造成巨大损伤, 这在 Herrmann 等(1996)与 Prasad 等(2004)分析 UV 对杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、棕鞭藻(*Ochromonas danica*)与蓝藻(*Plectonema boryanum*)的影响时即有发现。

本研究发现, UV-B 会直接影响条斑紫菜的最大光量子效率(QY_{max}), 且在强度高的紫外辐射下, 最大光量子效率比低强度紫外辐射提前下降至平稳期, 说明藻体 PS II 最大光合效率降低; 不同强度的紫外线都会对条斑紫菜叶状体的非光化学淬灭(NPQ_{Lss})造成负面影响, 且紫外强度越高, NPQ_{Lss} 值整体越低, 说明藻体以热能的形式散失多余能量的能力越弱, 光保护能力降低; 藻体的光化学淬灭(qP_{Lss})变化结果说明, PS II 中处于开放状态的反应中心同样受 UV-B 的影响趋于关闭状态; 藻体光合活性(R_{fd_Lss})受 UV-B 辐射影响会明显降低, 光合器官受到损伤, 但藻体自身会通过自保机制维持自身在一段时间内的活性, 随着照射时间的增长, 自保机制不足以抵御 UV-B 辐射的伤害, 藻体的活性会继续下降。

Frohmeyer 等(2003)、Ulm 等(2005)和 Jenkins

对照组的酪氨酸酶活在 0~6 h 时间段中一直处于较低水平(中位数<40), 而实验组酪氨酸酶活均处于较高水平(中位数>60), 并且 0.5 W/m^2 条件下的酶活性相较于 2 W/m^2 条件下稳定, 但酶活性中位数略低于后者($P<0.05$)(图 4b)。

(2009)研究发现, 自然条件下, 由于它们拥有有效的修复和保护机制, 植物在 UV-B 辐射下都可以很好地避免损伤。利用多光谱荧光技术对条斑紫菜叶状体在受胁迫初期进行检测, 采用极早期胁迫参数 F440/F690、F440/F740 和叶绿素浓度负相关参数 F690/F740, 分析条斑紫菜的生理生化响应。研究发现, 极早期胁迫参数值在低辐照强度下的 0~2 h 变化并不显著, 而在高辐照强度下的 1 h 便开始变化, 并在 2 h 处有显著性差异, 说明紫外线强度不同会影响藻体进入受胁迫阶段的时间, 且强度越大, 进入受胁迫阶段的时间越早; 同时, 在 UV-B 辐照下, 随辐照时间增加, F440/F690 和 F440/F740 值在高、低辐射强度下均呈下降趋势, 说明酚醛类物质随辐照时间延长浓度会降低; 藻体中的叶绿素浓度(F690/F740)受紫外线强度和照射时间长短的影响, 叶绿素浓度在 UV-B 胁迫初期略微上升, 但当 2 W/m^2 UV-B 辐射强度超过 4 h 后, 叶绿素浓度会迅速下降。 0.5 W/m^2 UV-B 辐射强度在 6 h 内对叶绿素浓度影响不大, 甚至可以提高叶绿素浓度。这与 UV-B 在绿藻中的研究一致(王明辉, 2008)。

在紫菜抵抗紫外辐射机制的研究中, 认为紫菜能够合成一类特殊的氨基酸—类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acid, MAA)(张英莲, 2007)。MAA 能够有效吸收紫外光线, 根据同源基因预测, 也发现了紫菜能够合成 MAA 的基因(Brawley *et al.*, 2017)。基于本实验室对条斑紫菜与坛紫菜高质量基因组的分析, 发现除 MAA 合成机制外, 紫菜中还含

有酪氨酸酶基因家族(毕桂萁, 2018)。酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶(宋康康, 2007), 在抵抗紫外辐射中起着重要作用(朱静等, 2013; 宋缘, 2017)。本研究通过检测不同 UV-B 照射条件下的酪氨酸酶活性, 发现条斑紫菜的酪氨酸酶活性水平在 1 h 内即显著提高, 并且在随后的紫外辐射期间, 始终维持高活性水平, 推测条斑紫菜可能会通过酪氨酸酶途径以酚类物质为前体合成黑色素, 以抵御紫外辐射。

综上所述, 当辐射强度较低时, 条斑紫菜叶绿素对 UV-B 辐射的敏感度较低, 当辐射强度较高时, 条斑紫菜叶绿素对 UV-B 辐射的敏感度较高; 随着 UV-B 辐射时间和强度的增加, 光合反应中心的开放程度以及光合效率会降低, 酚醛类等物质会减少, 酪氨酸酶活性升高。本研究可为后续分析条斑紫菜抗紫外线辐射机制提供研究基础, 保障我国紫菜产业的可持续发展。

参 考 文 献

- Bi GQ. Genome of *Pyropia yezoensis* and *Pyropia haitanensis* reveals key functional and evolutionary innovations at environmental adaptation at environmental adaptation. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2018 [毕桂萁. 紫菜基因组及其环境适应性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2018]
- Brawley SH, Blouin NA, Ficko-Blean E, *et al.* Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangioophyceae, Rhodophyta). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(31): 6361–6370
- Cai HJ, Tang XX, Zhang PY, *et al.* Response of activity of antioxidant enzymes to UV-B radiation enhancement in three species of red-tide microalgae. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(1): 81–84 [蔡恒江, 唐学玺, 张培玉, 等. 3 种海洋赤潮微藻抗氧化酶活性对 UV-B 辐射增强的响应. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(1): 81–84]
- Chen M. Study of regulation mechanism for secondary metabolites disturbance in *Clematis terniflora* DC. under UVB irradiation & cloning and expression analysis of CtPPQ in coumarin biosynthesis. Master's Thesis of Zhejiang University, 2018, 1–115 [陈梦. 紫外诱导圆锥铁线莲次生代谢扰动的调控机制研究及香豆素合成酶 PPO 的克隆与表达. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2018, 1–115]
- Granum E, Pérez-Bueno ML, Calderón CE, *et al.* Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 142(3): 625–632
- Frohnmeier H, Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants: Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1420–1428
- Gao SQ, Shan BN. Advances in biological functions of *Pyropia yezoensis*. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2004, 13(12): 1661–1662 [高淑清, 单保恩. 条斑紫菜生物学作用的研究进展. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(12): 1661–1662]
- Geng YH, Li L, Wei D, *et al.* Physiological adaptability of *Chlamydomonas nivalis* under ultraviolet radiation. *Food Science*, 2006, 27(3): 40–43 [耿予欢, 李琳, 魏东, 等. 极地雪藻对紫外辐射的生理适应性研究. 食品科学, 2006, 27(3): 40–43]
- Guo XL, Wang RW. Influence of enhanced ultraviolet radiation on growth and physiological metabolism in plants. *Journal of Biology*, 2001, 18(1): 12–14 [郭秀林, 王睿文. 紫外辐射增加对植物生长及某些生理代谢的影响. 生物学杂志, 2001, 18(1): 12–14]
- Herrmann H, Häder DP, Köfferlein M, *et al.* Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, 34(1): 21–28
- Jenkins GI. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60(1): 407–431
- Jian MF, Wang SC, YU HP, *et al.* Influence of Cd²⁺ or Cu²⁺ stress on the growth and photosynthetic fluorescence characteristics of *Hydrilla verticillata*. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(6): 1719–1727 [简敏菲, 汪斯琛, 余厚平, 等. Cd²⁺、Cu²⁺胁迫对黑藻(*Hydrilla verticillata*)的生长及光合荧光特性的影响. 生态学报, 2016, 36(6): 1719–1727]
- Jiang HM, Jiang H, Zhou GM, *et al.* Spectral reflectance response of plant leaf to simulated UVB stress. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(2): 453–458 [蒋鹤鸣, 江洪, 周国模, 等. 利用高光谱遥感监测紫外辐射对亚热带树木的影响. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(2): 453–458]
- Jiang HX. Ecophysiological responses of *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) to solar ultraviolet radiation. Doctoral Dissertation of Shantou University, 2007, 1–166 [姜红霞. 坛紫菜对阳光紫外辐射的生理生态学响应. 汕头大学博士研究生学位论文, 2007, 1–166]
- Li M. Effects of excess UV-B irradiation on physiological and biochemical responses in three species of *Saussurea* on eastern of Qinghai-Tibetan Plateau. Master's Thesis of Northwest Normal University, 2013, 1–66 [李梅. 青藏高原东缘三种风毛菊属植物对增补 UV-B 辐射的生理响应. 西北师范大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–66]
- Miao JL, Kan GF, Jiang YH, *et al.* Responses of bio-chemical compositions of four Antarctic ice microalgae to UV-B irradiation enhancement. *Marine Sciences*, 2004(9): 26–31 [缪锦来, 阚光锋, 姜英辉, 等. 4 种南极冰藻的生化组成对 UV-B 辐射增强的响应. 海洋科学, 2004(9): 26–31]
- Prasad SM, Zeeshan M. Effect of UV-B and monocrotophos, singly and in combination, on photosynthetic activity and growth of non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema*

- boryanum*. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 52(2): 175-184
- Shi SB, Shang YX, Zhu PJ, *et al.* Effects of solar UV-B radiation on the efficiency of PS II photochemistry in the alpine plant *Saussurea superba* under different weather conditions in the Qinghai-Tibet Plateau of China. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2011, 35(7): 741-750 [师生波, 尚艳霞, 朱鹏锦, 等. 不同天气类型下 UV-B 辐射对高山植物美丽风毛菊叶片 PS II 光化学效率的影响分析. *植物生态学报*, 2011, 35(7): 741-750]
- Song KK. Effects of inhibitors on tyrosinase and their regulation on melanogenesis. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2007, 1-166 [宋康康. 抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2007, 1-166]
- Song Y. Studies on the radioprotection effect of melanin from spores of *Aspergillus niger*. Master's Thesis of Lanzhou University, 2017, 1-62 [宋缘. 黑曲霉黑色素辐射防护作用的研究. 兰州大学硕士研究生学位论文, 2017, 1-62]
- Ulm R, Nagy F. Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(5): 477-482
- Wang LF. The interactive effects of drought and enhanced UV-B radiation on photosynthesis and anthocyanin in three species in *Lespedeza michx.* Master's Thesis of Northwest A&F University, 2003, 1-78 [王龙飞. UV-B 辐射及干旱胁迫对三种胡枝子叶片光合特性及花青素含量的影响. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-78]
- Wang MH. Influence of ultraviolet radiation on growth, reproduction and chlorophyll content of green algae *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(23): 9863-9864 [王明辉. 紫外线照射对绿藻 *Scenedesmus dimorphus* 生长繁殖和叶绿素含量的影响. *安徽农业科学*, 2008, 36(23): 9863-9864]
- Wang NP, Sun Y, Yue H, *et al.* Urinary metabonomic investigation into acute photo damage of rats induced by ultraviolet B irradiation using rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(9): 1410-1418 [王恩鹏, 孙岩, 越皓, 等. 基于快速高分辨液相色谱-质谱的中波紫外线辐射诱导大鼠急性光损伤的代谢组学研究. *分析化学*, 2016, 44(9): 1410-1418]
- Wei Y. Study on the biological characteristics of two *Metarhizium anisopliae* UV-induced mutants. Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016, 1-48 [韦云. 两株绿僵菌紫外线诱变株的生物学特性研究. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2016, 1-48]
- Wu SS, Xu HH, Zhu DD, *et al.* Effect of UVB radiation on melanocytes and melanin synthesis-related gene expression. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2016, 39(4): 422-425, 429 [吴姗姗, 许欢欢, 朱丹丹, 等. UVB 辐射对黑色素细胞黑色素合成及其相关基因表达的影响. *新疆医科大学学报*, 2016, 39(4): 422-425, 429]
- Zhang C, Xie LP, Huang J, *et al.* A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(2): 632-639
- Zhang YL. UV-B induced changes of growth and MAAs in HAB causative algae from South China Sea. Master's Thesis of South China Normal University, 2007, 1-53 [张英莲. UV-B 辐射对华南沿海常见赤潮藻类生长和类菌胞素氨基酸(MAAs)含量的影响. 华南师范大学硕士研究生学位论文, 2007, 1-53]
- Zhu J, Gu MY, Wang W, *et al.* Study on identification of a radiation-resistant black yeast-like fungus and isolation of melanin. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2013, 50(10): 1858-1864 [朱静, 顾美英, 王玮, 等. 一株耐辐射真菌的鉴定及黑色素分离提取. *新疆农业科学*, 2013, 50(10): 1858-1864]

(编辑 陈 辉)

Effects of UV-B Ultraviolet Radiation on the Physiology and Biochemistry of *Pyropia yezoensis*

PAN Xue, MAO Yunxiang, WANG Junhao, CAO Min, BI Guiqi, DU Guoying^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract As an economically important alga growing in the intertidal zone, *Pyropia yezoensis* has the unique characteristics of adapting to high ultraviolet radiation in the open air and to desiccation conditions. In this experiment, light without UV-B radiation was used as a control, and low UV-B radiation of 0.5 W/m² and high UV-B radiation of 2 W/m² were used to detect changes in chlorophyll fluorescence photosynthetic parameters, multi-spectral fluorescence parameters, and tyrosinase activity in response to UV-B ultraviolet radiation in the gametophytes of *P. yezoensis*. The results showed that the chlorophyll fluorescence photosynthetic parameters (QY_max, NPQ_Lss, qP_Lss, R_{fd}_Lss) of *P. yezoensis* under UV-B radiation displayed a gradient decline with irradiation time, and the values of photosynthetic parameters were lower at high radiation intensity (2 W/m²) than at low radiation intensity (0.5 W/m²). The early stress parameters of F440/F690 and F440/F740, which are positively related to secondary metabolites such as phenol or aldehyde concentration, showed that the group under conditions of 2 W/m² entered a forced state earlier than the group under 0.5 W/m². Secondary metabolites such as phenol or aldehyde showed concentration declines. F690/F740, which is negatively correlated with chlorophyll concentration, indicated that the chlorophyll concentration under 0.5 W/m² irradiation was higher than that under no UV-B irradiation, but was lower than the maximum value in the rising period of 2 W/m² irradiation. The chlorophyll concentration increased initially and then decreased rapidly after 4 h under 2 W/m², indicating that the chlorophyll concentration is less sensitive to UV-B radiation under low radiation intensity, whereas it is more sensitive under high radiation intensity. The results showed that the tyrosinase activity was significantly higher in *P. yezoensis* gametophytes irradiated with UV-B than in the control group and that the enzyme activity under 2 W/m² UV-B was higher than that under 0.5 W/m² UV-B.

Key words *Pyropia yezoensis*; UV-B; Photosynthesis; Chlorophyll fluorescence; Tyrosinase

① Corresponding author: DU Guoying, E-mail: duguo923@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190317001

http://www.yykxjz.cn/

杨运楷, 宋晓玲, 王海亮, 谢国驹, 黄捷. 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 133-141

Yang YK, Song XL, Wang HL, Xie GS, Huang J. Effect of a compound probiotics on the ability of *Litopenaeus vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 133-141

一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响*



杨运楷^{1,2} 宋晓玲^{2①} 王海亮² 谢国驹² 黄捷²

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

摘要 本研究选择1株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) BL-9、1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BS-12、1株金丽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas flavipulchra*) CDM8,以1:1:1将其组成复合益生菌,各益生菌水体添加浓度为 10^7 CFU/ml,进行为期30 d的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖实验。实验分为暂养期(7 d)、益生菌处理期(15 d)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)攻毒期(10 d)。结果显示,养殖水体中添加复合益生菌能显著增加水体和对虾肠道可培养细菌总数($P<0.05$),攻毒实验结束时,实验组对虾累积存活率为 $(73.33\pm 6.83)\%$,显著高于阳性对照组 $(25.33\pm 15.43)\%$ 。对虾抗病基因热激蛋白70(Heat shock proteins 70, *Hsp70*)、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白(Beta-1,3-glucan-binding protein-lipoprotein, β GBP-HDL)、脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白(Lipopolysaccharide- β -1,3-glucan binding protein, *LGBP*)、抗菌肽 *Crustin* 在益生菌处理阶段均出现不同程度的上调,在攻毒阶段虽呈现各自不同的表达情况,但所有基因都经历了更大幅度上调。研究表明,水体中添加芽孢杆菌和假交替单胞菌组成的复合益生菌可提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力,对虾抗病力的提高可能与益生菌增加对虾肠道可培养细菌数量、抗病相关基因表达水平及过氧化氢酶(CAT)活性有关。

关键词 凡纳滨对虾; 复合益生菌; 副溶血弧菌; 免疫基因; 过氧化氢酶

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0133-09

致急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是近5年来严重危害全球对虾养殖业发展的疫病之一,该病是由携带 *pirVP* 基因

的弧菌引起的一类细菌性疾病。目前,已报道的致 AHPND 弧菌包括副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、坎贝氏弧菌(*V. campbelli*)、欧文氏

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 杨运楷, E-mail: 891293238@qq.com

① 通讯作者: 宋晓玲, 研究员, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-17, 收修改稿日期: 2019-04-09

弧菌(*V. owensii*)等(贾丹等, 2018)。本研究所用副溶血弧菌为本实验室在 2013 年从广西患 AHPND 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中分离出 1 株致病性副溶血弧菌(AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*, V_{PAHPND}), 编号为 20130629002S01。该菌对卤虫无节幼体的半致死浓度(LD₅₀)为 2.58×10^5 CFU/ml(王娜等, 2016; 陈蒙蒙等, 2018)。

益生菌是指在一定浓度范围内能够提高机体健康的活性微生物制剂, 作为抗生素及化学药剂的替代品, 在医学、食品、养殖等领域已经得到了快速的发展(Balcázar *et al*, 2006)。益生菌在水产养殖过程中的作用机理有以下几个方面: 一是通过细菌自身代谢分解食物或产生消化酶提高机体消化能力; 二是竞争性抑制, 通过竞争营养、附着位点或合成、分泌抗菌活性因子等来抑制有害微生物的繁殖; 三是通过降低水体中的氨氮等有害物质改善养殖水环境; 四是通过增强机体免疫功能来提高抗病能力等(Thompson *et al*, 1999; Balcázar *et al*, 2006)。高戈等(2017)使用巨大芽孢杆菌(*Bacillus magaterium*)进行凡纳滨对虾生物絮团养殖实验, 养殖结束时, 添加巨大芽孢杆菌组的对虾体长、体重均显著高于其他 2 组。张盛静等(2015)研究发现, 在饲料中添加单一益生菌或复合益生菌均可显著提高对虾抗副溶血弧菌感染的能力, 且复合益生菌的保护效果更佳。

芽孢杆菌在水产养殖中的应用较为广泛。刘观斌等(2015)在养殖水体中泼洒适当浓度的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)可以改善水质, 提高罗非鱼机体的免疫力、抗氧化能力, 进而提高罗非鱼抗无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)病的能力。张欢欢等(2016)研究发现, 生物絮团对虾养殖系统中添加菌株 02, 能改善菌群结构, 抑制弧菌生长。作者在前期的研究工作发现, 在凡纳滨对虾养殖水体中单独添加 10^7 CFU/ml 数量级的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)BL-9、枯草芽孢杆菌 BS-12 菌液后, 使用副溶血弧菌进行攻毒, 实验组相对于对照组均显著提高对虾的成活率。金丽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas flavipulchra*)CDM8 具有突出的弧菌拮抗能力(Wang *et al*, 2018), 在零交换水条件下, 能显著提高凡纳滨对虾 ZⅢ幼体和仔虾 PL5 的变态率和成活率(孙博超等, 2019)。因此, 本研究选择上述 3 株菌组成复合益生菌添加到养殖水体中, 评价其对养殖水体及凡纳滨对虾肠道菌群、抗副溶血弧菌感染能力、过氧化氢酶(CAT)活性、抗病基因表达水平的影响, 以期复合益生菌在凡纳滨对虾养殖中的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 对虾与益生菌

1.1.1 实验用凡纳滨对虾 实验用凡纳滨对虾购自山东莱州单山水产养殖公司(体长为 6.2~10.6 cm)。实验前参照 OIE(2017)水生动物疾病诊断手册及 Wang 等(2018)中的 PCR 方法, 进行 AHPND 病原的套式 PCR 检测, 结果为阴性。投喂饲料为宁波天邦饲料有限公司生产的凡纳滨对虾全熟化颗粒饲料, 对虾养殖容器为 100 L 的 PC 塑料桶, 养殖有效水体为 60 L 的过滤海水。

1.1.2 实验用菌种及培养 实验用菌株: 金丽假交替单胞菌 CDM8、地衣芽孢杆菌 BL-9、枯草芽孢杆菌 S-12、副溶血弧菌 20130629002S01, 均由本实验室分离、鉴定及保存。

菌液发酵采用 2216E 培养基, 28℃ 恒温震荡培养, 当菌液的 OD_{580 nm}≈1 时(此时, 细菌浓度约为 $2 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ CFU/ml), 终止发酵, 使用时通过稀释的方法调整细菌的水体添加浓度。

CDM8、BL-9、BS-12 和副溶血弧菌在水体的添加浓度分别为 2.24×10^7 、 2.93×10^7 、 2.77×10^7 和 2.13×10^5 CFU/ml。

1.2 实验期及实验分组

实验分 3 个时期: 暂养期、益生菌处理期、副溶血弧菌感染期。

暂养期: 对虾不分组, 共 7 d。期间随机挑选 12 尾凡纳滨对虾进行病原检测, 暂养第 7 天检测养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量, 采集对虾肝胰腺组织用于抗病基因表达及 CAT 酶活性检测。暂养稳定后, 挑选 630 尾大小均匀、活力良好的对虾用于后续实验。

益生菌处理期: 对虾分为实验组和对照组。每组 7 个平行, 其中, 3 个用于统计死亡率, 4 个用于采样(对照组为 2 组, 预先设置攻毒阶段的阴性和阳性对照组)。实验组养殖水体中添加复合益生菌, 各菌以 1:1:1 比例添加, 对照组不添加益生菌。实验周期为 15 d, 由于 CDM8 拮抗能力较强, 所以益生菌添加采取交替添加的方式, 即 3 d 为 1 个添加周期。第 1 天添加益生菌 CDM8 菌液, 第 2 天添加 BL-9 和 BS-12 菌液, 共 5 个添加周期。在益生菌处理期, 第 7 天和第 14 天检测养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量, 采集对虾肝胰腺组织用于抗病基因表达及酶活性检测。

副溶血弧菌攻毒期: 对虾分为 3 组, 实验组、阳性对照组和阴性对照组, 每组 7 个平行, 其中, 3 个用于统计死亡率, 4 个用于采样。益生菌处理期, 每桶包含对虾 30 尾, 攻毒期调整为每桶 25 尾。实验组

和阳性对照组使用副溶血弧菌浸浴攻毒, 先将对虾于 2.13×10^7 CFU/ml 副溶血弧菌菌液中浸泡 15 min, 然后放回, 向养殖水体中添加副溶血弧菌菌液使得水体中的弧菌浓度达到 2.13×10^5 CFU/ml 左右, 阴性对照组使用无菌 2216E 培养基浸浴。副溶血弧菌攻毒期持续 10 d, 攻毒期间不添加益生菌。在攻毒的 6、18、42、66、90 h 采集对虾的肝胰腺组织进行实验相关指标的测量, 并统计每天对虾的累积死亡率。

1.3 实验管理

实验期间连续充气, 水温控制在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。根据每天对虾桶内是否有残饵来调整投喂量, 每天投喂 2 次。48 h 换水 1 次, 换水量为水体积的 2/3。

1.4 样品及处理

1.4.1 水体和对虾肠道内可培养细菌计数 水体及对虾肠道细菌计数采用 2216E 琼脂平板涂布计数的方式。对虾肠道活菌计数, 先将对虾完整肠道加入无菌 PBS 缓冲液研磨, 后进行活菌计数。

1.4.2 对虾肝胰腺样品采集及处理 在各个取样时间点采集对虾肝胰腺, 每桶取对虾 2 尾, 每组 3 个平行, 共 6 尾对虾。解剖采集的对虾肝胰腺经液氮迅速冷冻后, 放置在 -80°C 超低温冰箱保存。

1.5 RNA 提取及 cDNA 合成

按 TRIZOL Reagent (Invitrogen) 说明书进行总 RNA 的抽提, 用 Nanodrop 2000c (Thermo) 测定 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量后, 保存于 -80°C 备用。cDNA 合成采用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒进行, 使用方式参考试剂盒说明书。

1.6 实时荧光定量 PCR

1.6.1 实时荧光定量 PCR 及引物 使用 Fast Essential DNA Green Master 荧光定量试剂盒 (Roche, 瑞士) 进行实时荧光定量 PCR 检测, 方法参考试剂盒说明书。抗病相关基因的检测引物名称及序列见表 1。

1.6.2 荧光定量体系及反应程序 PCR 反应体系包括 SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μl , cDNA 模板 1 μl , 上下游引物各 0.5 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), DEPC 处理水 10.5 μl 。PCR 反应条件: 94°C , 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环。每个组织的样品设 3 个重复。对实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析 (Livak *et al.*, 2001)。

1.7 免疫酶活性检测

对各组凡纳滨对虾肝胰腺组织进行 CAT 酶活测定, 测定方法参照检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 说明书进行。

1.8 数据分析与处理

采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 Duncan's 多重比较进行不同处理间的显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 益生菌处理期养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量

养殖水体可培养细菌数量见图 1A, 在添加益生菌前 (0 d), 各组水体可培养细菌数量处于 10^5 CFU/ml 数量级 ($P > 0.05$)。益生菌处理阶段第 7 天和第 14 天实验组水体可培养细菌数量均处于 10^7 CFU/ml 数量级, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对虾肠道可培养细菌数量见图 1B, 在添加益生菌前 (0 d) 凡纳滨对虾肠道细菌总数在 10^4 CFU 数量级, 添加益生菌后实验组对虾肠道内可培养细菌数量第 7 天 (3.22×10^4 CFU), 第 14 天 (3.54×10^4 CFU) 均显著高于对照组 (第 7 天为 3.04×10^4 CFU, 第 14 天为 3.03×10^4 CFU) ($P < 0.05$)。

2.2 副溶血弧菌攻毒后各组对虾累积存活率

副溶血弧菌攻毒后取实验组和阳性对照组濒死对虾肝胰腺组织, 用 TCBS 平板涂布培养, 长出大量

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的引物及序列
Tab.1 Primer sequences used in quantitative real-time PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (3'~5')	序列号 Accession number	文献 Reference
<i>β-actin</i>	CATCAAGGAGAACTGTGCT	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT	AF300705	柴鹏程(2012)
<i>Hsp70</i>	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	GGTCACGTCCAACAGCAAC	EF495128	王春迪等(2016)
<i>βGBP-HDL</i>	CGAGAACGGACAAGAAGTGGAGG	ATCGACGAACACGCAGGGAATG	AY249858	王春迪等(2016)
<i>Crustin</i>	ACGAGGCAACCATGAAGG	AACCACCACCAACACCTAC	AY488497	张盛静等(2016)
<i>LGBP</i>	CATGTCCAACCTTCGCTTTCAGA	ATCACCGCGTGCCATCTT	AY723297	王春迪等(2016)
<i>Lysozyme</i>	GGACTACGGCATCTTCGAGA	ATCGGACATCAGATCGGAAC	AY170126.2	柴鹏程(2012)

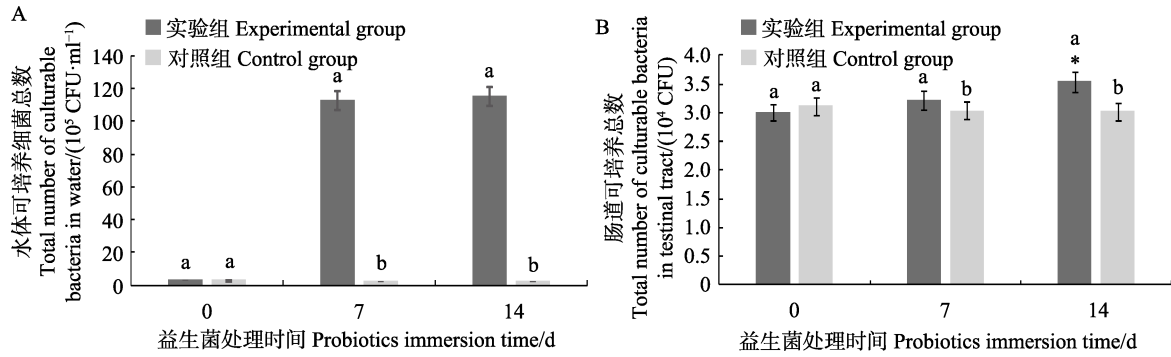


图 1 养殖水体(A)及对虾肠道(B)可培养细菌总数

Fig.1 Total number of culturable bacteria in aquaculture water (A) and *L. vannamei* intestines(B)

不同字母代表同一时间点不同组之间存在显著差异, “*”代表同一组之间不同时间点存在显著差异。下同
 Different letters in the same time mean significantly different at 0.05 level ($P<0.05$),
 “*” means significantly different at 0.05 level in the same group ($P<0.05$). The same as below

绿色菌落,与攻毒所用副溶血弧菌菌落形态相同。实验组和阳性对照组的对虾均在第 18 小时开始出现死亡。攻毒后 258 h 时,实验组和阴性对照组对虾的累积存活率分别为 73.33%和 86.67%,而阳性对照组对虾的累积存活率为 25.33%。实验组比阳性对照组累积存活率提高了 48.00% (表 2)。

2.3 对虾肝胰腺组织免疫基因相对表达量

2.3.1 Hsp70 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Hsp70* 的相对表达量测定结果见图 2A。第 7 天和第 14 天实验组基因表达量显著高于对照组($P<0.05$)。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Hsp70* 的相对表达量测定结果见图 2B。实验组和阳性对照组 *Hsp70* 表达均呈现上升后下降的趋势,均在 18 h 达到最大值($P<0.05$)。

2.3.2 β GBP-HDL 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 β GBP-HDL 的相对表达量测定结果见图 3A,第 7 天和第 14 天实验组基因表达

量均显著高于对照组($P<0.05$)。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺 β GBP-HDL 的相对表达量测定结果见图 3B,实验组对虾的 β GBP-HDL 的表达量呈先升高后下降趋势,而阳性对照组呈先升高再下降,再升高再下降的趋势;实验组和阳性对照组基因的表达量分别在 6 和 66 h 达到最高($P<0.05$)。

2.3.3 Crustin 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Crustin* 的相对表达量测定结果见图 4A。实验组基因表达量在第 7 天和第 14 天均显著高于对照组($P<0.05$)。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Crustin* 的相对表达量测定结果见图 4B。实验组和阳性对照组基因的表达均呈先升高后下降的趋势,实验组基因表达量在 42 h 达到最大值,阳性对照组中基因在 18 h 基因达到最大值。

2.3.4 LGBP 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *LGBP* 的相对表达量测定结果见图 5A,实验组表达量在第 7 天显著高于对照组,而在第 14 天时表达量则低于对照组的($P<0.05$)。攻毒

表 2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后累积存活率

Tab.2 Accumulative survival rate of *L. vannamei* post *V. parahaemolyticus* challenge (%; $n=3$; $\bar{x} \pm SD$)

组别 Group	感染后时间 Time post infection (h)										
	6	18	42	66	90	114	138	186	210	234	258
实验组 Experimental group	100.00±0 ^a	98.67±1.89 ^a	97.33±1.89 ^a	97.33±1.89 ^a	97.33±1.89 ^a	93.33±1.89 ^a	90.67±1.89 ^a	82.67±5.00 ^a	77.33±3.78 ^a	73.33±6.83 ^a	73.33±6.80 ^a
阳性对照组 Positive control group	100.00±0 ^a	97.33±3.78 ^a	90.67±4.99 ^a	85.33±6.80 ^b	80.00±8.64 ^b	66.67±6.80 ^b	60.00±8.64 ^b	46.67±10.51 ^b	38.67±10.53 ^b	28.00±14.24 ^b	25.33±15.43 ^b
阴性对照组 Negative control group	100.00±0 ^a	100.00±0 ^a	98.67±1.89 ^a	97.33±1.89 ^a	97.33±1.89 ^a	96.00±3.27 ^a	92.00±3.27 ^a	88.00±3.27 ^a	88.00±3.27 ^a	88.00±3.27 ^a	86.67±1.89 ^a

注: 同列中数据后面不同字母表示显著性差异($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column mean significantly different ($P<0.05$)

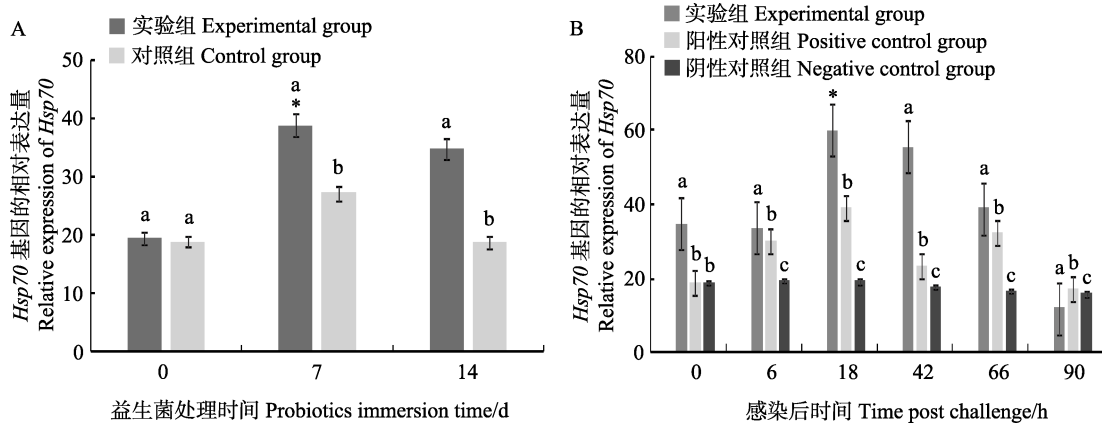


图 2 凡纳滨对虾肝胰腺中 *Hsp70* 基因的相对表达量
Fig.2 Relative expression of *Hsp70* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段
A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

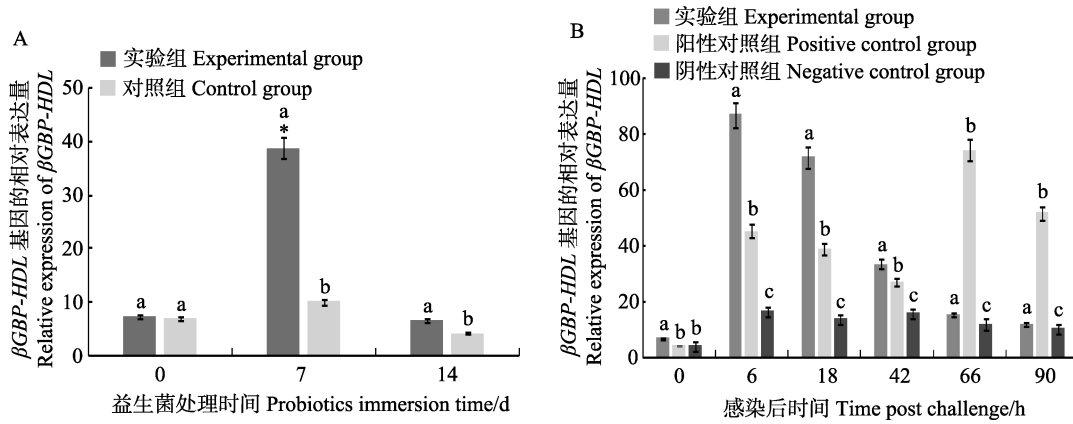


图 3 凡纳滨对虾肝胰腺中 β GBP-HDL 基因的相对表达量
Fig.3 Relative expression of β GBP-HDL in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段
A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

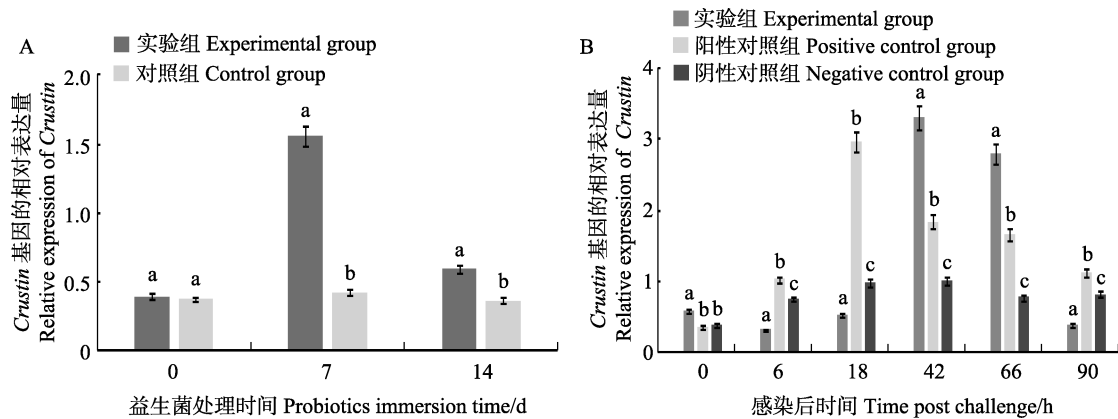


图 4 凡纳滨对虾肝胰腺中 *Crustin* 基因的相对表达量
Fig.4 Relative expression of *Crustin* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段
A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

期,凡纳滨对虾肝胰腺 *LGBP* 的相对表达量测定结果见图 5B, 实验组和阳性对照组基因的表达量均呈先升高后下降的趋势, 攻毒 42 h 以后, 实验组对虾 *LGBP* 的表达量高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。

2.3.5 过氧化氢酶(CAT)活性 益生菌处理期, 凡

纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性的测定结果见图 6A, 实验组 CAT 活性显著高于对照组的 ($P < 0.05$), 呈逐渐升高趋势。攻毒期, 凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性的测定结果见图 6B, 实验组从第 18 小时开始呈逐渐升高的趋势, 而阳性对照组呈先升高后下降、再升高再下降的趋势。

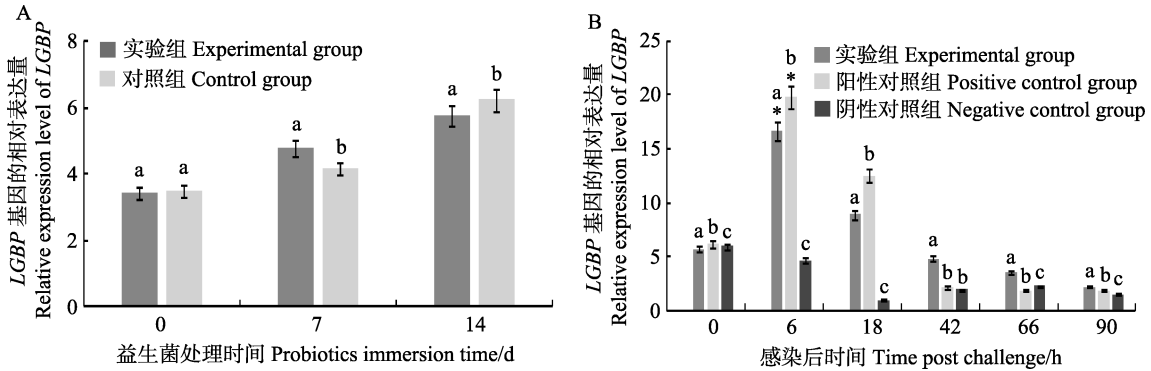


图 5 凡纳滨对虾肝胰腺中 *LGBP* 的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *LGBP* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段

A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

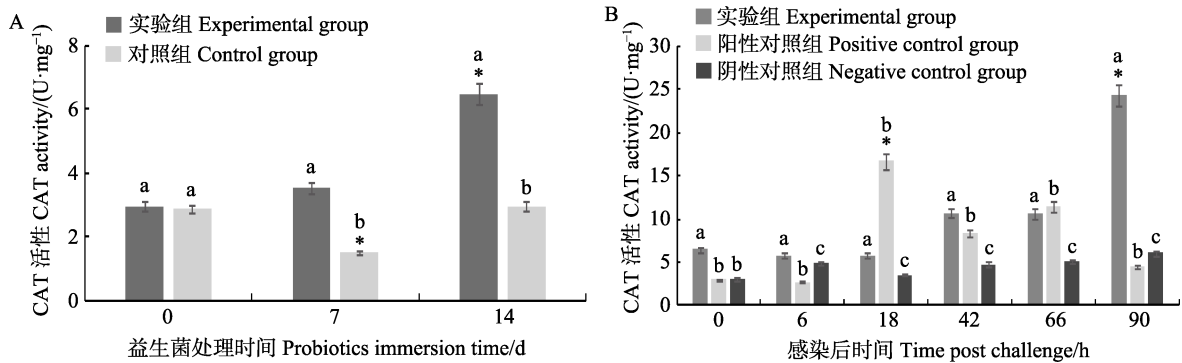


图 6 凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性

Fig.6 CAT activity of *L. vannamei* hepatopancreas

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段

A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

3 讨论

Wu 等(2008)研究表明, 益生菌可以在对虾肠道内复杂的环境中竞争有限的生态位点, 阻止致病微生物在该位点定植与繁殖。竞争性抑制是益生菌通过与肠道上皮细胞发生反应, 与致病菌竞争肠道黏膜表面结合位点, 进而抑制致病菌在肠道内的黏附和定植, 是益生菌的益生机制之一(廖文艳等, 2011)。本研究中, 实验组水体可培养细菌总数显著高于对照组, 且实验组对虾肠道可培养细菌总数也显著高于对照组, 说明添加益生菌不仅对养殖水体可培养细菌总数产

生影响, 同时, 也影响对虾肠道可培养细菌总数。类似地, 胡毅等(2008)研究发现, 饲料中添加枯草芽孢杆菌能显著增加凡纳滨对虾肠道细菌总数, 且与对照组相比饲料中添加益生菌在实验前期和末期均显著降低了对虾肠道的弧菌数量。刘文亮等(2017)在凡纳滨对虾养殖水体中投喂含有蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的饲料, 用 16S rDNA 序列 V3+V4 区高通量测序方法检测对虾肠道内微生物群落的结构及变化, 结果表明, 饲料中添加蜡样芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾后, 可改变对虾肠道的微生物组成, 提高凡纳滨对虾生长速度、增强抗病能力。本研究攻毒阶段实验组对

虾相对于阳性对照组对虾累积存活率提高了48.00%,说明复合益生菌能够提高对虾抗副溶血弧菌感染能力,这可能与益生菌增加对虾肠道可培养细菌总数有关。由于本研究取样次数较多,导致每次取样的对虾样本量偏少,对虾肠道可培养细菌数量增多并不足以说明对虾肠道菌落结构的变化。益生菌是否在凡纳滨对虾体内定植还有待进一步探索。

LGBP作为一种模式识别受体能够识别革兰氏阴性菌和真菌细胞壁的脂多糖和 β -1,3-葡聚糖,并通过激活ProPO系统发挥作用,它是甲壳动物对抗副溶血弧菌感染的一个重要免疫因子(王锡波等,2013);与LGBP功能类似, β GBP-HDL在激活ProPO系统、凝集过程等方面起着重要作用(王春迪等,2016)。本研究中,益生菌处理阶段LGBP, β GBP-HDL在第7天均出现不同程度上调,孙艳等(2012)研究也发现,凡纳滨对虾 β GBP在含益生菌的饲料饲喂对虾过程中表达上调,并在72 h时达到最大值,与本研究结果类似。攻毒阶段,实验组的LGBP表达始终显著高于阴性对照组,阳性对照组的LGBP则在攻毒后第66小时低于阴性对照组,且攻毒42 h后,实验组LGBP表达始终高于阳性对照组;而实验组的 β GBP-HDL在攻毒前42 h显著高于阳性对照组。分析实验结果,水体添加复合益生菌不同程度的促进了LGBP, β GBP-HDL表达,说明复合益生菌在凡纳滨对虾抵抗副溶血弧菌侵染的过程中发挥了积极的作用。

HSP作为一种对环境应激敏感的蛋白,在外界环境刺激下其表达量会明显增加,参与到细胞保护机制中,对保证正常的细胞结构,维持机体新陈代谢具有重要意义(明建华等,2009)。本研究攻毒阶段,实验组和阳性对照组Hsp70表达均呈先上升后下降的趋势,但实验组基因表达量显著高于阳性对照组,说明养殖水体添加益生菌后,相比阳性对照组实验对虾抗应激反应能力更强。类似的研究,王春迪等(2016)在养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌后,用WSSV感染凡纳滨对虾,实验组对虾Hsp70在第96小时表达量显著高于对照组。水体添加高浓度副溶血弧菌攻毒能引起对虾的应激反应,而本研究表明,副溶血弧菌攻毒时,复合益生菌能够提高凡纳滨对虾抗应激反应的能力。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是一种原始的具有防御功能的生物分子,目前主要包括:ALFs、Crustins、Pencidins三大类以及一些血蓝蛋白、溶菌酶、C型外源凝集素等(Antony et al, 2011)。本实验中益生菌处理阶段,实验组Crustin在第7天和第14天的表达量均高于对照组,说明水体添加益生菌能促进Crustin表达。攻毒阶段,实验组和阳性对照

组Crustin的表达均呈现先升高后下降的趋势,阳性对照组在第18小时达到最大,实验组在第42小时达到最大。赵伟等(2017)用副溶血弧菌攻毒发现,攻毒后的实验组对虾Crustin呈现先上升后下降的趋势,并在攻毒的第12小时达到最大,跟本研究阳性对照组实验结果类似。攻毒后,副溶血弧菌对对虾机体造成伤害,Crustin短时间内的迅速表达能够抵抗副溶血弧菌的入侵。研究表明,复合益生菌增强对虾抗副溶血弧菌入侵的能力,可能与攻毒后复合益生菌延缓对虾Crustin基因的表达有关。

氢氧自由基(OH \cdot , ROS)是化学性质最活泼的活性氧,它几乎与细胞内的每一类有机物如糖、氨基酸、磷脂、核苷酸和有机酸发生反应,其破坏性极强(Liu et al, 2010)。当副溶血弧菌侵入凡纳滨对虾体内时,会激发对虾天然免疫系统,产生ROS以对抗弧菌的入侵,虽然释放ROS是甲壳动物对抗微生物感染的重要防御机制,产生过量同时会导致细胞损伤,但它可以被过氧化氢酶分解(Duan et al, 2015)。本研究益生菌处理阶段,复合益生菌能够显著提高对虾CAT活性。桂琳等(2015)研究也发现,水体添加复合益生菌能显著提高草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)血清中CAT活性。本研究攻毒阶段,阳性对照组CAT活性呈上升、下降、再上升、再下降的趋势。赵伟等(2017)使用副溶血弧菌攻毒,36 h内观察对凡纳滨对虾CAT的影响,发现实验组凡纳滨对虾肝胰腺CAT活性呈先升高后降低的趋势,与本研究阳性对照组结果相似,说明副溶血弧菌对凡纳滨对虾的这种天然免疫系统造成了破坏;而本研究中,实验组CAT活性则呈逐渐上升的趋势,这种逐渐上升的趋势说明实验组对虾的这种免疫机制仍然完善。分析实验结果,益生菌增强对虾抗弧菌感染能力,可能与益生菌能够提高对虾的CAT活性有关。

4 结论

凡纳滨对虾养殖水体中添加的复合益生菌能显著提高对虾感染副溶血弧菌后的成活率,增加水体和对虾肠道中可培养细菌量。在益生菌处理时期,复合益生菌能够不同程度的提高对虾抗病相关基因的表达量和CAT活性;副溶血弧菌攻毒时期,对虾抗病相关基因表达呈现各自不同的情况。实验结果表明,复合益生菌提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的原因可能与复合益生菌增加水体和对虾肠道中可培养细菌量、提高凡纳滨对虾抗病相关基因表达和CAT活性有关。

参 考 文 献

- Antony SP, Singh ISB, Jose RM, *et al.* Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probiotics and white spot virus challenge. *Aquaculture*, 2011, 316(1-4): 6-12
- Balcázar JL, Blas ID, Ruiz-Zarzuola I, *et al.* The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186
- Chai PC. Application of *Bacillus firmus* PC465 in shrimp culture and the evaluation of effects on growth, disease resistance of *L. vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [柴鹏程. 坚强芽孢杆菌PC465在凡纳滨对虾养殖中的应用技术及效果评价. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Chen MM, Dong X, Qiu L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(VpAHPND)的定量分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100]
- Duan Y, Zhang J, Dong H, *et al.* Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 354-365
- Gao G, Zhu KL, Zhang QQ, *et al.* Simplified fermentation of a functional probiotics and the application in prawn (*Litopenaeus vannamei*) bio-floc breeding. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 140-147 [高戈, 朱开玲, 张庆起, 等. 一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖中的应用. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 140-147]
- Gui L, Wang XQ, Kang Y, *et al.* Effects of one compound probiotics on growth and antioxidant function of *Ctenopharyngodon idellus*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(5): 83-87 [桂琳, 王晓清, 康银, 等. 一种复合益生菌对草鱼生长和抗氧化功能的影响. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 83-87]
- Hu Y, Tan BP, Mai KS, *et al.* Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 244-251 [胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 244-251]
- Jia D, Shi CY, Huang J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103-111 [贾丹, 史成银, 黄健, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103-111]
- Liao WY, Zhou LH, Wang YY, *et al.* Recent progress on probiotic mechanisms in intestine and the studying methods. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(2): 184-189 [廖文艳, 周凌华, 王荫榆, 等. 近年来益生菌肠道功能作用机制及研究方法的进展. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(2): 184-189]
- Liu GB, Wang M, Lu MX, *et al.* Application of *Bacillus subtilis* in comprehensive prevention and control of streptococcus disease of tilapia. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(13): 123-129 [刘观斌, 王淼, 卢迈新, 等. 枯草芽孢杆菌在罗非鱼链球菌病综合防控中的应用研究. *广东农业科学*, 2015, 42(13): 123-129]
- Liu KF, Yeh MS, Kou GH, *et al.* Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34(9): 935-944
- 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. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*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]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- Ming JH, Xie J, Liu B, *et al.* Cloning sequence analysis of *HSP70* cDNA and effects of heat stress on its mRNA expression in *Megalobrama amblycephala*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(5): 635-648 [明建华, 谢骏, 刘波, 等. 团头鲂 *HSP70* cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 635-648]
- Sun BC, Yang YK, Wang HL, *et al.* Effects of probiotics combination on breeding of *Litopenaeus vannamei* under zero-water exchange condition. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 93-102 [孙博超, 杨运楷, 王海亮, 等. 零换水条件下益生菌组合在凡纳滨对虾育苗生产中的应用. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 93-102]
- Sun Y, Liu F, Song XL, *et al.* Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 845-850 [孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 845-850]
- Thompson FL, Abreu PC, Cavalli R. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 1999, 174(1-2): 139-153
- Wang CD, Song XL, Zhang XJ, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 146-155 [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 146-155]
- Wang HL, Wang CD, Tang Y, *et al.* *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2018, 494: 30-36
- Wang N, Wang HL, Bai N, *et al.* Isolation of lysogenic phage in *Vibrio parahaemolyticus* and its relationship with the pathogenicity of the host bacteria. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 105-110 [王娜, 王海亮, 白楠, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 105-110]
- Wang XB, Jin S, Chen YE, *et al.* Temporal expression of the

- LGBP gene in mainly tissues of *Portunus trituberculatus* challenged by different pathogens. *Journal of Biology*, 2013, 30(6): 5–9 [王锡波, 金珊, 陈寅儿, 等. 不同病原菌刺激下三疣梭子蟹主要组织 LGBP 基因的时序表达. *生物学杂志*, 2013, 30(6): 5–9]
- WU X, Vallance BA, Boyer L, *et al.* *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008, 294(1): 295–306
- Zhang HH, Wang XH, Li C, *et al.* Isolation and identification of a bacterial strain with *Vibriosis*-antagonism from shrimp ponds. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 85–92 [张欢欢, 王秀华, 李晨, 等. 对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 85–92]
- Zhang SJ, Song XL, Zhao XJ, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 899–907 [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响. *水产学报*, 2015, 39(6): 899–907]
- Zhang SJ, Zhao XJ, Song XL, *et al.* Effects of adding probiotics on promoting intestinal bacteria, Toll receptors, and lysozyme immune gene expression and resistance to *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 846–854 [张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 饲料添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll 受体及溶菌酶基因表达及抗感染的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 846–854]
- Zhao W, Wang L, Liu M, *et al.* The effects of *Vibrio parahaemolyticus* on hepatopancreas antioxidant enzyme activity and gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1261–1270 [赵伟, 王雷, 刘梅, 等. 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性和基因表达的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1261–1270]

(编辑 马瑾艳)

Effect of A Compound Probiotics on the Ability of *Litopenaeus vannamei* to Resist *Vibrio parahaemolyticus* Infection

YANG Yunkai^{1,2}, SONG Xiaoling^{2①}, WANG Hailiang², XIE Guosi², HUANG Jie²

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

Abstract In this culture experiments of *Litopenaeus vannamei*, we explore the effect of compound probiotics on the ability of *L. vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection at different experimental stages. One strain of *Bacillus licheniformis* (BL-9), one *B. subtilis* (BS-12), and one *Pseudoalteromonas flavipulchra* (CDM8) were selected to make up a compound of probiotics at the same concentration (10^7 CFU/ml). The effect of compound probiotics on the *V. parahaemolyticus* infection of *L. vannamei* was observed by adding the compound probiotics to the culture water of the *L. vannamei*. The experiment took place over 30 d, including a temporary period (7 d), a probiotics immersion period (15 d), and a *V. parahaemolyticus* infection period (10 d). The experiment results showed that the addition of compound probiotics in the culture water could significantly increase the total number of bacteria culture in the water and the intestinal tract of *L. vannamei* ($P < 0.05$). The cumulative survival rate of shrimp in the experimental group was $(73.33 \pm 6.83)\%$ at the end of the infection period which was significantly higher than that of the positive control group $(25.33 \pm 15.43)\%$. The disease-resistant-related gene: heat shock protein 70 (*Hsp70*), β -1,3-glucan binding protein-lipoprotein (β GBP-HDL), lipopolysaccharide- β -1,3-glucan binding protein (LGBP), *crustin*, and immune related enzymes catalase (CAT), was up-regulated by different degrees in the probiotics immersion phase. And all the genes up-regulated extensively during the *V. parahaemolyticus* infection stage, but expressed at different levels. The results suggested that the compound probiotics with BL-9, BS-12, and CDM8 in water could improve the ability of shrimp to resist *V. parahaemolyticus* infection. The increase of disease resistance of *L. vannamei* may be related to the colonization of probiotics in the intestinal tract, and the expression level of disease resistance related genes and catalase activity in *L. vannamei*. It is hoped that the results of this study can provide a reference for the application of compound probiotics in the cultivation of *L. vannamei*.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Compound probiotics; *Vibrio parahaemolyticus*; Immune genes; Catalase

① Corresponding author: SONG Xiaoling, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190128001

http://www.yykxjz.cn/

兰欣, 李杰, 李贵阳, 肖鹏, 莫照兰. 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 142–150
Lan X, Li J, Li GY, Xiao P, Mo ZL. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from diseased flatfish. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 142–150

发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析*

兰欣^{1,2} 李杰³ 李贵阳³ 肖鹏¹ 莫照兰^{3①}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049;
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与
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 细菌性疾病是中国海水养殖鲆鲽类的主要病害, 为全面了解病原菌种类, 本研究对 1999~2012 年从山东、江苏、河北、天津等沿海地区养殖场发病鲆鲽鱼类中分离得到的 124 株优势菌株进行了 16S rRNA 基因测序和系统发育学分析。将基因序列与 GenBank 核酸序列数据库进行相似度比对分析, 结果显示, 有 83 株与弧菌属(*Vibrio* sp.)细菌相似度最高, 11 株与气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)细菌相似度最高, 4 株与爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.)细菌相似度最高, 26 株为其他 15 种属的细菌。根据系统发育学分析结果, 进一步将 66 株菌鉴定为 16 个种, 优势种为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)。选择其中的 9 株鳃弧菌和 4 株迟缓爱德华氏菌进行人工感染实验, 结果显示, 其中 7 株鳃弧菌和 3 株迟缓爱德华氏菌对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)有较强的致病性。研究结果可为阐明中国海水养殖鲆鲽类的流行病发生历史、病原种类、病原监测及疾病控制提供重要参考。

关键词 鲆鲽类; 病原菌; 16S rRNA 基因; 系统发育学分析; 鉴定

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0142-09

近年来, 中国水产养殖业发展迅速, 已成为国民经济的重要组成部分, 但随着养殖规模的扩大, 水产病害也越来越严重, 成为制约中国水产业发展的一个重要因素。据统计, 2017 年水产养殖因病害造成的直接经济损失达约 361 亿元, 在监测到的 96 种病原中, 细菌性疾病种类占了 46 种(张显良等, 2018)。中国海水养殖地域范围分布广, 从辽宁到海南的纬度跨度达 23°, 同时, 养殖品种多, 导致不同地区养殖病害种类复杂, 极大地增加了病害防控的难度。鲆鲽类

是中国海水养殖的重要品种, 在辽宁、河北、山东、江苏等多个省份均有养殖。对养殖鲆鲽类进行流行病学调查, 可为中国水产流行病学的监控提供基础数据, 并可进一步有针对性地对细菌性病害进行防治, 对中国水产事业的发展有重要意义。

水产养殖动物的病原主要有细菌、病毒、真菌和寄生虫四大类。其中, 细菌性疾病是鱼类中最为常见且是危害最大的一类疾病。现已报道的海水鱼类细菌病原超过 40 种, 包括弧菌(*Vibrio*)、爱德华氏菌

* 国家重点研发计划(2018YFC0311300)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019ZD0706)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China(2018YFC0311300), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2019ZD0706), and Aoshan Technology Innovation Program (2015ASKJ02)]. 兰欣, E-mail: lanxinqd@vip.qq.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-01-28, 收修改稿日期: 2019-03-19

(*Edwardsiella*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、屈挠杆菌(*Flexibacter*)、巴斯德氏菌(*Pasteurella*)、肾杆菌(*Renibacterium*)、链球菌(*Streptococcus*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)和诺卡氏菌(*Nocardia*)等(Austin *et al*, 2007; Fryer *et al*, 1993)。

目前, 16S rRNA 基因的高通量测序在环境细菌组成分析研究中已得到广泛应用, 通过提取、扩增和分析水体、鱼体表和组织的总DNA, 对16S rRNA 基因进行扩增、测序和比对, 判断细菌的种类组成, 并可获得大量的非可培养细菌的数据。16S rRNA 是高度保守的分子, 又有中度保守和高度变化的序列区域, 适合于研究进化距离不同的各类原核生物的亲缘关系, 目前已广泛应用于细菌的分类研究(东秀珠等, 2001; Borrell *et al*, 1997)。但由于病原需要通过柯赫氏法则进行确定, 因此, 在病原的鉴定过程中, 分离培养依旧是不可缺少的一部分。鲆鲽类是中国重要的海水养殖品种, 本实验室自1999年以来, 开展了海水养殖鲆鲽类病害调查, 从江苏、山东、河北、天津等沿海养殖场的发病鱼分离收集菌株。本研究通过分析分离菌株的16S rRNA 基因序列, 对其进行分类, 并对其中的鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌进行致病性检验, 以期对中国海水养殖鲆鲽类的细菌性病原种类有深入的了解, 为病害控制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究所用菌株为1999~2012年从江苏、山东、河北、天津等沿海地区海水养殖场发病鲆鲽类内脏分离纯化(表1), 用甘油保存于-80℃冰箱中。

1.2 细菌16S rRNA 基因序列的PCR扩增和测序

取保存于-80℃冰箱的菌株在胰大豆蛋白胨平板(TSA)划线, 28℃培养24~36 h, 挑取单一菌落悬浮于50 μl 无菌蒸馏水, 在100℃水浴5 min 裂解细胞, 离心沉淀细胞碎片, 取上清液作为细菌DNA模板。以细菌16S rRNA 基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTT GTTACGAC TT-3')进行PCR扩增(Lane, 1991)。50 μl PCR反应体系: 5 μl 10×*Taq* buffer, 1 μl 2.5 mmol/L dNTPs (Thermo, 美国), 3 μl 25 mmol/L MgCl₂, 10 μmol/L 引物各1 μl, *Taq*酶0.5 μl (Thermo, 美国), DNA模板2 μl, ddH₂O 补至50 μl。反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min 40 s, 30个循环; 72℃ 10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用DNA胶回

收试剂盒(上海生工)进行纯化, 纯化产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3 16S rRNA 基因序列比对分析

所得序列在 GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)核酸数据库进行 Blast 比对分析, 根据序列相似性>95%为同属细菌, 在70%~95%为不同属细菌(杨霞等, 2008), 初步确定所测细菌在属水平上的分类地位。采用 BioEdit 的 ClustalW Multiple alignment 比对分析, 运用 Mega5.05 以 Neighbor-Joining 法, 重复1000次计算 bootstrap 值, Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树。

1.4 人工感染实验

选择均重约为30 g的健康大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 养殖水温为16℃~18℃, 通过肌肉注射方式进行人工感染。选取鉴定为鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌的菌株接种于TSB液体培养基, 28℃摇床培养12 h。离心收集菌体, 用生理盐水将菌液依次稀释至10⁶、10⁵、10⁴和10³ CFU/ml。每个浓度注射10尾鱼, 每尾注射0.1 ml, 对照组注射等体积的灭菌生理盐水。每天正常饲喂、换水, 记录发病和死亡情况, 对死亡鱼及时解剖, 并对病原进行分离。同时, 平板计数稀释液以确定菌液具体浓度。根据改进的寇氏法(杨茂成, 1990)计算菌株的半数致死量(50% lethal dose, LD₅₀)。

2 结果与分析

2.1 细菌16S rRNA 基因扩增及序列分析

以引物对 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 获得1500 bp 左右的 DNA 片段。对纯化的 DNA 片段进行测序, 获得的16S rRNA 基因序列提交至 GenBank, 登录号见表1。Blast 结果显示, 所得124个16S rRNA 基因序列与 GenBank 核酸数据库序列的最高相似性达99%~100%, 可鉴定到属的地位, 其中, 弧菌属(*Vibrio* sp.)数量最多, 共分离到83株, 占66.9%; 其次依次为气单胞菌属(*Aeromonas* sp.) (共11株, 占8.9%)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.) (4株, 占3.2%)、假交替单胞菌属(*Pseudaltermonas* sp.) (3株, 占2.4%)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) (3株, 占2.4%)等(表2)。在1999~2004年, 分离到的细菌大部分属于弧菌属, 占77.3%; 在2005年以后, 随着养殖技术的提高和养殖条件的改善, 弧菌的比例逐渐下降, 仅占29.6%, 气单胞菌属和爱德华氏菌属的菌株

逐渐增多, 分别占 40.7%和 11.1%。

根据在 GenBank 核酸数据库中进行 Blast 比对的结果, 并从 GenBank 选取属内具有代表性的 16S rRNA 基因序列作为参考序列, 与所得序列共同构建系统进化树(图略)。综合相似性和系统进化结果, 将

66 株细菌鉴定到种的水平, 其中, 15 株为溶藻弧菌(占 12.1%), 9 株为哈氏弧菌(占 7.3%), 9 株为鳃弧菌(占 7.3%), 6 株为杀鲑气单胞菌(占 4.8%), 4 株为迟缓爱德华氏菌(占 3.2%), 以及其他种类的细菌(表 3), 其余菌株均须结合其他方法鉴定到种的水平。

表 1 分离菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸数据库 BLAST 分析
Tab.1 BLAST analysis of 16S rRNA gene sequences in GenBank Nucleotide Database

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
M3	AY035897	<i>Vibrio anguillarum</i> 775, CP002284	1999~2001
B17	AY046955	<i>Vibrio</i> sp. clone H02C48-20, HQ161427	1999~2001
M4	AY046956	<i>Vibrio</i> sp. J207, GU223597	1999~2001
SMP1	EF091702	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
MHK9	EF091705	<i>Vibrio anguillarum</i> strain HQ010516A-1, DQ068758	2005
MHK2	HQ611038	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2005
MHK25	HQ611039	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2005
5SHT	KC884584	<i>Vibrio</i> sp. D4058, DQ480136	2007
8SHT	KC884585	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	2007
25C	KC884586	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 13150, DQ068942	2002~2003
AJ1	KC884587	<i>Vibrio harveyi</i> CGB10, GU070669	1999~2001
AX4	KC884588	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
AX6	KC884589	<i>Vibrio ponticus</i> strain AN62, JQ409384	1999~2001
B17-4	KC884590	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
DFHYSS-1	KC884591	<i>Vibrio littoralis</i> strain MANO22D, NR043545	2010
ED2-1	KC884592	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
ED3	KC884593	<i>Vibrio</i> sp. A975, GU223593	1999~2001
ED22	KC884594	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	1999~2001
F6	KC884595	<i>Vibrio</i> sp. A5-15, JX134469	1999~2001
H5	KC884596	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
HFST-4	KC884597	<i>Vibrio azureus</i> strain UDC491, HM032017	2009
IM4-1	KC884598	<i>Vibrio harveyi</i> strain CAIM 1792, JQ434106	1999~2001
IM4-2	KC884599	<i>Vibrio harveyi</i> strain CAIM 1792, JQ434106	1999~2001
IM7-1	KC884600	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	1999~2001
L2	KC884601	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L4	KC884602	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2002~2003
L6	KC884603	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L8	KC884604	<i>Vibrio vulnificus</i> NBRC 15645, AB680930	2002~2003
L9	KC884605	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NBRC 15633, AB680919	2002~2003
L10-1	KC884606	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L10-2	KC884607	<i>Vibrio furnissii</i> strain 9119-82, NR037067	2002~2003
L15	KC884608	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L15-2	KC884609	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L18	KC884610	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L21	KC884611	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NBRC 15633, AB680919	2002~2003
L25	KC884612	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L32	KC884613	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6 strain CMCP6, NR074889	2002~2003

续表 1

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
L33	KC884614	<i>Vibrio metschnikovii</i> strain H050610-1, EF645831	2002~2003
L35	KC884615	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L37	KC884616	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 35084, HM771342	2002~2003
L38	KC884617	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L40	KC884618	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NBRC 12711, AB680329	2002~2003
L41	KC884619	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L44	KC884620	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	2002~2003
L47	KC884621	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116, CP000789	2002~2003
L48	KC884622	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2002~2003
L50	KC884623	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L52	KC884624	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L53	KC884625	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	2002~2003
L62	KC884626	<i>Vibrio anguillarum</i> NBRC 13266, AB680389	2002~2003
L63	KC884627	<i>Vibrio</i> sp. A975, GU223593	2002~2003
L66	KC884628	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2002~2003
L67	KC884629	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	2002~2003
MHK4	KC884630	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> 04Ya311, AB571870	2005
MHK5	KC884631	Bacterium 3H203, JF411537	2005
MHK13	KC884632	<i>Vibrio anguillarum</i> AQ_Vang_001_2012_A4398, KC404866	2005
MT83	KC884633	<i>Vibrio</i> sp. HS1, EU086102	1999~2001
MWL1	KC884634	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
NH1	KC884635	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2004
NH2	KC884636	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	2004
NH4	KC884637	<i>Vibrio commol/Lunis</i> strain F052, JF836182	2004
NH6	KC884638	<i>Vibrio</i> sp. CF4-11, FJ169995	2004
NH7	KC884639	<i>Vibrio harveyi</i> CGB10, GU070669	2004
SMP2	KC884640	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	2004
SMP3	KC884641	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
SMP4	KC884642	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
SMQ6	KC884643	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ7	KC884644	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ8	KC884645	<i>Vibrio ichthyenteri</i> isolate HQ010223-1, DQ003270	1999~2001
SMQ9	KC884646	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ10	KC884647	<i>Vibrio ichthyenteri</i> isolate HQ010223-1, DQ003270	1999~2001
SMQ15	KC884648	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
SMQ16	KC884649	Marine bacterium B27, AB607151	1999~2001
SMQ29	KC884650	<i>Vibrio anguillarum</i> 775, CP002284	1999~2001
SMW3	KC884651	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	2004
STD3-90	KC884652	<i>Vibrio harveyi</i> isolate EHP13, FJ227119	1999~2001
TW3	KC884653	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 13150, DQ068942	1999~2001
TWL2	KC884654	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
TWL3	KC884655	Bacterium 4D704, JF411554	1999~2001
TWL4	KC884656	<i>Vibrio</i> sp. V639, DQ146989	1999~2001
WT82	KC884657	<i>Vibrio neptunius</i> strain LMG 20536, NR025476	1999~2001

续表 1

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
X32	KC884658	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
XJ3	KC884659	<i>Vibrio ponticus</i> strain AN62, JQ409384	1999~2001
YL1	KC884660	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
YR1	KC884661	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	1999~2001
JN	KC884662	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2007
SMQ34	KC884663	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	1999~2001
2E42-LD	KC884664	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
3A5LX	KC884665	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
3B5-2	KC884666	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
8C31-L	KC884667	<i>Aeromonas</i> sp. Z2_S_TSA18, KC213894	2012
8C41-L	KC884668	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
MHK8	KC884669	Uncultured bacterium clone OTU-14_BBA, JN981934	2005
MHK10	KC884670	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01, KC130967	2005
MHK14	KC884671	Uncultured bacterium clone C6, JX262562	2005
MHK20	KC884672	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01, KC130967	2005
MHK26	KC884673	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> NBRC12658, AB680307	2005
ZD3	KC884674	<i>Aeromonas</i> sp. Z3_S_TSA6, KC213888	2012
9DLP	KC884675	<i>Pseudomonas</i> sp. XjGEB-1, JQ320089	2012
2SHT	KC884676	Uncultured bacterium clone JdFBHulkDF9, JQ678565	2012
100409-4	KC884677	Uncultured bacterium clone D49, EU234302	2010
100409-5	KC884678	<i>Psychrobacter</i> sp. enrichment culture clone B2-3, GU570644	2010
DA1	KC884679	<i>Brevibacterium</i> sp. MN3-3, JQ396535	1999~2001
F2	KC884680	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21, EU435360	1999~2001
IM1-1	KC884681	Uncultured bacterium clone TE-2-B10, JQ337350	1999~2001
L1	KC884682	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain FF111, GQ280904	2002~2003
L12	KC884683	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone W60, JF733467	2002~2003
L16	KC884684	<i>Providencia vermicola</i> strain AR_PSBH1, HM582881	2002~2003
L29	KC884685	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone W60, JF733467	2002~2003
L34	KC884686	Uncultured proteobacterium clone nLO3SP1, JQ218658	2002~2003
L39-1	KC884687	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i> strain YKJ-101, NR025643	2002~2003
L54	KC884688	<i>Halomonas</i> sp. BJGMMOL/L-B48, JQ716248	2002~2003
L56	KC884689	<i>Halomonas</i> sp. BJGMMOL/L-B48, JQ716248	2002~2003
L58	KC884690	<i>Brachybacterium</i> sp. PL16F2_S1, JF274910	2002~2003
L60	KC884691	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B136-33, CP004061	2002~2003
L68	KC884692	Uncultured bacterium clone TE-2-B10, JQ337350	2002~2003
L70	KC884693	<i>Pseudomonas straminea</i> NBRC 16640, AB681096	2002~2003
MHK15	KC884694	<i>Pantoea</i> sp. HC001005-1, EU364832	2005
SMP5	KC884695	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i> NML12-0043, JX476083	2004
SMW6	KC884696	Uncultured proteobacterium clone nLO3SP1, JQ218658	2004
SMW8	KC884697	<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC20, CP004856	2004
T2	KC884698	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21, EU435360	1999~2001
WT65-2	KC884699	<i>Brachybacterium</i> sp. PB10, DQ643203	1999~2001
ZMN6	KC884700	<i>Arthrobacter</i> sp. S44, HE662658	1999~2001

表 2 分离菌株在属水平上的分类地位
Tab.2 Classification status of the isolated strains on genus level

菌株编号 Strain name	数量 Number	比例 Percentage (%)	属 Genus
5SHT, 8SHT, 25C, AJ1, AX4, AX6, B17, B17-4, DFHYSS-1, ED2-1, ED3, ED22, F6, H5, HFST-4, IM4-1, IM4-2, IM7-1, L2, L4, L6, L8, L9, L10-1, L10-2, L15, L15-2, L18, L21, L25, L32, L33, L35, L37, L38, L40, L41, L44, L47, L48, L50, L52, L53, L62, L63, L66, L67, M3, M4, MHK4, MHK5, MHK9, MHK13, MT83, MWL1, NH1, NH2, NH4, NH6, NH7, SMP1, SMP2, SMP3, SMP4, SMQ6, SMQ7, SMQ8, SMQ9, SMQ10, SMQ15, SMQ16, SMQ29, SMW3, STD3-90, TW3, TWL2, TWL3, TWL4, WT82, X32, XJ3, YL1, YR1	83	66.9	<i>Vibrio</i> sp.
2E42-LD, 3A5LX, 3B5-2, 8C31-L, 8C41-L, MHK8, MHK10, MHK14, MHK20, MHK26, ZD3	11	8.9	<i>Aeromonas</i> sp.
JN, MHK2, MHK25, SMQ34	4	3.2	<i>Edwardsiella</i> sp.
2SHT, L34, SMW6	3	2.4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
9DLP, L60, L70	3	2.4	<i>Pseudomonas</i> sp.
100409-5, IM1-1, L68	3	2.4	<i>Psychrobacter</i> sp.
SMP5, ZMN6	2	1.6	<i>Arthrobacter</i> sp.
L58, WT65-2	2	1.6	<i>Brachybacterium</i> sp.
L54, L56	2	1.6	<i>Halomonas</i> sp.
L12, L29	2	1.6	<i>Proteus</i> sp.
F2, T2	2	1.6	<i>Virgibacillus</i> sp.
100409-4	1	0.8	<i>Bacillus</i> sp.
DA1	1	0.8	<i>Brevibacterium</i> sp.
SMW8	1	0.8	<i>Enterococcus</i> sp.
L39-1	1	0.8	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.
MHK15	1	0.8	<i>Pantoea</i> sp.
L16	1	0.8	<i>Providencia</i> sp.
L1	1	0.8	<i>Stenotrophomonas</i> sp.

表 3 分离菌株在种水平上的分类地位
Tab.3 Classification status of the isolated strains on species level

菌株编号 Strain name	数量 Number	比例 Percentage (%)	种 Species
ED3, L2, L6, L25, L50, L52, L63, L67, NH2, NH6, STD3-90, TWL2, YL1, YR1	15	12.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
M4, AJ1, IM4-1, IM4-2, L37, MHK5, NH7, TWL3, TWL4	9	7.3	<i>Vibrio harveyi</i>
M3, SMP1, MHK9, L4, L62, MHK13, SMP3, SMP4, SMQ29	9	7.3	<i>Vibrio anguillarum</i>
L9, L21, MHK4	3	2.4	<i>Vibrio damsela</i>
L10-1, L10-2, L18	3	2.4	<i>Vibrio furnissii</i>
B17, 5SHT, SMQ16	3	2.4	<i>Vibrio splendidus</i>
F6, MT83	2	1.6	<i>Vibrio azureus</i>
AX6, XJ3	2	1.6	<i>Vibrio ponticus</i>
L8, L32	2	1.6	<i>Vibrio vulnificus</i>
DFHYSS-1	1	0.8	<i>Vibrio litoralis</i>
L33	1	0.8	<i>Vibrio metschnikovii</i>
WT82	1	0.8	<i>Vibrio neptunius</i>
2E42-LD, 3A5LX, 3B5-2, 8C31-L, 8C41-L, ZD3	6	4.8	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MHK8, MHK10, MHK20	3	2.4	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
MHK14, MHK26	2	1.6	<i>Aeromonas veronii</i>
JN, MHK2, MHK25, SMQ34	4	3.2	<i>Edwardsiella tarda</i>

2.2 人工感染实验和半数致死量

选取鉴定为鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌的菌株对大菱鲆进行人工感染实验和半数致死量计算。结果显示,在9株鳃弧菌中,7株对大菱鲆具有较强的致病性;在4株迟缓爱德华氏菌中,3株有较强的致病性。细菌的半数致死量如表4所示,鳃弧菌M3、SMP1和SMQ29对大菱鲆的半数致死量在 10^5 CFU/尾左右,L4、L62、SMP3和SMP4的半数致死量在 10^6 CFU/尾左右,鳃弧菌MHK9和MHK13的半数致死量都在 10^7 CFU/尾以上,属于非致病性菌株。迟缓爱德华氏菌JN、SMQ34和MHK2对大菱鲆的半数致死量在 $10^3\sim 10^4$ CFU/尾,MHK25的半数致死量超过 10^7 CFU/尾,也属于非致病性菌株。

表4 分离菌株对大菱鲆的半数致死量
Tab.4 The 50% lethal dose of isolates in turbot

菌株 Strains	半数致死量 50% lethal dose (CFU/ind.)	
<i>Vibrio anguillarum</i>	M3	$10^{5.1}$
	SMP1	$10^{5.2}$
	SMQ29	$10^{5.4}$
	L4	$10^{6.2}$
	L62	$10^{6.5}$
	SMP3	$10^{6.8}$
	SMP4	$10^{6.8}$
	MHK13	$> 10^7$
	MHK9	$> 10^7$
<i>Edwardsiella tarda</i>	MHK2	$10^{4.1}$
	JN	$10^{3.4}$
	SMQ34	$10^{3.8}$
	MHK25	$> 10^7$

3 讨论

本研究采用16S rRNA基因序列测定及比对分析方法,对1999~2012年从发病海水养殖鲆鲽类中分离到的124株细菌进行了分类地位的分析。结果表明,分离到的弧菌菌株最多,占66.9%,表明弧菌病仍然是中国鲆鲽类养殖的主要疾病。弧菌广泛分布于海洋和河口环境,共发现有66个种(Garrity *et al.*, 2004),其中,对于水生动物危害严重的常见种类有鳃弧菌、溶藻弧菌、哈氏弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌(*V. mimicus*)和河弧菌(*V. fluvialis*)等。本研究表明,溶藻弧菌、鱼肠道弧菌、大菱鲆弧菌、哈氏弧菌和鳃弧菌为江苏、山东、河北和天津鲆鲽类养殖场发病鱼分离到的优势种。鳃弧菌是鲆鲽类常见的致病菌,本研究共分

离到9株鳃弧菌,占分离弧菌的10.84%。另外,还分离到创伤弧菌、河弧菌、灿烂弧菌、费氏弧菌(*V. fischeri*)、梅氏弧菌(*V. metschnikovii*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)、病海鱼弧菌(*V. ordalii*)、栖黑海弧菌(*V. ponticus*),这些弧菌感染水产动物并引起疾病的事件在国内外均有报道(Austin *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007)。在分离得到的弧菌中,溶藻弧菌、创伤弧菌为食源性致病菌,可引起人类食物中毒(Austin, 2010),这表明对水产品来源的弧菌监测应当成为食品安全监管的重要内容。

气单胞菌属的细菌为人鱼共患病原,其中,杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、维隆气单胞菌(*A. veronii*)是引起鱼疾病的主要病原(Austin *et al.*, 2007)。本研究鉴定的11株气单胞菌,分别为杀鲑气单胞菌、维隆气单胞菌和异常嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*)。杀鲑气单胞菌是鲑科鱼类的主要病原,引起鲑鳟鱼的病害并造成严重经济损失(Austin *et al.*, 2007),在中国已发现该病原可感染石斑(*Kareius bicoloratus*)、刺参(*Apostichopus japonicus*)等养殖对象(曹成易等, 2009; 杨嘉龙等, 2007; 张晓君等, 2005);维隆气单胞菌宿主广泛,可感染多种淡水养殖鱼类(Janda *et al.*, 2010),在海水鱼类的肠道中也广泛存在(Herrera *et al.*, 2006),在养殖环境恶化或病原感染的情况下,可能会入侵鱼体引起继发性感染;异常嗜糖气单胞菌也在西班牙养殖的欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中有感染报道(Martinez-Murcia *et al.*, 1992)。

迟缓爱德华氏菌能感染许多动物并引发爱德华氏菌病,感染的动物包括鱼类、两栖类、爬行类直到哺乳类(Thune *et al.*, 1993)。多年来,中国北方的重要水产养殖品种如大菱鲆、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等常受到迟缓爱德华氏菌感染,经济损失严重(王印庚等, 2007; 李杰等, 2008),给水产养殖业造成了严重影响。目前,迟缓爱德华氏菌是该属唯一可以感染人的致病菌,给水产食品安全带来威胁,应引起广泛的重视。

鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌是近年来常见的鲆鲽类致病菌,针对这2种病原,对分离得到的菌株进行了大菱鲆感染实验。在分离到的9株鳃弧菌中,7株对大菱鲆具有较强的致病性;4株迟缓爱德华氏菌中,3株对大菱鲆有较强的致病性。近年来,随着鲆鲽类养殖业的发展,疾病种类也不断增加(李杰等, 2019)。中国鲆鲽类大规模养殖起源于20世纪90年代,本研究中检测的菌株大多是实验室在2000年左右分离(表1),这表明在规模化养殖初期,这些病原就开始

危害中国的养殖鲆鲽类,在今后的水产养殖疾病预防中需对其进行特别关注和重视。

有26株细菌未能鉴定到种的地位,分别为假单胞菌属、假交替单胞菌属、冷杆菌属(*Psychrobacter* sp.)、嗜盐单胞菌属(*Halomonas* sp.)等15个属。假单胞菌属细菌是动植物、人类常见的病原,能引起养殖鲆鲽类的脱鳞症(Li *et al.*, 2018)。假交替单胞菌对海洋动物致病性的报道不多,在中国已发现该属细菌可引起刺参、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)疾病(王印庚等, 2006; 孟庆国等, 2006; 乔迁等, 2010)。其他13个种属的细菌为水环境的菌株,对水生动物的致病性尚未有报道,其致病性需要通过进一步的研究来确定。

鲆鲽类的规模化养殖在中国已有20多年历史,病害是影响鲆鲽类养殖业的重要因素,不仅引起鱼类死亡造成直接经济损失,而且可能导致药物滥用引起药残超标,造成消费者恐慌,进而影响市场价格。目前,国内对养殖鱼类的发病情况报道多集中于个体病例分析,缺乏对产业病害的整体分析,更缺乏规模化养殖起步阶段的病害情况资料。本研究对实验室自1999年以来从发病养殖鲆鲽类中分离的124株菌株进行了鉴定和综合分析,初步确定了中国养殖鲆鲽类主要流行的细菌性病原,为病害防治、流行病学衍化和疫苗开发提供了基础数据。

参 考 文 献

- Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish (4th ed.). Godalming, UK: Springer Praxis, 2007, 243–279
- Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3–4): 310–317
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(7): 1671–1674
- Cao CY, Wang KY, Wang L, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcer disease of Atlantic salmon. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(1): 54–57 [曹成易, 汪开毓, 王玲, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌的分离鉴定. *淡水渔业*, 2009, 39(1): 54–57]
- Dong XZ, Hong JH. Diversity of prokaryotic microorganisms. *Biodiversity Science*, 2001, 9(1): 18–24 [东秀珠, 洪俊华. 原核微生物的多样性. *生物多样性*, 2001, 9(1): 18–24]
- Fryer JL, Rohovec JS. Bacterial diseases of fish. Pathology of marine and estuarine organisms. Boca Raton, CRC Press, 1993, 53–83
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2004
- Herrera FC, Santos JA, Otero A, *et al.* Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(3): 527–536
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: J. Wiley & Sons, 1991, 125–175
- Li J, Chen SQ, Liu CL, *et al.* Association of *Pseudomonas anguilliseptica* with mortalities in cultured spotted halibut *Verasper variegatus* (Temminck & Schlegel, 1846) in China. *Aquaculture Research*, 2018, 49(5): 2078–2080
- Li J, Liu YK, Bai L, *et al.* Isolation and identification of *Mycobacterium marinum* associated with splenic and renal granulomas disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 195–200 [李杰, 刘耀宽, 白露, 等. 大菱鲆脾肾结节病病原菌的分离和鉴定. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 195–200]
- Li J, Mo ZL, Mao YX, *et al.* Isolation and classification of two pathogenic bacteria associated with hemorrhages of *Scophthalmus maximus*. *Marine Sciences*, 2008, 32(10): 1–5 [李杰, 莫照兰, 茅云翔, 等. 两株养殖大菱鲆体表出血病原菌的分离鉴定. *海洋科学*, 2008, 32(10): 1–5]
- Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, *et al.* *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 91(3): 199–205
- Meng QG, Wu LJ, Wu XZ, *et al.* The pathogen of ulcerative disease in cultivated juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2006, 25(12): 635–639 [孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃疡病病原学研究. *水产科学*, 2006, 25(12): 635–639]
- Qiao Q, Han NN, Chen C, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Pseudoalteromonas* sp. and antibiotic sensitivity research. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2010, 38(26): 14224–14226, 14232 [乔迁, 韩娜娜, 陈超, 等. 致病性假交替单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(26): 14224–14226, 14232]
- Thune RL, Stanley LA, Cooper RK. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1993, 3: 37–68
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 610–616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 610–616]
- Wang YG, Qin L, Zhang Z, *et al.* Edwardsiellosis in cultured *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(4): 447–495 [王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病. *水产学报*, 2007, 31(4): 447–495]

- Xie ZY, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* Identification and pathogenicity of *Vibrio ponticus* affecting cultured Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier in Cuvier and Valenciennes). *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(1): 62–67
- Yang JL, Zhou L, Xing J, *et al.* Identification of *Aeromonas salmonicida* associated with skin ulceration of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and characterization of the extracellular products. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 981–989 [杨嘉龙, 周丽, 邢婧, 等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 981–989]
- Yang MC. *Veterinary statistics*. Beijing: China Prospect Publishing House, 1990, 232–234 [杨茂成. *兽医统计学*. 北京: 中国展望出版社, 1990, 232–234]
- Yang X, Chen L, Wang CQ. Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science)*, 2008, 36(2): 55–60 [杨霞, 陈陆, 王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(2): 55–60]
- Zhang XJ, Fang H, Chen CZ, *et al.* Studies on characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Flounderacida* subsp. Nov. from diseased stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(1): 51–60 [张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 石鲈(*Kareius bicoloratus* L.)源杀鲑气单胞菌杀鲈亚种生物学性状的研究. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 51–60]
- Zhang XL, *et al.* *Aquatic animal health in China*, 2017. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [张显良, 等. 2017年中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2018]

(编辑 马璀艳)

Sequencing and Phylogenetic Analysis of the 16S rRNA Genes of Bacterial Strains Isolated from Diseased Flatfish

LAN Xin^{1,2}, LI Jie³, LI Guiyang³, XIAO Peng¹, MO Zhaolan³①

(1. *Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266071; 2. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049; 3. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao* 266071)

Abstract Flatfish are the major industrial aquaculture marine fish species bred in North China. During the culturing process, members of this species are exposed to infection from a variety of pathogens. Diseases caused by bacterial pathogens are the major cause of harm to cultured flatfish in China. To investigate the bacterial pathogens that affect flatfish, we focused on 124 strains isolated from organs of diseased flatfish in Shandong, Jiangsu, Hebei, Tianjin and other similar places between 1999 and 2012. The 16S rRNA gene of the isolates was sequenced, analyzed using BLAST (GenBank), and subjected to phylogenetic analysis by using Mega 5.05. The results identified 66.90% of isolates as *Vibrio* (83 strains), 8.90% as *Aeromonas* (11 strains), 3.20% as *Edwardsiella* (4 strains), and other 15 genera (26 strains). According to the phylogenetic tree, 66 strains were identified as 16 species; the dominant species were *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. splendidus*, *A. allosaccharophila*, *A. salmonicida*, and *E. tarda*. To evaluate the pathogenicity of isolates, the virulence of *V. anguillarum* and *E. tarda* strains isolated from diseased fish was further determined by experimental infection based on the 50% lethal dose (LD₅₀) in turbot (*Scophthalmus maximus*). The results showed that seven *V. anguillarum* strains and three *E. tarda* strains were pathogenic to fish. The LD₅₀ values were 10^{5.1} to 10^{6.8} CFU/fish for pathogenic *V. anguillarum* and 10^{3.4} to 10^{4.1} CFU/fish for pathogenic *E. tarda*. There were also two strains of *V. anguillarum* and one strain of *E. tarda* that showed low virulence to turbot, with an LD₅₀ higher than 10⁷ CFU/fish. The presented results provide significant information to ascertain the bacterial pathogens of flatfish, which is important for establishing strategies for the epidemiology, monitoring, and control of bacterial diseases.

Key words Flatfish; Pathogen; 16S rRNA gene; Phylogenetic analysis; Identification

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190704001

http://www.yykxjz.cn/

袁雪梅, 吕孙建, 施伟达, 杭小英, 刘莉, 吴颖蕾. 大口黑鲈弹状病毒的分离培养及其卵黄抗体的制备. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 151-157
Yuan XM, Lv SJ, Shi WD, Hang XY, Liu L, Wu YL. Isolation and egg-yolk antibody preparation of *Micropterus salmoides* rhabdovirus. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 151-157

大口黑鲈弹状病毒的分离培养 及其卵黄抗体的制备*



袁雪梅 吕孙建 施伟达 杭小英 刘莉^① 吴颖蕾

(农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养
重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要 本研究从爆发性死亡的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)鱼苗病样中分离培养 1 株大口黑鲈弹状病毒(*M. salmoides* rhabdovirus, MSRV)毒株, 采用甲醛灭活大口黑鲈弹状病毒, 制备佐剂灭活疫苗, 免疫产蛋鸡, 收集高免蛋, 制备 MSRV 卵黄抗体, 测定其效价、中和效果及对病毒复制和宿主细胞内凝集素基因(*intelectin*)表达的影响。结果显示, 成功利用草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)卵巢细胞株 CO 细胞分离培养大口黑鲈鱼弹状病毒, 并用于佐剂灭活疫苗的制备; MSRV 佐剂灭活疫苗免疫蛋鸡, 成功获得 MRSV 的卵黄抗体, 效价为 1:256, 稀释度为 1:64 时的中和病毒的作用最为明显, 中和作用率达 38.29%以上, 病毒核酸拷贝数明显降低。同时, 还可上调细胞内凝集素的表达。研究表明, 特异性卵黄抗体对大口黑鲈弹状病毒具有明显的中和效果, 为后续卵黄抗体作为免疫制剂的应用奠定了基础。

关键词 大口黑鲈; 弹状病毒; 卵黄抗体; 病毒中和

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)03-0151-07

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈, 原产于美国加利福尼亚州密西西比河水系, 肉质鲜美、在市场上很受欢迎, 加之具有生长迅速、易起捕、适温范围广、耐低氧能力强等特点, 一直深受养殖户的欢迎(樊佳佳等, 2019)。我国年产量超过 30 万 t, 是全球产量最高的国家(邓国成等, 2011)。近年来, 大口黑鲈已逐渐成为跑道式循环水养殖的主要养殖品种。但无论是传统的高密度养殖, 还是跑道式集中圈养模式, 都存在着疫病快速传播的潜在危险。其中, 病毒性病害的爆发, 常造成严重的经济损失。弹状病

毒(Rhabdovirus)为一种单股不分节段的负链 RNA 病毒, 种类较多, 包括 175 种以上的成员, 可感染脊椎动物、无脊椎动物和植物。鱼类弹状病毒因宿主广、毒株种类多、毒力强等特点, 对各种淡水和海水鱼造成了严重危害(Zhang *et al.*, 2018)。近几年, 在大口黑鲈苗种培育及养殖早期流行一种可引起大口黑鲈鱼苗大量死亡的疾病, 给鲈鱼养殖业带来巨大的经济损失。雷燕等(2015)结合流行病学调查及分子生物学鉴定, 确认引起广东省佛山市一大口黑鲈养殖池塘鱼种爆发性死亡的疾病为弹状病毒病, 其病原为弹状病

* 湖州市自然科学基金项目(2018YZ09)和浙江省省属科研院所扶持专项项目(2019YSZX002)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Huzhou City of China (2018YZ09), and Scientific Research Institution Support Special Project of Zhejiang Province (2019YSZX002)]. 袁雪梅, E-mail: 179506607@qq.com

① 通讯作者: 刘莉, 研究员, E-mail: liuli6655@hotmail.com

收稿日期: 2019-07-04, 收修改稿日期: 2019-07-30

毒。寻找敏感细胞是病毒体外培养的关键,而病毒的体外培养又是后续研究的基础。目前,已报道的用于大口黑鲈弹状病毒体外培养的细胞仅有大口黑鲈皮肤(LBS)细胞一种(Gao *et al.*, 2018)。

卵黄抗体(IgY)是指从免疫禽蛋中提取出的针对特定抗原的抗体,具有化学性质稳定、产量高、成本低、特异性强且无任何毒副作用的优势;由于与鱼类种系发生距离远,不会发生交叉血清学反应。卵黄抗体对某些动物疫病具有明显治疗和紧急预防作用;纯化后的卵黄抗体还可用于病毒的检测(陈斌等, 2005)。卵黄抗体应用于水生动物疾病的预防和治疗屡见报道。特异性卵黄抗体可较好地保护感染白斑综合症病毒的斑节对虾,显著提高斑节对虾的存活率(Kumaran *et al.*, 2010),用抗溶藻弧菌卵黄抗体拌喂感染溶藻弧菌的鲍鱼,可显著降低鲍鱼的死亡率(Wu *et al.*, 2011)。Sunwoo 等(2010)发现,特异性卵黄抗体能抑制大肠杆菌(*Escherichia coli* 987P)的生长。程娜(2014)研究发现,抗鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)卵黄抗体可明显提高感染鳃利斯顿氏菌香鱼(*Plecoglossus altivelis*)的存活率。由于大口黑鲈弹状病毒主要危害5 cm 以下的鲈鱼苗种,而这一阶段的鱼苗免疫系统发育不完善,主动免疫预防难以实现,加之发病急,病程短,以抗体作为被动免疫的预防措施更具有生产实践意义。本研究在成功分离培养大口黑鲈弹状病毒的基础上,针对大口黑鲈病毒制备卵黄抗体,研究其对大口黑鲈弹状病毒的中和作用,为大口黑鲈弹状病毒病的防治与诊断试剂的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞及实验动物

弹状病毒感染的大口黑鲈鱼苗病样采自浙江省湖州市某苗种场,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)卵巢细胞株(CO)由实验室保存。180日龄的健康蛋鸡由浙江湖州杨家埠鸡场提供,10只进行免疫,5只用作阴性对照。

1.2 主要试剂

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司(美国);细胞培养基 M199、胎牛血清及双抗均购自 GIBCO 公司;TRIZOL 总 RNA 提取试剂、Ex Taq DNA 聚合酶和 pGEM-T 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本);反转录和定量 PCR 试剂购自 TOYOBO 公司(日本);2×Taq PCR Master Mix 购自天根生化科技(北京)有限公司;辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗鸡抗体、TMB 显色试剂盒、MTT 细胞增殖和细胞毒性

检测试剂盒均购自碧云天生物技术公司(上海);引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂均为国产分析纯级试剂。

1.3 大口黑鲈感染弹状病毒检测及分离培养

取 10 尾患病大口黑鲈鱼苗置于冰上研磨,采用 TRIZOL 试剂提取组织总 RNA,参考雷燕等(2015)的方法,进行 RT-PCR 检测,扩增产物送苏州金唯智生物科技有限公司测序。经 PCR 检测后,取感染 MSR/V 的大口黑鲈鱼苗,匀浆后离心,取上清液,过滤除菌,滤液即为粗提的病毒原液。采用草鱼卵巢细胞株 CO 细胞作为大口黑鲈弹状病毒的敏感细胞,以含 10%胎牛血清的 M199 完全培养基培养 CO 细胞至汇片 60%~80%时,上述病毒粗提液用 M199 基础培养基 1:5 倍稀释后感染细胞,吸附 1.5~2 h 后,吸出未吸附病毒液,添加 M199 维持液继续培养 48~72 h,出现细胞病变 50%以上,收获病毒的细胞培养物,置于 -80℃ 保存备用。此外,根据已公布的 MSR/V 核酸序列(GenBank No: MK397811)设计引物,扩增特异性产物构建质粒,用于制备定量检测病毒核酸的标准品。同时,设计用于荧光定量 PCR 检测病毒核酸、内凝集素(*intelectin*)和内参的引物。所用引物具体信息见表 1。

1.4 大口黑鲈弹状病毒灭活疫苗的制备及免疫

病毒的细胞培养物冻融、离心,取上清液,加入甲醛使终浓度为 0.5%,密封后置于 65℃ 灭活 2 h,每 30 min 摇匀 1 次。冷却至室温,加入青霉素和链霉素(双抗浓度为 100 μg/ml),分装封口,4℃ 保存。将灭活的大口黑鲈弹状病毒分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂按 1:1 体积比混合,完全乳化后得弗氏完全佐剂乳化疫苗和弗氏不完全佐剂乳化疫苗,4℃ 保存备用。

用上述制备的佐剂乳化疫苗采用胸肌多点注射的方式,免疫 180~190 日龄的产蛋鸡。分别于 1、7、14 和 28 d 免疫,共免疫 4 次,每次免疫 1 ml/只。第 1 次采用弗氏完全佐剂乳化疫苗免疫,其他时间点用弗氏不完全佐剂乳化疫苗免疫。免疫 5 周后,从第 35 天开始收集鸡蛋,每天收集免疫鸡所产的鸡蛋,总共收集 20 d。同时,以注射 PBS 作为对照组,免疫程序与实验组相同。

1.5 卵黄抗体的制备及效价测定

收集的鸡蛋经表面消毒,在无菌条件下取蛋黄倒入烧杯中,加入 8 倍体积的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.2),搅拌 10 min,4℃ 沉淀过夜,吸取上清液,10000 r/min

表1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Amplicon size (bp)	用途 Purpose
MSRV-F	ATAAGGGTAGTTGAGAAGAAG	55	372	PCR
MSRV-R	CTTCTTGTTGCTCTTCTTAAA			
MSRV-F1	CTGCTGTGTTAATTTTGCTCTTGGTCCGA TTTTTCGGAGCCTTACCCGCTGTTTGTTCGG	58	1386	标准质粒 制备
MSRV-R1	GATGGTGGTGGTGGTGGCTGCCGC TCACTCCAGTTCCCACC			
MSRV-F2	AGCAGCATCACCAGCCACATC	58	185	Real-time PCR
MSRV-R2	CGTCCGTCGCTTGACTCAATT			
Intelectin-F	AGGCGGATGGACTCTTGTTGG	58	109	
Intelectin-R	TTCAGGCAGGTTCTGGTCGTT			
β -actin-F	CATCCTCCGCTGGACTTGGCT	58	257	
β -actin-R	CCTCTGGGCACCTGAACCTCT			

离心 15 min, 收集上清液, 加入饱和硫酸铵沉淀抗体蛋白, 12000 r/min 离心, 收集沉淀, 超纯水重悬, 透析去除卵黄抗体中残留的盐离子。采用 SDS-PAGE 检测卵黄抗体纯度, BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。

采用 ELISA 测定卵黄抗体效价。首先, 制备 MSRV 蛋白, 在 MSRV 病毒液中加入适量 RIPA (含 1 mmol/L PMSF), 混匀后, 置于冰上 30 min, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液即为病毒蛋白。病毒蛋白用 PBS 稀释后铺板, 每孔 100 μ l, 4°C 包被过夜; 之后, PBST 洗涤 3 次后, 加入倍比稀释的卵黄抗体, 每孔 100 μ l, 37°C 孵育 1 h, 洗涤 3 次后, 再加入羊抗鸡二抗, 于 37°C 孵育 1 h, 洗涤 3 次后, 加 TMB 底物显色, 最后, 加入 10% 硫酸溶液终止反应。

1.6 卵黄抗体的抗病毒效果及其对内凝集素基因 (*intelectin*) 表达的影响

1.6.1 卵黄抗体对病毒的中和作用 首先, 测定病毒半数细胞感染量 (TCID₅₀), 即 MSRV 病毒原液进行 10 倍稀释, 分别接种 CO 细胞, 每个稀释度设 8 个重复。24°C 培养 96 h, 记录病变细胞数和未病变细胞数, 按 Reed-Muech 法计算 TCID₅₀。

以每孔 100 个 TCID₅₀ 病毒量与倍比稀释的卵黄抗体混匀, 24°C 作用 2 h 后接种细胞, 同时, 设正常细胞孔对照及 100 TCID₅₀/孔、0.1 TCID₅₀/孔的病毒对照, 当 100 TCID₅₀/孔全部病变, 而 0.1 TCID₅₀/孔中无病变时, 用 MTT 法检测细胞存活量, 按公式计算中和作用率:

作用率(%)=[(给药组平均值-病毒对照平均值)/
(正常细胞对照组平均值-病毒对照平均值)] \times 100%

1.6.2 卵黄抗体对弹状病毒复制的影响 参考刘珍等(2016)的方法制备标准品, 使用引物 MSRV-F1/MSRV-R1 扩增病毒核酸特异性片段, PCR 产物经纯化后与载体 pGEM-T 连接, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 提取质粒, 并测序验证。测定重组质粒 DNA 浓度, 换算成拷贝数作为标准品原液。以 10 倍梯度稀释的标准质粒为模板, MSRV-F2 和 MSRV-R2 为引物, 进行 Real-time PCR 扩增。反应参数: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 19 s, 共 40 个循环。得出计算病毒核酸拷贝数的标准曲线。

卵黄抗体与等体积的病毒液混合, 24°C 作用 2 h 后接种细胞, 同时, 设置病毒对照和正常细胞对照。于接种后第 6、12、24、48 和 72 小时收集细胞病毒液, TRIZOL 提取总 RNA, 反转录参照 TOYOBO 公司的“ReverTra Ace qPCR RT Master Mix”试剂盒合成 cDNA。使用引物 MSRV-F2/MSRV-R2 对样品 cDNA 进行 Real-time PCR 扩增, 通过标准曲线换算得到样品中病毒 RNA 的拷贝数。

1.6.3 卵黄抗体对 CO 细胞中 *intelectin* 表达的影响 按照 1.6.2 所述步骤处理样品, 得到的样品 cDNA 分别用引物 *intelectin*-F/*intelectin*-R 和 β -actin-F/ β -actin-R 进行 Real-time PCR 扩增, 反应程序同 1.6.2。得到的数据利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算实验组 *intelectin* 的相对表达量。

1.7 统计分析

采用软件 SPSS 16.0 的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对各组数据进行差异分析, $P < 0.05$ 为显著性

差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

2.1 弹状病毒核酸检测及分离培养

患病大口黑鲈鱼苗的主要症状表现为停止摄食, 水面漫游, 打转, 体色发黑, 鳃和腹部充血(图 1a)。采用特异性引物对患病鱼组织核酸进行 PCR 检测, 扩增片段大小与预期 372 bp 相符(图 1b)。

利用患病鱼组织制备的病毒粗提液接种 CO 细胞后, 24 h 开始出现细胞病变, 表现为细胞收缩变圆, 聚集成团, 出现明显的空斑(图 2)。细胞培养物经 RT-PCR 检测, 同样可扩增出大口黑鲈弹状病毒的特异性片段。

2.2 卵黄抗体制备及浓度、纯度和效价测定

收集免疫后的鸡蛋蛋黄, 纯化后得到的卵黄抗体浓度为 1.8 mg/ml, 经 SDS-PAGE 检测, 从图 3 可以看出, 在 50~75 kDa 和 25~37 kDa 之间有明显的条带, 与卵黄抗体轻链和重链大小预期相符(He *et al.*, 2011)。ELISA 测得卵黄抗体的效价为 1 : 256。

2.3 卵黄抗体的中和作用及对病毒复制的影响

病毒 TCID₅₀ 经测定为 $10^{4.12}$ 。卵黄抗体倍比稀释后, 与病毒作用后接种 CO 细胞, 用 MTT 法检测卵黄抗体中和作用率, 结果显示, 1/64 倍稀释的卵黄抗体对病毒的中和作用最为明显, 中和作用率为 38.29% 以上。

为定量测定病毒复制的核酸拷贝数, 制备了荧光

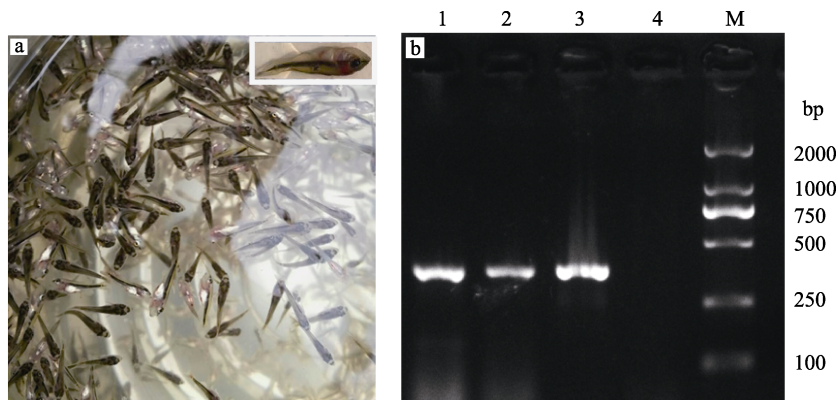


图 1 大口黑鲈弹状病毒的临床症状(a)与 PCR 检测结果(b)

Fig. 1 Clinical symptoms (a) and MSRV PCR products (b) of diseased *M. salmoides*

1~3: 病鱼样品 Diseased *M. salmoide* samples; 4: 阴性对照 Negative control; M: DNA Marker DL2000

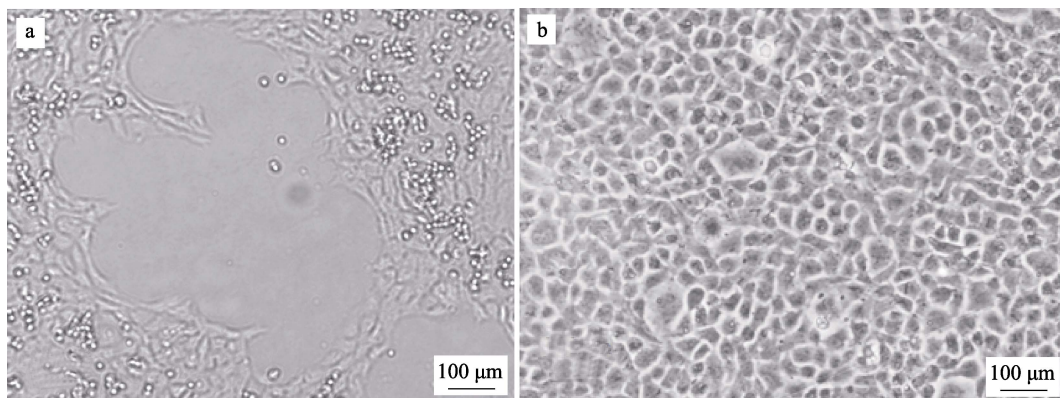


图 2 大口黑鲈弹状病毒在草鱼卵巢细胞株(CO)上的病变情况

Fig. 2 Cytopathic effect of CO cell monolayer inoculated with diseased fish tissue homogenate filtrate

a: 接种病毒 2 d 的 CO 细胞; b: 正常的 CO 细胞

a: Cytopathic effect of CO cells 2 days post-infection; b: Normal CO cell monolayer

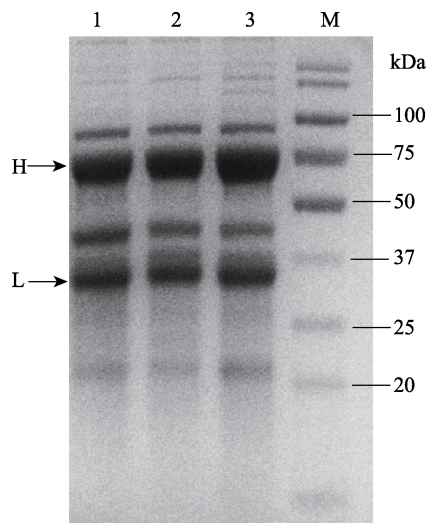


图 3 卵黄抗体的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of IgY

1~3: IgY; M: 蛋白分子量标准 Protein maker

定量 PCR 的标准曲线, 其 R^2 为 0.9983, 引物的扩增效率为 103%。在此基础上, 应用 Real-time PCR 方法检测中和实验组及对照组的病毒复制情况, 结果显示, 病毒与卵黄抗体中和作用后接种 CO 细胞, 于 6、12、24、48 和 72 h 5 个时间点收集的细胞培养物, 测得的病毒 RNA 拷贝数均显著低于病毒对照组 (图 4), 其中, 第 12 小时中和实验组病毒拷贝数仅为病毒对照组的 0.003 倍。

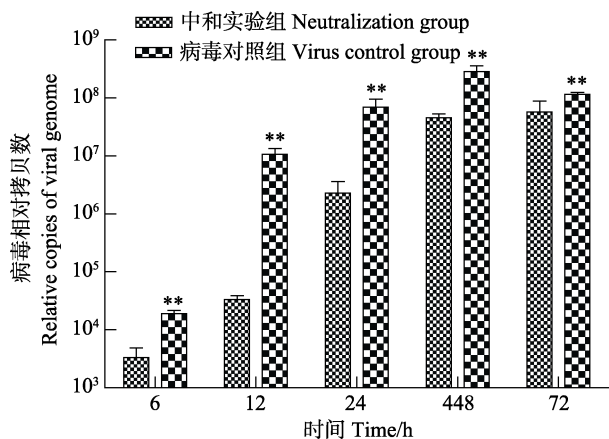


图 4 卵黄抗体对弹状病毒复制的影响

Fig. 4 Neutralization of relative virus copies of MSRV using egg-yolk antibody

**表示差异极显著($P < 0.01$), 下同

** indicate highly significant differences, the same as below

2.4 卵黄抗体对 CO 细胞 *intelectin* 基因表达的影响

采用 Real-time PCR 方法检测中和实验组及细胞对照组不同时间点的 CO 细胞中 *intelectin* 基因的表达

水平。结果显示, 中和实验组 *intelectin* 基因的表达量在 5 个时间点均高于细胞对照组, 其中, 72 h 时, 中和实验组 *intelectin* 的表达量达到细胞对照组的 10 倍 (图 5)。

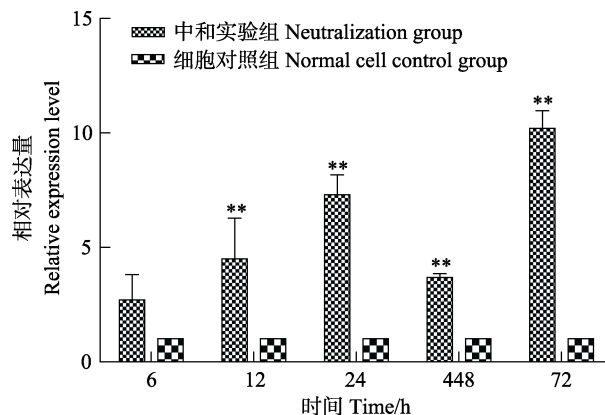


图 5 卵黄抗体对 CO 细胞 *intelectin* 表达的影响

Fig. 5 Relative expression of *intelectin* mRNA of MSRV challenged CO neutralized with egg-yolk antibody

3 讨论

近年来, 大口黑鲈弹状病毒在大口黑鲈苗种培育及养殖早期流行, 严重时, 80%池塘发病, 死亡率高, 短时间内可高达 90%, 经济损失巨大。研究利用 CO 细胞分离培养大口黑鲈弹状病毒, 得到了较好的效果, 病毒能在 CO 细胞上稳定传代, 利用荧光定量 PCR 测定 CO 细胞培养的病毒 RNA 拷贝数, 可达 10^9 copies/ml 以上, 收获的细胞病毒液经浸泡感染大口黑鲈鱼苗, 能复制出与自然发病鱼相似的症状。目前, 用于大口黑鲈弹状病毒体外培养的细胞鲜有报道。Gao 等(2018)利用大口黑鲈皮肤(LBS)细胞培养 MSRV, 可产生明显的细胞病变效应, 应用 Real-time PCR 方法检测, 感染细胞 24 h 时病毒 RNA 相对表达量为感染 6 h 时的 70 多倍。在应用 CO 细胞感染 MSRV 病毒时, 检测到感染 24 h 时病毒 RNA 相对表达量为 6 h 时的 800 倍以上, 说明, CO 细胞较 LBS 细胞更适合 MSRV 的复制增殖。

卵黄抗体因具备无毒副作用和特异性高等特点, 被广泛用于人和动物的疾病控制和治疗(Zhen *et al*, 2008)。本研究发现, 大口黑鲈弹状病毒与特异性卵黄抗体作用后, 在 CO 细胞中的复制水平明显降低, 说明, 特异性卵黄抗体对大口黑鲈弹状病毒具有中和作用, 但其抗体效价低于已报道的抗病毒卵黄抗体水平。王建梅等(2012)用盐析法粗制备的抗犬瘟热卵黄抗体, 其效价最高可达 1 : 819。张述斌等(2013)

建立了一种用水稀释反复冻溶法、氯仿萃取法与冷乙醇沉淀法相互结合提取鸡新城疫卵黄抗体的方法, 效价可达到 1 : 2048。雷丹等(2018)应用水稀释法提取抗猪流行性腹泻病毒(PEDV)变异株卵黄抗体, 其效价为 1 : 12800。分析本研究中卵黄抗体效价低的原因, 可能是免疫程序和抗体提取纯化方法不够理想, 还需进一步优化。此外, 本研究还发现, 5 个时间点中和实验组病毒 RNA 拷贝数较病毒对照组下降水平不一, 其中, 12 h 时下降 1000 倍, 表明卵黄抗体除了可以直接中和病毒, 还可能在病毒复制增殖过程中发挥作用, 其机制有待进一步研究。

内凝集素作为凝集素家族的一员, 是一种新发现的分泌型凝集素。本研究中和实验组细胞的 *intelectin* 表达水平较正常细胞组有所升高, 提示, 卵黄抗体在免疫防御或应答方面发挥作用。李媛(2016)研究发现, 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)特异性 IgY 能够增强大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)头肾巨噬细胞的吞噬活性, 刺激大菱鲂非特异性免疫相关酶(溶菌酶、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶)的产生, 还能增强这些酶的活性, 也说明, 卵黄抗体具有刺激和调节机体免疫功能的作用。目前, 水生动物有关 *intelectin* 的报道很少, Chang 等(2007)报道, 在草鱼体内经脂多糖诱导后 *intelectin* 表达水平显著上调。Lin 等(2009)报道, 在感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的肝脏中 *intelectin* 表达水平上调。本实验室前期研究发现, 草鱼在接种草鱼出血病灭活苗早期, 肾脏中 *intelectin* 基因表达显著上调(奕志娟等, 2015)。Chen 等(2018)报道, 斑马鱼(*Danio rerio*) *intelectin* 基因 *zITLN1*、*zITLN2* 和 *zITLN3* 可以识别细菌细胞壁的主要成分, 从而能结合细菌并引发细菌的凝集。目前, 尚未见卵黄抗体刺激 *intelectin* 基因上调的相关报道, 其上调与病毒复制的相关性及其机理有待进一步研究。

本研究成功建立了大口黑鲈弹状病毒的体外培养和卵黄抗体制备方法, 明确了卵黄抗体的抗病毒中和作用, 为进一步开发用于弹状病毒免疫防治的免疫制剂奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- Chang MX, Nie P. *Intelectin* gene from the grass carp *Ctenopharyngodon idella*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 128–140
- Chen B, Yang ZH. Mechanism and prospects of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine*, 2005, 30(1): 9–10 [陈斌, 杨志华. 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的作用机理及应用前景. 浙江畜牧兽医, 2005, 30(1): 9–10]
- Chen L, Yan J, Shi J, *et al.* Zebrafish *intelectin 1 (zITLN1)* plays a role in the innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 83: 96–103
- Cheng N. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Listonella anguillarum* infection in sweetfish (*Plecoglossus altivelis*). Master's Thesis of Ningbo University, 2014 [程娜. 抗鳃利斯顿氏菌鸡卵黄抗体对致病香鱼保护作用的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Deng GC, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Diseases and prevention of largemouth bass cultured in ponds. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(18): 102–103, 137 [邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈池塘养殖常见病及其防治. 广东农业科学, 2011, 38(18): 102–103, 137]
- Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Analysis on genetic diversity of three breeding populations of largemouth bass using formulated feeds. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 57–64 [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 57–64]
- Gao EB, Chen GF. *Micropterus salmoides* rhabdovirus (MSRV) infection induced apoptosis and activated interferon signaling pathway in largemouth bass skin cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 161–166
- He YN, Bjorkman PJ. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(30): 12431–12436
- Kumaran T, Michaelbabu M, Selvaraj T, *et al.* Production of anti WSSV IgY edible antibody using herbal immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its immunological influence against WSSV infection in *Penaeus monodon*. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2010, 2(1): 1–5
- Lei D, Li AQ, Luo SX, *et al.* Preparation, purification and activity factors analysis of IgY against variant of porcine epidemic diarrhea virus. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 45(8): 2293–2302 [雷丹, 李安琪, 罗素贤, 等. 抗猪流行性腹泻病毒变异株卵黄抗体的制备、纯化及其活性影响因素的研究. 中国畜牧兽医, 2018, 45(8): 2293–2302]
- Lei Y, Qi RR, Cui LB, *et al.* Diagnosis of rhabdovirus disease in juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(3): 305–308 [雷燕, 戚瑞荣, 崔龙波, 等. 大口黑鲈鱼种弹状病毒病的诊断. 大连海洋大学学报, 2015, 30(3): 305–308]
- Li Y. Passive protective effect of specific egg yolk antibodies against *Edwardsiella tarda* in turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2016 [李媛. 迟缓爱德华氏菌特异性卵黄抗体对大菱鲈的被动保护研究. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Lin B, Cao Z, Su P, *et al.* Characterization and comparative analyses of zebrafish *intelectins*: Highly conserved sequences, diversified structures and functions. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 396–405
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with

- different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Sunwoo HH, Lee EN, Gujral N, *et al.* Growth inhibition of *Escherichia coli* 987P by neutralizing IgY antibodies. *Open Immunology Journal*, 2010, 3: 1–8
- Wang JM, Yang J, Luo JF, *et al.* Preparation and titer detection of immunoglobulin of yolk against canine distemper. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2012, 30(3): 327–332 [王建梅, 杨娇, 罗继芬, 等. 抗犬瘟热高免卵黄抗体的制备及效价的检测. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(3): 327–332]
- Wu CJ, Wang H, Chan YL, *et al.* Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(4–5): 1042–1048
- Yi ZJ, Hao GJ, Yuan XM, *et al.* Inactivated vaccine for hemorrhage of grass carp up-regulates the expressions of major immune-related genes in spleen of grass carp. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(5): 177–181 [奕志娟, 郝贵杰, 袁雪梅, 等. 草鱼出血病灭活疫苗上调草鱼脾细胞主要免疫分子的表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(5): 177–181]
- Zhang LJ, Li NQ, Lin Q, *et al.* An avirulent *Micropterus salmoides* rhabdovirus vaccine candidate protects Chinese perch against rhabdovirus infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 474–480
- Zhang SB, Xue ZL, Zhang HB, *et al.* Study on extraction of chicken ND-IgY combining with water dilution repeated freezing and dissolving method, chloroform extraction and cold ethanol precipitation. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 32(1): 11–12, 14 [张述斌, 薛掌林, 张洪波, 等. 利用水稀释反复冻溶法、氯仿萃取法与冷乙醇沉淀法相结合进行鸡新城疫卵黄抗体提取的试验研究. *畜牧兽医杂志*, 2013, 32(1): 11–12, 14]
- Zhen Y, Jin L, Guo J, *et al.* Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1–2): 126–133

(编辑 马瑾艳)

Isolation and Egg-Yolk Antibody Preparation of *Micropterus salmoides* Rhabdovirus

YUAN Xuemei, LV Sunjian, SHI Weida, HANG Xiaoying, LIU Li^①, WU Yinglei

(Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract The largemouth bass *Micropterus salmoides* has been widely cultured in China due to its considerable economic value. Recently, the species suffered from serious *M. salmoides* rhabdovirus (MSRV) disease during the juvenile phase, particularly in aquaculture conditions. In this study, a strain of *M. salmoides* rhabdovirus isolated from dying juvenile fish was cultured in a grass carp ovary (CO) cell line. To take advantage of passive immunity, we explored anti-MSRV immunoglobulin Y (IgY) by discontinuously immunization on laying hens with a formalin-killed vaccine of MSRV. The antibody was purified by saturated ammonium sulfate, and displayed virus resistance with an ELISA antibody titer of 1 : 256 detected. The bioactivity of anti-MSRV IgY was tested simultaneously after being added to a CO cell line incubated with MSRV. This antibody showed antiviral activity, with 38.29% of neutralizing effectiveness detected at a dilution of 1 : 64. The RNA copies of MSRV in the test group were clearly fewer in number compared with those of members of a control group. By the florescent real-time quantitative PCR, the intracellular lectin experienced significantly up-regulated pick-up to nearly 10-fold at 72 h compared with the control group. In conclusion, we successfully isolated a strain of MRSV and cultured it in a CO cell line. Anti-MSRV IgY prepared with vaccinations of inactive virus displayed antiviral activity in this study, laying a foundation for the application of yolk antibodies as an immune preparation.

Key words *Micropterus salmoides*; Rhabdovirus; Egg-yolk antibody; Virus neutralization

① Corresponding author: LIU Li, E-mail: liuli6655@hotmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190326001

http://www.yykxjz.cn/

项子龙, 刘长琳, 张金勇, 胡鹏, 何暮春, 柳淑芳, 庄志猛, 薛同明. 金乌贼端粒酶逆转录酶基因鉴定和组织差异表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 158-164

Xiang ZL, Liu CL, Zhang JY, Hu P, He MC, Liu SF, Zhuang ZM, Xue TM. Gene identification and tissue differential expression analysis of *Sepia esculenta* telomerase reverse transcriptase. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 158-164

金乌贼端粒酶逆转录酶基因鉴定和 组织差异表达分析*



项子龙^{1,2,3} 刘长琳² 张金勇^{2,3,4} 胡 鹏^{2,3}
何暮春⁵ 柳淑芳^{2,3①} 庄志猛² 薛同明⁶

(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. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 5. 中国海洋大学生命学院 青岛 266003;

6. 青岛金沙滩水产开发有限公司 青岛 266000)

摘要 本研究从金乌贼(*Sepia esculenta*)转录组中筛选出疑似 TERT (Telomerase reverse transcriptase) 基因序列,通过系统进化和同源序列分析,鉴定出该基因为金乌贼 TERT 基因,序列长度为 2415 bp。采用实时荧光定量 PCR 技术,检测和分析金乌贼 TERT 基因在不同组织、不同发育时期和不同性别的相对表达量差异。结果显示,与产卵期相比,濒死期的心、肝、胰、鳃、性腺、食道神经团(除去视腺和视叶后的脑组织)等 6 个组织的 TERT 基因表达量呈显著下调趋势,推测与濒死期的器官组织分裂和增殖能力下降有关。TERT 基因在金乌贼不同组织中具有明显的组织特异性,说明金乌贼各组织器官的衰老状态并不一致。本研究结果可为深入研究头足类生殖与衰老等生命过程的端粒酶调控机制提供基础数据。

关键词 金乌贼; TERT 基因; qRT-PCR; 系统进化树; 基因差异表达分析

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0158-07

端粒是真核细胞线性染色体末端的一段特殊 DNA-蛋白复合物,使染色体的天然末端有别于一般性的损伤断端,对维持细胞正常生命活动的生理内稳态起关键作用(Moyzis *et al*, 1988; Verdun *et al*, 2007; Deng *et al*, 2007; Mergny *et al*, 2002)。衰老的端粒学

说(Telomere theory)认为端粒在细胞老化过程中起重要作用,每次细胞分裂都会因 DNA 聚合酶功能障碍而不能完全复制它们的染色体,端粒 DNA 序列长度逐渐缩短,最终造成细胞衰老死亡。端粒决定了细胞分裂的次数,故端粒又被称作生命体的“分子时钟”,

* 国家自然科学基金项目(31672645)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项(20603022016001)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672645), Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016001), and Taishan Scholar Project, Shandong Province]. 项子龙, E-mail: xiangzilong0818@163.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-26, 收修改稿日期: 2019-04-21

端粒损耗的速度则是衡量“生物衰老”的方法之一 (Spivak *et al*, 2016)。端粒酶(Telomerase)能延长端粒重复序列, 维持染色体稳定, 确保细胞复制能力 (Wright *et al*, 1996)。因此, 端粒酶具有保持端粒稳定、染色体完整、细胞活性和增殖能力等重要作用。端粒酶由端粒酶模板 RNA(Telomerase RNA, TR)、端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶相关蛋白构成(Wright *et al*, 1995)。TERT 基因是端粒酶起作用的关键结构和主要调控亚单位, 通过逆转录端粒酶 RNA 模板序列, 合成端粒 DNA 重复序列并添加到染色体末端, 从而弥补了端粒在细胞分裂中的消耗。研究表明, 在正常细胞中导入 TERT 基因载体并表达, 能够促进细胞生长, 延长细胞寿命, 这些现象表明端粒酶在阻止细胞衰老的过程中具有重要作用(Bodnar *et al*, 1998)。

金乌贼 (*Sepia esculenta*) 是头足类鞘亚纲 (Coleoidea) 的代表种, 一年生且终生仅繁殖 1 次, 生殖后快速死亡, 属于一次生殖类型。这种在短时间内发生的生殖和死亡现象可以作为研究生殖、衰老和死亡之间错综复杂关系的切入点。依据衰老的端粒学说, 金乌贼生殖后快速死亡是否与端粒 DNA 序列长度缩短有关? 生殖前后至自然死亡过程中, TERT 基因表达有什么规律? TERT 基因表达量是否存在组织差异性和性别差异? 为了回答这些问题, 本研究从课题组前期获得的金乌贼卵巢转录组数据(Zhang *et al*, 2019)中筛选出 TERT 基因, 并选取了金乌贼的生长期(Growth Stage, GS)、产卵期(Spawning Stage, SS)、濒死期(Aging Stage, AS) 3 个关键生长发育阶段样品, 运用 qRT-PCR 技术分析不同发育阶段、不同组

织和不同性别的 TERT 基因表达规律, 为揭示金乌贼生殖与衰老的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金乌贼野生幼体于 2016 年 9 月捕捞自山东青岛沿海, 经过近 1 年人工培育性成熟并自然交配, 于 2017 年 7 月获得受精卵。受精卵在水温 19℃~20℃、盐度 29~30 条件下孵化 30 d 后, 获得初孵幼体。幼体和成体培育水温为 20℃~23℃, 盐度为 29~30, 0~30 日龄投喂活体糠虾(*Opossum shrimp*), 30 日龄后投喂活体小虾和小鱼, 每天投喂 2 次, 每次投饵至饱食。从 2017 年 7 月~2018 年 7 月跟踪采集金乌贼样品。选取生长期、产卵期、濒死期 3 个关键时期的金乌贼样品, 每个时期雌、雄各取 3 只, 共采集 18 只金乌贼的肝脏、胰脏、性腺、鳃、食道上神经团(除去视腺和视叶后的脑组织)、心脏等组织样品, 将 18 组样品液氮速冻后, 随即转入-80℃冰箱冻存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 TERT 基因的筛选与鉴定 从课题组前期获得的金乌贼卵巢转录组数据(Zhang *et al*, 2019)中筛到疑似 TERT 基因片段序列信息。将疑似金乌贼 TERT 基因序列信息与 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载的已知物种 TERT 基因序列比对分析(表 1)。用 ClustalX 对所有序列进行比对排序并去除两端冗余序列, 保留共有序列 2415 bp。使用 MEGA 6.0 软件分析序列的核苷酸组成、变异位点数等, 采用

表 1 TERT 基因序列信息
Tab.1 TERT gene sequence information

物种 Species	分类 Type	序列长度 Sequence length (bp)	GenBank No.
金乌贼 <i>Sepia esculenta</i>	软体动物门 头足纲 十腕目	2415	本研究 This study
加州双斑蛸 <i>Octopus bimaculoides</i>	软体动物门 头足纲 八腕目	30352	NW014724770.1
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	软体动物门 双壳纲 牡蛎目	3233	XM022469838.1
虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	软体动物门 双壳纲 海扇蛤目	6018	XM021523133.1
福寿螺 <i>Pomacea canaliculata</i>	软体动物门 腹足纲 中腹足目	5212	XM025238462.1
舌形贝 <i>Lingula anatina</i>	腕足动物门 无铰纲 舌形贝目	3553	XM013525154.2
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	脊索动物门 硬骨鱼纲 鲤形目	3530	EF202140.1
地松鼠 <i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	脊索动物门 哺乳纲 啮齿目	4311	XM005340748.2
太平洋斑纹海豚 <i>agenorhynchus obliquidens</i>	脊索动物门 哺乳纲 鲸目	4090	XM027125435.1
食蟹猕猴 <i>Macaca fascicularis</i>	脊索动物门 哺乳纲 灵长目	4007	XM005556550.2
眼镜猴 <i>Carlito syrichta</i>	脊椎动物门 哺乳纲 灵长目	3246	XM021717883.1

邻接法(Neighbour-joining, NJ) 构建分子系统进化树, 经 1000 次重复抽样(Bootstraps)检测其置信度(图 1)。同时, 使用 DNAMAN 软件, 保留共有序列, 对金乌贼以及其相物种进行同源序列分析, 确定该序列与已知 TERT 基因的同源性。

1.2.2 RNA 提取与反转录 使用 TaKaRa™ MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。使用 NanoDrop2000 (Thermo)检测 RNA 浓度与纯度, 选择条带清晰纯度高 RNA 样品。

按照 Vazyme 公司 HiScript®II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒推荐反应体系, 以前期提取合格 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA。

1.2.3 引物设计 使用 Primer 5.0 设计 TERT 基因特异性扩增引物 QTERT1、QTERT2 和内参基因 18S 的特异性扩增引物 Q18S, 用于定量分析(表 2)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 本研究采用非特异性荧光标记 SYBR Green 对 TERT 基因在金乌贼各发育阶段的组织样品中进行相对荧光定量 PCR 检测。使用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统, TaKaRa™ TB Green Premix Ex Taq™ II 试剂盒, 反应体系 20 μ l; ROXII 0.4 μ l; 上游引物 0.4 mmol/L; 下游引物 0.8 mmol/L; TB Green 10 μ l; H₂O 6 μ l。使用

18S 作为 qPCR 内参基因。

反应条件为两步法 PCR 扩增标准程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环。

1.3 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TERT 基因的表达量。每个处理组的数据独立分析, 即同一个处理组内每个样品的 $\Delta\Delta C_t$ 值为该样品 ΔC_t 值减去组内最大 ΔC_t 值, 通过计算得出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值便可以估算在同一处理组内各个样品的相对表达量的差异。

分析结果均以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示, 并利用 SPSS 16.0 软件中的单因素方差(One-way ANOVA)分析 TERT mRNA 表达量在不同组织及各发育时期间的差异水平。使用 GraphPad Prism 5 软件绘制每个处理组相对表达量的差异图。

2 结果与分析

2.1 TERT 基因的筛选与鉴定

在 NJ 系统进化树中(图 1), 金乌贼的疑似 TERT 基因首先与同为头足纲的加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*)的 TERT 基因聚为一支, 自展支持率为

表 2 TERT 与内参基因 18S qRT-PCR 引物信息
Tab.2 qRT-PCR primer information of TERT and 18S

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')	引物长度 Primer length (bp)	产物大小 Product size (bp)
QTERT1F	GCAACATTTGGACTGAGGCTTTC	23	160
QTERT1R	GTCCCTGGCACATCTACATCCT	22	
QTERT2F	CCATGGTGTGGATTGTTGATTG	22	168
QTERT2R	GGGTCAGGTTACAGTTAGTATG	23	
18S F	CAGTGGCGGCTTAGTGTTGAC	22	100
18S R	AGTCCTTCTGGCAGTTGTTGTTGG	24	

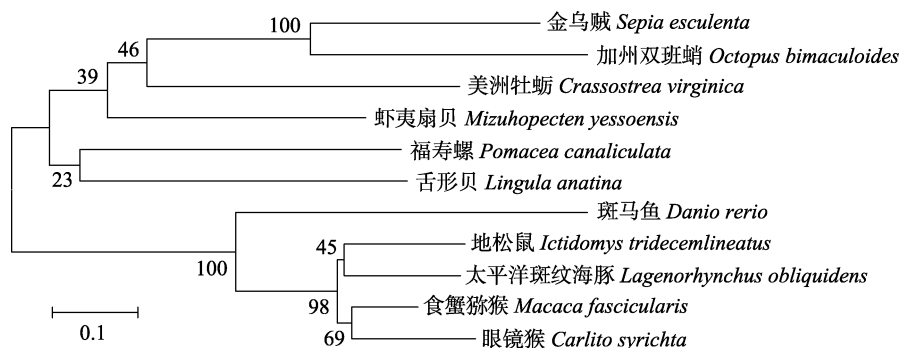


图 1 TERT 基因 NJ 系统进化树

Fig.1 NJ phylogenetic tree of TERT gene

100; 然后, 与其他软体动物聚为一个大的类群。脊索动物门的 5 个种则聚成另外一个独立分支, 与无脊椎动物形成 2 个并列分支。DNAMAN 软件同源序列分析结果表明, 金乌贼 TERT 基因序列与加州双斑蛸 TERT 基因序列一致性为 58.28%。NJ 系统进化树分析与同源序列分析将金乌贼转录组数据中筛选到的疑似 TERT 基因鉴定为金乌贼 TERT 基因。

2.2 不同组织 TERT 基因表达规律

雌性金乌贼卵巢的 TERT 基因相对表达量最高, 食道神经团次之, 接下来是心脏。随着金乌贼生长发育过程的推进, 性腺和心脏的 TERT 基因表达量呈逐渐下调的趋势($P < 0.05$), 而食道神经团在产卵期的表达量显著高于生长期和濒死期($P < 0.05$), 肝、胰、鳃等组织的表达量则一直很低(图 2)。

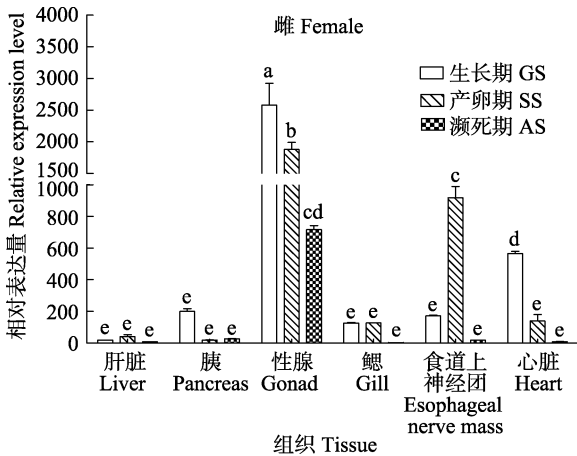


图 2 雌性金乌贼 TERT 基因在不同组织 3 个时期的表达
Fig.2 Female *S. esculenta* TERT gene expression in different tissues at three stages

上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).
The same as below

与雌性金乌贼相似, 雄性的性腺也是 TERT 基因相对表达量最高的组织, 食道神经团次之, 接下来是心脏。但雄性金乌贼的胰脏 TERT 基因表达量较高, 与心脏相当。在雄性金乌贼的生长发育过程中, 性腺的生长期和产卵期该基因表达水平均较高($P > 0.05$), 濒死期却显著下降($P < 0.05$); 胰脏和心脏的 TERT 基因表达量呈逐渐下调的趋势($P < 0.05$); 食道神经团在 3 个阶段呈先上升后下降的趋势, 且产卵期的表达量极显著高于生长期和濒死期($P < 0.01$); 虽然肝脏和鳃的表达量较低, 但呈现出与食道神经团类似的趋

势(图 3)。

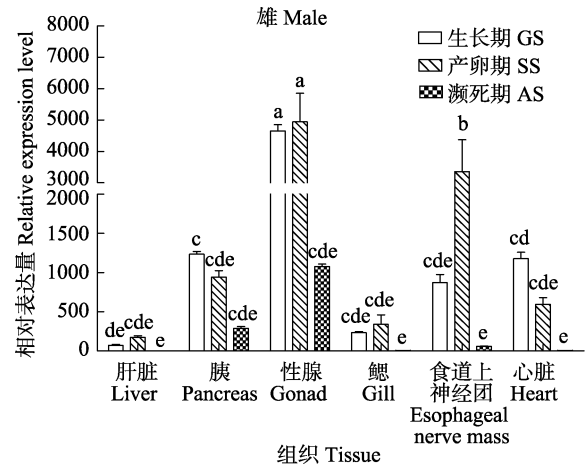


图 3 雄性金乌贼 TERT 基因在不同组织 3 个时期的表达
Fig.3 Male *S. esculenta* TERT gene expression in different tissues at three stages

2.3 金乌贼 TERT 基因表达性别差异

比较雌、雄金乌贼相同组织的 TERT 基因表达量, 生长期, 仅有胰脏和食道神经团雄性表达量高于雌性($P < 0.05$), 肝脏、性腺、鳃、心脏在雌、雄间均无显著性差异($P > 0.05$)(图 4)。产卵期, 卵巢 TERT 基因表达量极显著高于精巢($P < 0.01$), 其他 5 个组织 TERT 基因的表达量均较低, 且不存在性别差异($P > 0.05$)(图 5)。濒死期, 卵巢组织的 TERT 基因表达量急剧下降, 导致卵巢中该基因表达量极显著低于精巢组织($P < 0.01$), 其他 5 个组织的表达量依旧较低, 且不存在性别差异($P > 0.05$)(图 6)。

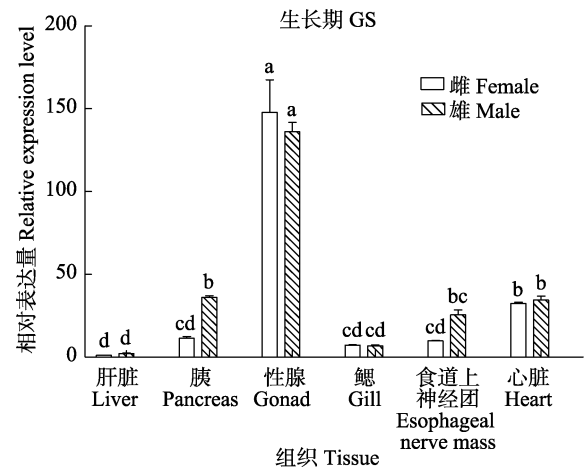


图 4 生长期金乌贼不同组织 TERT 基因雌、雄表达差异比较
Fig.4 Comparison of TERT gene expression in different tissues of male and female *S. esculenta* at growth stage

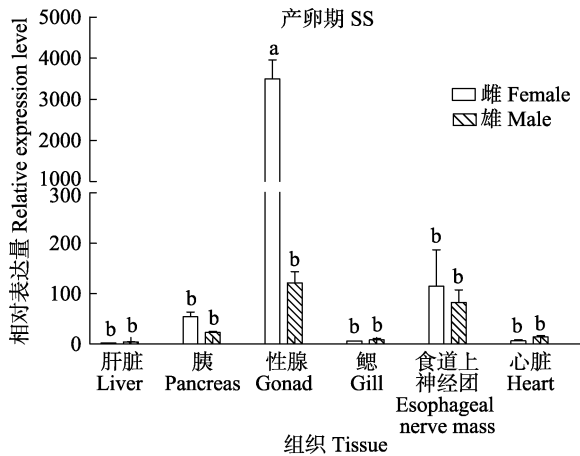


图5 产卵期金乌贼不同组织 TERT 基因雌、雄表达差异比较

Fig.5 Comparison of TERT gene expression in different tissues of male and female *S. esculenta* at spawning stage

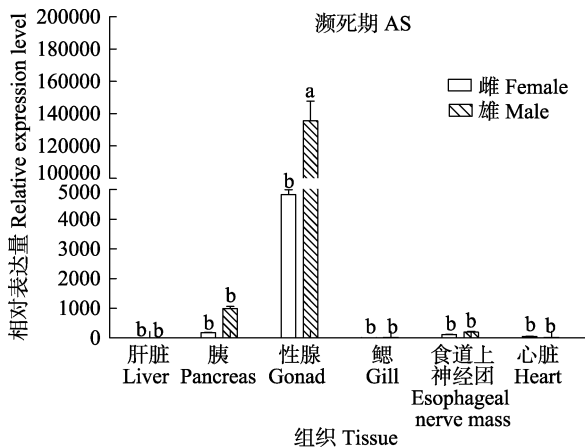


图6 濒死期金乌贼不同组织 TERT 基因雌、雄表达差异比较

Fig.6 Comparison of TERT gene expression in different tissues of male and female *S. esculenta* at aging stage

3 讨论

衰老又称老化,是生物发育成熟后的一个持续发展的、动态的、缓慢的自身机能减退,结构、组分逐步退行性病变并趋向死亡的不可逆转的现象(马少缔等, 2017)。金乌贼以其生殖后快速衰老、死亡的特点,成为研究衰老的一个理想物种。近年来,科研工作者主要从繁殖生物学、遗传育种学、胚胎发育学等方面展开研究(王亮等, 2017; 何暮春等, 2018; 刘长琳等 2018; 尹亚南等, 2018; 汪金梅等, 2017)。如果能充分了解金乌贼的衰老过程及其分子调控机制,并应用于生产,则能为渔业产量增长做出巨大贡献,并对人类衰老研究提供一个新的视角。

TERT 基因是端粒酶维持端粒长度的关键结构和

主要调控亚单位。虽然端粒酶活性变化规律在人、小鼠、大鼠等物种的不同组织中已得到确认(Kim *et al*, 1994; Wright *et al*, 1996; Ulaner *et al*, 1997)。但是,关于海洋生物该基因的转录和调控规律却所知甚少,其中一个复杂的问题是调控可能具有组织和细胞特异性(Cong *et al*, 2002; Ducrest *et al*, 2002; Mergny *et al*, 2002; Liu *et al*, 2004)。本研究发现,不同发育阶段的金乌贼 TERT 基因在肝、胰腺、性腺、鳃、食道上神经团和心脏中均有表达,并随着生长阶段变化,性腺、心脏、胰等组织的基因表达量呈持续下降趋势。据 Kong 等(2008)研究报道, TERT 基因表达的差异化与目标组织细胞的增殖能力有关。组织细胞增殖能力的高低也是体现其衰老状态的一个重要因素。因此, TERT 基因表达量的下降,揭示在金乌贼生命周期中,其性腺、心脏和胰脏等器官组织的分裂和增殖能力处于下降趋势。金乌贼性腺等组织的 TERT 基因表达下降与细胞增殖分裂能力的变化是否与其产卵后快速自然死亡存在有一定相关性,尚需要进一步工作来证实。

值得注意的是,雌、雄金乌贼食道上神经团的 TERT 基因相对表达量是在产卵期均大幅上调,濒死期却又大幅下调。研究发现,动物繁殖性能的高低很大程度上取决于下丘脑—垂体—性腺(HPG)轴的调节。在鱼类中,鱼类的性腺发育和生殖活动是由脑下垂体控制和调节的,而脑下垂体又在下丘脑控制之下(王良臣, 1987)。而头足类中枢神经系统的食道上神经团支配视腺调节性腺发育与成熟,视腺类似于脊椎动物的脑垂体,而食道上神经团类似于脊椎动物的下丘脑(Wells *et al*, 1959、1972)。推测产卵盛期的金乌贼受中枢神经系统的食道上神经团调控,激活 TERT 基因,从而增强性腺细胞的增殖能力,促进金乌贼性腺成熟和产卵,以适应金乌贼产卵期的生理需求。

通过实验发现, TERT 基因在金乌贼不同组织中具有明显的组织特异性,食道上神经团与性腺中高表达,在其他组织中低表达,尤其在肝、鳃和心脏组织中表达量最低,说明金乌贼各组织衰老状态并不一致。这一结果与青鳉(*Oryzias latipes*)的相关研究结果相似。在青鳉中胚胎期和成体分化组织中均有 TERT 基因表达,在成体组织中性腺和脑发现了 TERT 基因高表达(Frank *et al*, 2008)。同时,黑点青鳉(*Oryzias melastigma*) (Yu *et al*, 2006)和河豚(*Takifugu rubripes*) (Yap *et al*, 2005)中的 TERT 基因组织间差异表达与本研究结果相似,均表现为性腺 TERT 基因高表达,而肝脏、鳃、心脏等组织均低表达。本研究结果显示的性腺与其他组织的表达差异更大。

本研究结果还显示, 金乌贼 TERT 基因表达具有雌、雄性别间差异。产卵期, 雌性金乌贼性腺组织 TERT 基因相对表达量显著高于雄性($P<0.05$); 濒死期, 雄性金乌贼性腺组织 TERT 基因相对表达量显著高于雌性($P<0.05$), 其他组织低表达, 无显著差异($P>0.05$)。这种性别差异与大西洋鳕(*Gadus morhua*) 和欧洲鳕(*Merluccius merluccius*) (López de *et al*, 2014) 的研究结果并不一致, 大西洋鳕与欧洲鳕 TERT 基因在性腺表达不具有显著差异, 这种差异可能是物种差异性造成的。

4 小结

本研究从金乌贼转录组数据中成功筛选出端粒酶 TERT 基因, 鉴定出的序列长度为 2415 bp, NJ 系统进化树分析显示, 金乌贼与加州双斑蛸的 TERT 基因遗传距离较近, 二者同源率为 58.28%。金乌贼生活史关键阶段的 TERT 基因相对表达差异分析表明, 与产卵期相比, 濒死期的心、肝、胰、鳃、性腺、食道上神经团(除去视腺和视叶后的脑组织)等 6 个组织 TERT 基因表达量呈显著下调趋势, 推测与濒死期的器官组织分裂和增殖能力下降有关。TERT 基因在金乌贼不同组织中具有明显的组织特异性, 说明金乌贼各组织器官的衰老状态并不一致。

参 考 文 献

- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, *et al*. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science Magazine*, 1998, 279(5349): 349–352
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 407–425
- Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory Investigation*, 2007, 87(11): 1071–1076
- Ducrest A, Szutorisz H, Lingner J, *et al*. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*, 2002, 21(4): 541–552
- Frank P, Barbara K, Freia Z, *et al*. Tert expression and telomerase activity in gonads and somatic cells of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Development, Growth and Differentiation*, 2008, 50(3): 131–141
- He MC, Zhang JY, Liu CL *et al*. DNA methylation level and pattern in growing *Sepia esculenta* Hoyle. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 46–55 [何暮春, 张金勇, 刘长琳, 等. 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 46–55]
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266(5193): 2011–2015
- Kong RY, Giesy JP, Wu RS, *et al*. Development of a marine fish model for studying in vivo molecular responses in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(2): 131–141
- López de AE, Bilbao E, Soto M, *et al*. Molecular cloning and measurement of telomerase reverse transcriptase (TERT) transcription patterns in tissues of European hake (*Merluccius merluccius*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) during aging. *Gene*, 2014, 541(1): 8–18
- Liu L, Lai S, Andrews LG, *et al*. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene*, 2004, 340(1): 1–10
- Liu CL, Zhao FZ, Bian L, *et al*. Ultrastructure of the accessory nidamental gland of adult *Sepia esculenta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 137–143 [刘长琳, 赵法箴, 边力, 等. 金乌贼成体副缠卵腺的超显微结构. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 137–143]
- Ma SD, Lü DH, Hu J, *et al*. Cellular senescence and its role in individual aging. *Heilongjiang Medical Science*, 2017, 40(6): 14–15 [马少缔, 吕东鹤, 霍健, 等. 细胞衰老及在个体衰老中的作用. *黑龙江医药科学*, 2017, 40(6): 14–15]
- Mergny JL, Riou JF. Survey and summary: Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(4): 839
- Moyzis RK, Buckingham J, Cram L, *et al*. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 1988, 85: 6622–6626
- Spivak IM, Mikhelson VM, Spivak DL. Telomere length, telomerase activity, stress, and aging. *Advances in Gerontology*, 2016, 6(1): 29–35
- Ulaner GA, Giudice LC. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Molecular Human Reproduction*, 1997, 3(9): 769–773
- Verdun RE, Karlseder J. Replication and protection of telomeres. *Nature*, 2007, 447(7147): 924–931
- Wang LC. Control of the pituitary gland in the hypothalamus of bony fish. *Freshwater Fishery*, 1987(1): 45–48 [王良臣. 硬骨鱼下丘脑对腺垂体的控制. *淡水渔业*, 1987(1): 45–48]
- Wang L, Zhang XM, Ding PW, *et al*. Reproductive behavior and mating strategy of *Sepia esculenta*. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(6): 1871–1880 [王亮, 张秀梅, 丁鹏伟, 等. 金乌贼繁殖行为与交配策略. *生态学报*, 2017, 37(6): 1871–1880]
- Wang JH, Han S, Zheng XD. Molecular identification of reproduction patterns of *Sepia esculenta*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 184–189 [汪金海, 韩松, 郑小东. 金乌贼(*Sepia esculenta*)繁殖模式的分子学鉴定. *海洋与湖沼*, 2017, 48(1): 184–189]
- Wells MJ, Wells J. Optic glands and the state of the testis in octopus. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*,

- 1972, 1(1-4): 71-83
- Wells MJ, Wells J. Hormonal control of sexual maturity in octopus. *Journal of Experimental Biology*, 1959, 36(1): 1-33
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, *et al.* Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*, 1996, 18(2): 173-179
- Yap WH, Yeoh E, Brenner S, *et al.* Cloning and expression of the reverse transcriptase component of pufferfish (*Fugu rubripes*) telomerase. *Gene*, 2005, 353(2): 207-217
- Yin YN, Liu CL, Hu P, *et al.* Histology of oogenesis and ovarian development in cultured *Sepia esculenta*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 503-511 [尹亚南, 刘长琳, 胡鹏, 等. 养殖金乌贼卵子发生和卵巢发育的组织学观察. *中国水产科学*, 2018, 25(3): 503-511]
- Yu RMK, Chen EXH, Kong RYC, *et al.* Hypoxia induces telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression in non-tumor fish tissues *in vivo*: The marine medaka (*Oryzias melastigma*) model. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7: 27
- Zhang JY, Liu CL, He MC, *et al.* A full-length transcriptome of *Sepia esculenta* using a combination of single-molecule long-read (SMRT) and Illumina sequencing. *Marine Genomics*, 2019: 54-57

(编辑 冯小花)

Gene Identification and Tissue Differential Expression Analysis of *Sepia esculenta* Telomerase Reverse Transcriptase

XIANG Zilong^{1,2,3}, LIU Changlin², ZHANG Jinyong^{2,3,4}, HU Peng^{2,3},
HE Muchun⁵, LIU Shufang^{2,3①}, ZHUANG Zhimeng², XUE Tongming⁶

(1. College of Fisheries 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; 4. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 5. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003; 6. Qingdao Jinshatan Aquatic Product Development Co., Ltd., Qingdao 266000)

Abstract Telomerase reverse transcriptase (TERT) gene is a key structure and major regulatory subunit of telomerase. TERT synthesizes telomeric DNA repeats by reverse transcription of telomerase RNA template sequences and adds them to the ends of chromosomes to maintain and extend the ends. Golden cuttlefish (*Sepia esculenta*) is an annual species that dies quickly after spawning. This characteristic makes it a potential research object for the study of reproduction and aging. In this study, the phylogenetic and homologous sequence analysis revealed that the gene was a *Sepia esculenta* TERT gene with a sequence length of 2415 bp. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the relative expression of TERT gene in the growth stages, spawning stages and aging stages of *S. esculenta*, and to analyze life cycle differences and gender differences. The research results show that TERT gene expression in six tissues, including heart, liver, pancreas, gill, gonad and esophageal nerve mass, showed a downward trend, which was supposed to be related to the decline of organ division and proliferation in the near-death stage. TERT gene has obvious specificity in different tissues of *Sepia esculenta*. It shows that the aging status of different tissues and organs of *Sepia esculenta* is different. The results of this study can provide basic data for the further study of the regulation mechanism of Telomerase in reproduction and senescence of cephalopod.

Key words *Sepia esculenta*; TERT gene; qRT-PCR; Phylogenetic tree; Gene differential expression analysis

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190221006

http://www.yyxxjz.cn/

单秀娟, 胡芷君, 邵长伟, 唐政. 捕捞诱导鱼类生物学特征进化研究进展. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 165-175

Shan XJ, Hu ZJ, Shao CW, Tang Z. Progress in the study of fishing-induced evolution of fish biological characteristics. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 165-175

捕捞诱导鱼类生物学特征进化研究进展*



单秀娟^{1,2①} 胡芷君^{1,3} 邵长伟^{1,2} 唐政^{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 随着捕捞强度加大, 渔业生物为了应对捕捞压力、维持种族繁衍, 逐渐产生适应性进化, 这一过程称为捕捞诱导进化(Fishing-induced evolution, FIE), 通常表现为渔业生物个体变小、性成熟提前, 个体对捕捞的敏感性增强, 进一步导致渔业种群结构简单、生态系统稳定性下降和渔业经济效益降低。认知捕捞诱导的渔业生物适应性进化, 掌握捕捞对渔业种群的作用机制, 有利于制定科学合理的渔业资源养护与管理策略。虽然 FIE 方面已进行了大量研究, 但 FIE 在生理、生态及基因层面对渔业生物的具体影响过程尚未明确, 尤其是在气候变化、多物种相互作用等的动态环境中, FIE 的作用方式更为复杂。作者综述了鱼类 FIE 的主要研究方法, 总结了捕捞对大个体的选择性在鱼类生长、性成熟和行为方面的影响, 并分析了这种影响对渔业种群恢复与管理产生的效应, 以及今后需要解决的关键科学问题, 旨在为 FIE 的进一步深入研究和渔业资源的科学管理提供帮助。

关键词 鱼类; 捕捞诱导进化; 渔业资源; 生物学特征; 进化影响评估

中图分类号 S937 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0165-11

渔业资源是人类食物的重要来源之一。但是, 随着捕捞强度加大, 全球已有超过 30%的渔业资源遭受过度捕捞, 约 60%处于完全开发阶段(FAO, 2016)。为了适应捕捞压力、维持种群繁衍, 渔业生物会在短时间内发生适应性进化, 这个过程称为捕捞诱导进化(Fishing-induced evolution, FIE) (Jørgensen *et al*, 2007)。Rutter (1902)首次提出捕捞可能使鱼类退化, 但由于不符合当时物种进化缓慢的观念, 且缺乏相关理论支撑, 同一时期很多类似研究都未受到重视, 如 Cooper 等(1953)、Handford 等(1977)和 Borisov (1978)。20 世

纪末, 研究发现过度捕捞导致大西洋鳕(*Gadus morhua*)生物量严重下降、性成熟年龄提前和体长变小(Olsen *et al*, 2004; Hutchings, 2004), 恢复过程也变得十分缓慢(Sinclair *et al*, 2002), 人们开始认识到捕捞可能诱导海洋生物发生快速进化并阻碍种群恢复(Kuparinen *et al*, 2007)。21 世纪初, FIE 逐渐成为渔业资源研究的热点问题之一。我国关注到 FIE 问题是在 20 世纪 60 年代, 研究人员从“四大家鱼”中观察到“鱼类小型化”现象(朱成德等, 1979)。此后, 在海洋捕捞和人工繁殖过程中, 渔业生物也被发现存在小型化

* 国家重点研发计划(2017YFE0104400)、山东省泰山学者专项基金项目和青岛海洋科学与技术试点国家实验室“鳌山计划”优秀青年学者专项(2017ASTCP-ES07)共同资助 [This work was supported by the National Key Research Program of China (2017YFE0104400), 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)].

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

收稿日期: 2019-02-21, 收修改稿日期: 2019-04-10

和性早熟现象(詹秉义等, 1986; 陈景元, 1985)。截止目前, FIE 已经是一个普遍的生态学现象, 影响着渔业生物的生物学、生理、行为和遗传结构等(付辉云等, 2015; Uusi-Heikkilä *et al*, 2008; Kokkonen *et al*, 2015), 进而对渔获物质量、产量以及整个生态系统产生重要影响(Jørgensen *et al*, 2013; Kuparinen *et al*, 2016)。

为了掌握捕捞对渔业生物进化的作用机制, 制定合理的渔业资源管理策略, 需要对 FIE 进行深入研究。近年来, FIE 的研究有很多, 主要以鱼类作为研究对象, 研究内容集中在捕捞对鱼类生活史特征和遗传结构的影响(Walraven *et al*, 2010; Diaz *et al*, 2015; Cuveliers *et al*, 2011)、探索多种研究方法在捕捞进化效应的应用(Pauli *et al*, 2014; 李莉等, 2016; Laugen *et al*, 2014)、FIE 在种群和生态系统水平上的影响及其对渔业经济和管理意义(Enberg *et al*, 2009; Eikeset *et al*, 2013)等。然而, 由于受到气候变化、污染和围填海等多种因素影响(樊伟等, 2001), 研究 FIE 的具体过程与机制难度较大, 多数研究结论只是理论或实验预测, 还缺少确切的野外观测证据(Heino *et al*, 2015; Hard *et al*, 2008)。我国尚未进行 FIE 的系统研究, 少量相关研究主要探究鱼类生物学特征、种群结构变动及其管理对策(李忠义等, 2017; 朱晓光等, 2009), 以及网具选择性、捕捞和环境变化对鱼类生物学特征和种群结构的影响(林群等, 2016; 孙鹏, 2013)等。本文综述了国内外 FIE 的相关研究结果, 总结了 FIE 的主要研究方法和主要的捕捞方式(底拖

网)在鱼类生长、性成熟和行为方面的影响, 分析了其对种群恢复及渔业资源管理的意义, 旨在为 FIE 的进一步研究和渔业资源管理提供参考资料。

1 研究方法

研究 FIE 的难点之一在于如何厘清环境和捕捞压力、区分表型可塑性和进化作用, 至今还没有一个十分有效的方法。20 世纪末以前, 主要利用简单的回归统计方法分析野外调查数据, 但不能有效排除环境作用(Bigler *et al*, 1996)。之后的研究方法可大致分为 4 种, 分别应用于不同方面的 FIE 研究, 并各有其优缺点(Conover *et al*, 2009a) (表 1)。

一是野外生态学的方法, 利用野外调查数据构建统计模型, 用于排除环境影响。其中, 使用最多的是概率成熟反应范式(Probabilistic maturation reaction norms, PMRN), 该模型假设环境变化通过生长作用于性成熟, 即未成熟鱼类在发育到性成熟的生长过程中已包含了影响性成熟的所有因素, 其性成熟概率变化反映的是鱼类自身的变化——遗传进化。因此, PMRN 方法可以在缺少遗传数据的情况下揭示鱼类的进化可能性, 而且所需的年龄、体长和性成熟数据较容易获取、使用方法简单(Dieckmann *et al*, 2007)。但是, 由于鱼类性成熟所受的部分外界影响因素可能并不影响其生长, 因此, 并未包含在此性成熟概率中, 概率变化未能完全证实适应性进化的存在(Kraak, 2007)。

表 1 捕捞诱导进化(FIE)的研究方法及其优缺点

Tab.1 Research methods of fishing-induced evolution (FIE) and their advantages and shortages

研究方法 Research methods	描述 Description	优势 Advantages	不足 Shortages	文献 References
野外生态学 Field ecology	利用野外调查数据进行分析	通过直接观测获知野外状况, 是现阶段最常用的研究方法	数据收集困难, 受多种因素影响, 不易重复	Rijnsdorp <i>et al</i> , 1993; Pardoe <i>et al</i> , 2009; Walraven <i>et al</i> , 2010
实验生态学 Experimental ecology	控制环境和实验条件, 探究适应性进的诱导因素和过程	受人为控制, 可重复性强	实验时间有限, 与野外自然状态下的条件有差别	Conover <i>et al</i> , 2002; Sutter <i>et al</i> , 2012; Uusi-Heikkilä <i>et al</i> , 2017; Pauli <i>et al</i> , 2014
数值模拟 Numerical simulation	在一定选择压力和环境变动下, 计算机模拟已知的生态、生理和遗传过程进行预测	可同时考虑环境、表型可塑性、密度依赖效应等多种因素, 预测种群变动	模拟真实环境难度较大, 模拟结果只能作为参考	孙鹏, 2013; Wang <i>et al</i> , 2009; Dercole <i>et al</i> , 2017; Marty <i>et al</i> , 2015
遗传学 Genetics	通过检测基因组序列、结构、转录水平和表观遗传等的变化, 推测进化过程	利于探究鱼类适应性进化及其机制	缺少已知的生物遗传信息, 分析基因型与表型的对应关系难度大	Therkildsen <i>et al</i> , 2013; Chebib <i>et al</i> , 2016; Uusi-Heikkilä <i>et al</i> , 2017; Barrett <i>et al</i> , 2011

二是实验生态学方法,已广泛且有效地应用于各个研究领域。在FIE研究上也不例外,其应用范围包括探究捕捞对鱼类行为的影响(Sutter *et al.*, 2012)、量化生物学特征的演化速率(Audzijonyte *et al.*, 2013)、观测特征之间的共同演变(Cooke *et al.*, 2007)和结合分子技术探究捕捞选择的遗传机制(Wijk *et al.*, 2013; Uusi-Heikkilä *et al.*, 2017)等。在人为控制的不同捕捞压力条件下,Conover等(2002)首次为海洋鱼类的FIE提供了实验证据。

三是数值模拟,得益于数据分析技术的发展,使用计算机模拟鱼类生活史动态有利于从中得出FIE的作用规律。如今,数值模拟方法多用于探究网具选择性的影响程度(Jørgensen *et al.*, 2009)、过度开发时鱼类的恢复情况(Dunlop *et al.*, 2009; Kuparine *et al.*, 2012)以及量化FIE对渔业经济效益的影响(Zimmermann *et al.*, 2015)等,但模拟结果与野外情况的一致性还需进一步验证。

四是遗传学方法,由于野外遗传数据缺乏,该方法一般结合实验生态学方法进行。根据已有的物种遗传信息,使用微卫星(Simple Sequence Repeats, SSR)和单核苷酸多态(Single nucleotide polymorphism, SNP)等基因标记,进行种内不同个体的比较,从而探究捕捞对鱼类遗传组成产生的影响(李莉等, 2016)。随着第二代测序技术的发展,采用基因组学的方法可以实现群体间大量位点的序列分析,识别出与选择作用相关的位点,并通过分析位点在个体内的功能,推测适应性进化机制,这将成为日后FIE研究的最有力的手段(Elmer *et al.*, 2016; 柳莹等, 2016)。

2 捕捞诱导鱼类生物学特征进化

使用具有选择性的捕捞网具以及在渔场、渔汛期定点定时作业都可能对渔业生物产生选择性,使生物种群向着适应选择压力的方向演变(Hsieh *et al.*, 2010; Heino *et al.*, 2015)。这里所说的选择性与渔业管理上的有所不同,后者以渔获的种类数区分,渔获种类多则选择性小,而这里所说是以生物的某一特征(体型、行为等)进行分类,如刺网较多选择体高且在一定体长范围内的个体,因此,刺网捕捞都具有高选择性,而且由于选择对象不同,其诱导进化方向和速率也有差异。捕捞诱导进化,一方面是因为捕捞大量移出体型较大的个体,同时也对基因型进行了定向选择(Liang *et al.*, 2014);另一方面捕捞使物种组成、栖息环境和种群密度等发生变化,从而通过改变营养关系、生活环境和生活习性间接影响鱼类生活史特征(Ricker, 1981),其特征进化主要表现在生长、性成熟

和行为等方面(图1)(Heino *et al.*, 2015)。

2.1 生长

大多数捕捞网具是对鱼类个体大小的直接选择,往往导致鱼类向个体变小的方向演变(Rutter, 1902)。多数水域都出现了鱼类小型化现象,如小个体渔获物的比例不断增加等(刘其根等, 2005)。有关捕捞影响鱼类生长的研究已有许多报道,但是,由于个体生长是鱼体内部生理条件和能量分配的体现,也受温度、饵料、栖息环境和捕食者等多种外部因素影响,研究难度较大,研究结果的差异也较大(Enberg *et al.*, 2012)。

Ricker(1981)通过分析1951~1979年的渔业捕捞数据,发现5种太平洋鲑(*Oncorhynchus* spp.)在不同时期都存在不同程度的平均体长、体重下降现象,与温度、盐度之间没有显著的相关关系,指出捕捞是导致鱼类生长变化的最主要原因,这与之后的大部分研究结论一致(Enberg *et al.*, 2012)。Conover等(2002)利用实验生态学的方法,发现捕捞90%大个体使银汉鱼(*Menidia menidia*)在4个世代内体重下降了0.8g,生长率下降了0.1mm/d。Conover等(2002)认为,鱼类为了适应捕捞压力,把更多能量投入到性成熟和繁殖,使其用于生长的能量减少,导致生长变慢。同时,捕捞总是选择生长快、体长大的个体,可能导致生长快的基因型减少,生长慢的基因更多地遗传给后代。但也有大量研究表明,大规模捕捞使鱼类生长率增加,如伊利湖鲈鱼(*Perca flavescens*) (Spangler *et al.*, 1977)、北海鲾(*Pleuronectes platessa*) (Walraven *et al.*, 2010)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*) (单秀娟等, 2011)等。根据已有研究,造成结果差异的可能原因:一是研究对象的生活史策略不同,鱼类用于繁殖和生长的能量分配有所差异,生长快、寿命短鱼类更倾向于增加自身繁殖力来维持种群繁衍(Silva *et al.*, 2013; Morbey *et al.*, 2018);二是研究方法不同,实验生态学方法模拟的捕捞强度往往过大,且未考虑物种相互作用、密度效应、生境变化等影响因素(Andersen *et al.*, 2009),而在自然环境中捕捞使种群密度降低、相对饵料丰度增加可能掩盖鱼类生长减慢的现象(Edeline *et al.*, 2007);三是捕捞的选择性使鱼类生物学特征发生共同演变(Walsh *et al.*, 2006),如某些鱼类摄食率下降、觅食行为减少等(Walsh *et al.*, 2006)。由于影响鱼类生长的因素很多,且过程复杂,不能单从表型特征分析中得出结论,需从生理和分子层面上进一步研究。

如今,研究普遍认为,捕捞可能诱导鱼类发生适应性进化,而不是以往所认为的表型可塑性变化

(Jørgensen *et al.*, 1990)。Hauser 等(2002)对新西兰笛鲷(*Pagrus auratus*)群体的研究发现,遭受捕捞后其 SSRs 的杂合度和等位基因频率不断下降,群体遗传多样性随生物量的减少而下降。van Wijk 等(2013)对孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)进行的捕捞生态学实验发现,持续 3 个世代捕捞 75%大个体,雄性孔雀鱼的进化速率是自然种群的 2~5 倍,平均体长下降了 6.5%,位于 Y 染色体上的体长调控基因发生显著变化。最近的研究发现,斑马鱼(*Danio rerio*)的多个基因对捕捞作出响应,与其胚胎代谢、昼夜节律、压力响应、免疫系统等有关(Uusi-Heikkilä *et al.*, 2015)。同时,捕捞还通过影响胰岛素通路的能量代谢调控基因,影响鱼类寿命(Roff, 2007)。Uusi-Heikkilä 等(2017)认为,在捕捞过程中的鱼类遗传响应方面,基因表达变化比基因序列变化更有说服力。研究表明,选择性捕捞大个体使鱼类种群的差异表达基因增加了 20%,其平均等位基因频率变化普遍高于非差异表达基因,鱼类可能在 RNA 加工和代谢、蛋白质代谢、核糖体合成和氮化合物代谢等方面响应捕捞。但基因差异表达的具体机制尚未明确,捕捞诱导鱼类遗传进化的对应关系还不清楚。除此之外,有研究表明,在某些情况下,气候等环境变化对鱼类生长的影响超过捕捞因素(Perez-Rodriguez *et al.*, 2013),甚至改变鱼类遗传结构(Edeline *et al.*, 2007)。气候变化(Brander, 2007)、鱼类种间竞争(Gobin *et al.*, 2015)和生境变化(杨齐, 2005)等多方面因素可能加快或减弱 FIE, 需要进行综合考虑。

2.2 性成熟

鱼类性成熟的主要影响因素包括体长、温度和捕捞(陈新军, 2004)。在捕捞诱导的特征演变中,鱼类性成熟相关的研究最多,一方面是因为性成熟特征的改变对种群繁殖、恢复和渔业经济效益有重要意义(詹秉义, 1995; Conover *et al.*, 2002); 另一方面,性成熟方面数据较多。众多研究都表明,鱼类为了适应捕捞压力而提前性成熟(Heino *et al.*, 2015)。这种变化可以用生活史进化理论来解释,鱼类性成熟年龄和体长大小与其生命活动中的权衡和适合度有关(聂海燕等, 2007)。鱼类进化成性早熟个体能缩短生长时间,降低发育至性成熟的死亡风险,并且有更多的能量用于繁殖,增加繁殖力(Conover *et al.*, 2002),从而提高适合度,但同时个体竞争力和后代存活率会相应降低(Swain, 2011)。对鱼类而言,在高强度的捕捞压力下增加繁殖投入获得的收益远大于增加生长获得的收益,因此,捕捞可能促使鱼类向初次性成熟年龄和体

长变小的方向演变(Kokkonen *et al.*, 2015; Heino *et al.*, 2013)。但也有学者认为,捕捞引起的鱼类性成熟进化程度不明显或不存在进化,其研究对象大多为短生命周期种群,如沙丁鱼(*Sardina pilchardus*) (Silva *et al.*, 2013)、鲱(*Clupea harengus*) (Engelhard *et al.*, 2004),可能是由于短生命周期鱼类在自然环境中也经历着较高的死亡率并且性成熟较早,捕捞作用对其影响较小,可在短时间内恢复(Feiner *et al.*, 2015)。

捕捞诱导的鱼类性成熟特征变化是否可遗传的问题仍存在争议,如何区分温度、饵料、物种相互作用等引起的表型可塑性变化和捕捞诱导的适应性进化还没有有效的方法(Perez-Rodriguez *et al.*, 2013)。目前,使用 PMRN 方法进行了大量研究(Kuparinen *et al.*, 2007),其中,大部分结果表明,鱼类性成熟体长和年龄的变化存在进化可能性(Haugen *et al.*, 2001)。如 Pardoe 等(2009)使用 PMRN 方法分析了 1964~1999 年大西洋鳕的性成熟变化,发现其成熟体长和年龄的降低不完全依赖于密度效应、生长可塑性变化和环境因子(温度、饵料丰度等)。结合遗传学方法,研究表明,捕捞过程中大西洋鳕在某些位点表现出高度分化,与 PMRN 中点的变化趋势存在相关性,而且其等位基因频率变化不能完全解释为群体洄游过程中的杂交或基因流,更多的是捕捞作用(Therkildsen *et al.*, 2013)。但也有部分研究表明,鱼类遗传结构变化与温度存在一定相关性,鱼类生物学特性进化可能同时受到捕捞和环境的影响,二者间的相对影响程度及相互作用还需要更多关注(Perez-Rodriguez *et al.*, 2013)。

鱼类性成熟提前可能导致多种后果,如繁殖力变化(Walsh *et al.*, 2006)、卵径变小、孵化率降低、幼体存活率下降等(Conover *et al.*, 2002)。其中,鱼类的繁殖力变化主要表现为鱼类相对性腺重变化、产卵前后体重差值变化和亲体体重变化等。以能量密度作为繁殖输出指标,有研究发现,亲体在繁殖期间体重显著下降,蛋白质和脂肪比例存在雌雄差异,更多能量被用于繁殖(Walraven *et al.*, 2010)。但还没有足够证据能说明繁殖力的变化是由捕捞造成的,相反这些变化更可能与温度变化有关(O'Malley *et al.*, 2013)。虽然捕捞引起鱼类繁殖力的适应性进化还未得到证实,但由于鱼类繁殖直接影响种群补充量,如果管理不当可能导致种群灭绝(詹秉义, 1995),因此,需要对渔业资源进行针对性管理。

2.3 行为

捕捞的选择性还体现在鱼类行为上,包括摄食、

求偶、育幼和洄游等(Cooke *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2007), 这些行为的改变在一定程度上影响鱼类生长、繁殖和分布。目前, 这方面还鲜有研究, 主要原因是鱼类行为的观测难度较大、缺乏有效数据(Leclerc *et al.*, 2017)。虽然已有较多技术用于追踪鱼类的洄游路线(Walsh *et al.*, 2006; Handegard *et al.*, 2005), 如体外和体内标记、数据储存式标记、声呐和回声探测仪追踪等, 但很少应用到 FIE 研究上。已有研究大多使用实验生态学方法进行, 研究比较深入的是大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)实验(Philipp *et al.*, 2015)。由于捕捞往往选择较活跃、大胆和受影响程度高的鱼类个体(Diaz *et al.*, 2015), 经过多个世代的钓捕选择, 大口黑鲈留存个体对网具的敏感性增强, 并将其遗传给后代(Philipp *et al.*, 2009)。此外, 伴随着生长变化、食物需求降低、代谢减慢、对捕食者的警惕性降低等多种生理和行为特征变化(Redpath *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2007)。斑马鱼的生态学实验表明, 捕捞使控制血清素合成的调控基因发生变化, 从而影响了褪黑色素合成量, 最终影响鱼类的摄食能力和攻击性(Uusi-Heikkilä *et al.*, 2015), 这可能是捕捞影响鱼类行为的内在机制。由于鱼类的行为习惯与体长相关, 并具有一定遗传能力, 因此, 捕捞也可能通过直接影响鱼类行为(如摄食、活跃度、栖息地选择等)作用于其生长和性成熟(Biro *et al.*, 2008)。

3 研究意义

3.1 对种群恢复的影响

持续高强度的捕捞会使鱼类生活史、生理、行为和遗传等特征发生变化, 进一步改变种群动态(Dunlop *et al.*, 2015), 降低种群稳定性(Kuparinen *et al.*, 2016), 最终影响种群恢复。但是, 早在 20 世纪末关于海洋鱼类灭绝风险评估, 研究人员没有考虑鱼类生物学特征和遗传进化, 导致当今渔业种群可能正面临着潜在的灭绝风险(Musick, 1999)。据 Hutchings (2000) 统计, 11 科 38 种鱼类中大多数种类在 15 年内生物量降低了 45%~99%, 而且在之后的 15 年内, 其生物量几乎没有恢复。

FIE 对种群恢复影响的研究较少, 主要采用实验生态学 and 数值模拟方法, 大部分研究结果表明, FIE 对鱼类生物学特征的恢复起阻碍作用。Conover 等(2009b)通过生态学实验发现, 在相同的捕捞和恢复时间间隔内, 银汉鱼幼鱼生长几乎完全恢复, 成鱼体长只恢复了 50%。这是首次使用实验生态学方法探究遭受捕捞

后鱼类的恢复能力, 但实验只简单考虑了幼鱼和成鱼的体长恢复情况, 且实验中较少的产卵群体数量(约 100 尾)可能影响实验结果。Uusi-Heikkilä 等(2017)研究发现, 在捕捞过程中差异表达的基因, 在恢复阶段仍差异表达, 涉及蛋白质的转运和定位、胰岛素信号通路等过程, 可能因此影响种群恢复。基于大西洋鳕生态和演变动态(个体生长繁殖、密度依赖效应和环境变化)模拟捕捞, Enberg 等(2009)发现, 种群生物量恢复时间随捕捞强度和作用时间的增加而增加, 当捕捞时间少于 100 年、捕捞率低于 50% 时, 才能在较短时间内恢复到初始水平。基于物种保护目的, 且不考虑环境因素, Kuparinen 等(2012)的模拟结果与 Enberg 等(2009)的基本一致, 此外还发现, 由于发生进化, 大西洋鳕的成熟体长和年龄恢复十分缓慢, 恢复水平也低于捕捞前。但是, 在捕捞进化作用下, 鱼类亲体与补充量的恢复可能加快, 保证了种群繁衍。为进一步探究捕捞对种群恢复的影响程度, 今后可考虑在模型中加入性别选择(Hutchings *et al.*, 2010)、栖息地指数(杨齐, 2005)及基因交流(Pukk *et al.*, 2013)等影响因素。

捕捞诱导鱼类生活史特征和行为等发生适应性进化, 不仅增加种群恢复时间而且加大种群恢复的不确定性(Neubauer *et al.*, 2013)。为了加快种群恢复, 首先需要全面了解渔业资源动态(Heino *et al.*, 2015), 考虑采用声学探测技术监测种群动态、分子标记评估种群遗传变化以及在模型中考虑自然因素及遗传因素等(Langard *et al.*, 2015; Marty *et al.*, 2015), 从而对渔业资源进行有效管理。

3.2 对渔业资源管理的意义

FIE, 一方面改变鱼类生物学特征和种群丰度, 影响其经济价值和产量(Eikeset *et al.*, 2013); 另一方面降低物种多样性和遗传多样性, 影响生态系统稳定和健康(Pinsky *et al.*, 2014)。虽然 FIE 的作用机制还不明确, 但不可否认的是, FIE 影响着海洋生态系统服务, 特别是食物的可持续产出。值得注意的是, 在捕捞实验中, 捕捞目标为重复产卵群体中的大个体时, 渔获量逐渐下降, 而捕捞目标为小个体时, 渔获量几乎不变(Edley *et al.*, 1988)。而对单次产卵群体, 捕捞大个体和小个体都会使渔业产量下降(Conover *et al.*, 2002)。由于实验处理方法不同, 捕捞是否会对不同鱼种的渔获量产生不同的影响, 还需要涉及更多鱼种的研究。总结已有研究, FIE 使渔业经济效益下降的原因主要有以下几点: (1) 捕捞导致鱼类体长变小,

在限定最小网目的政策下,能捕捞到的个体更少,而且鱼类平均体重普遍下降(Conover *et al*, 2002); (2) 捕捞导致亲体数量大量减少(Walsh *et al*, 2006),补充能力下降。虽然有研究表明,鱼类把能量更多地投入到繁殖中(Rijnsdorp *et al*, 2005),如怀卵量增加,但性成熟提前,导致卵质量下降、孵化率和幼体存活率降低,使补充量远低于捕捞死亡(Conover *et al*, 2002); (3) 捕捞使鱼类对网具的敏感性增强且具有遗传能力,使鱼类更难捕获(Philipp *et al*, 2015)。

为了减弱和避免 FIE 产生不良影响,需要把捕捞诱导的已知和未知的生物、非生物因素及其之间的相互作用纳入渔业管理的范畴,使渔业经济效益和生态效益都保持在可持续范围内,这样的管理称为基于生态系统水平的渔业管理(Ecosystem approach to fisheries, EAF) (Garcia, 2003)。应用这种管理办法,首先要对各种因素及其产生的效应进行定量。定量 FIE 影响效

应的方法称为进化影响评估(Evolutionary impact assessment, EvoIA) (Laugen *et al*, 2014),评估内容包括捕捞对鱼类生物学特征的影响、种群进化动态、社会经济动态和管理策略评估(图 1)。由于实现种群、生态和经济效应的定量评估十分困难,已有研究不多。较早使用这种方法的是 Mollet (2010),其研究发现,考虑种群的生态和遗传过程时,现行的捕捞参考点并不是真正可持续的,长期实施会导致渔业产量随时间不断下降。随后,结合生态遗传模型和经济模型提出了生物经济模型(Bioeconomic model),模型中增加了鱼类价格随渔获量和需求量波动的过程,研究发现,忽略进化效应会高估捕捞产量和效益,并得出错误的管理目标(Zimmermann *et al*, 2015)。但是,使用不同的模型和参数估算方法,可能产生不同甚至相反的结果(Pinsky *et al*, 2014),需要对模型进行更多的敏感性分析和验证。

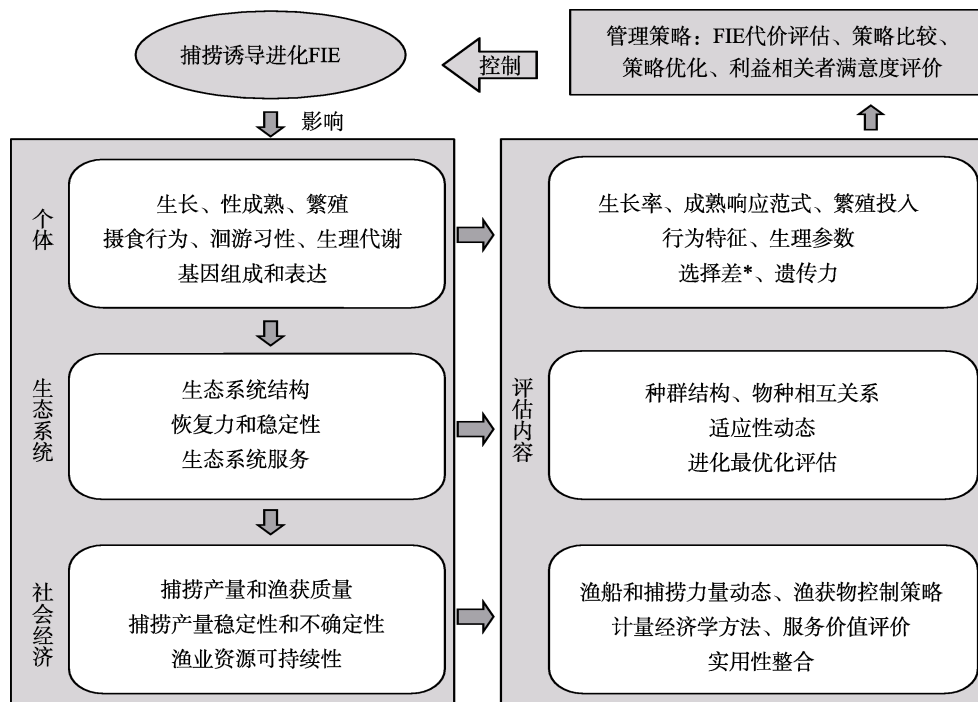


图 1 捕捞诱导进化(FIE)影响过程及进化影响评估(EvoIA)内容(Laugen *et al*, 2014)

Fig.1 The fishing-induced evolution (FIE) impact process and its evolutionary impact assessment (EvoIA) (Laugen *et al*, 2014)

*指被选择后剩余群体的特征平均值与选择前群体特征平均值的差值(朱伟俊等, 2007)

* Refers to the average value difference of characteristics between surplus stock after being selected and stock before being selected (Zhu *et al*, 2007)

结合鱼类生物学特性和生态效应制定渔业资源管理策略,建议:(1)改进渔具结构,使渔获物体长组成符合的大个体,这主要应用于休闲渔业、钓具、陷阱类渔具;(2)增加种群遗传和生态系统水平上的

研究,合理规划捕捞水域和设置生物学参考点;(3)降低捕捞力量,建立保护区。制定渔业管理政策时,还需要注意两点,一是不同生活史策略的鱼类受 FIE 影响可能不同;二是 FIE 也可能通过营养关系作

用于没有遭受捕捞的鱼类(张波, 2018)。

4 FIE 研究展望

FIE 是渔业生物应对过度捕捞所作出的适应性响应。由于其影响范围广、作用过程复杂, 不能仅仅依靠单一技术手段和单一物种研究, 需结合进化种群统计学和数量遗传学等方法, 建议以功能群为单位, 利用基因标记进行长期野外监测并尽早开展相关实验研究。目前, 尽管 FIE 在鱼类生物学特征和渔业资源管理意义方面已经有较多研究, 但如何准确预测 FIE? 其作用方式是改变渔业种类的生物学特征、种群丰度、行为特征还是遗传结构? 捕捞效应与气候变化(如温度升高、极端天气)之间的相互作用对渔业生物进化的影响如何? 渔业生物进化对其个体、种群、群落、生态系统等影响如何进行量化? 又是如何进一步影响社会经济收益? 这些问题尚需进一步探究。

参 考 文 献

- Andersen KH, Brander K. Expected rate of fisheries-induced evolution is slow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(28): 11657–11660
- Audzijonyte A, Kuparinen A, Fulton EA. How fast is fisheries-induced evolution? Quantitative analysis of modelling and empirical studies. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(4): 585–595
- Barrett RDH, Hoekstra HE. Molecular spandrels: Tests of adaptation at the genetic level. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(11): 767–780
- Bigler BS, Welch DW, Helle JH. A review of size trends among North Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(2): 455–465
- Biro PA, Post JR. Rapid depletion of genotypes with fast growth and bold personality traits from harvested fish populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(8): 2919–2922
- Borisov VM. The selective effect of fishing on the population structure of species with long life cycle. 1978, 18
- Brander KM. The role of growth changes in the decline and recovery of North Atlantic cod stocks since 1970. *ICES Journal of Marine Science*, 2007, 64(2): 211–217
- Chebib J, Renaut S, Bernatchez L, *et al.* Genetic structure and within-generation genome scan analysis of fisheries-induced evolution in a lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) population. *Conservation Genetics*, 2016, 17(2): 473–483
- Chen JY. Discussion on the degeneration of fish characters in artificial propagation. *China Fisheries*, 1985(5): 6–7 [陈景元. 关于人工繁殖鱼类的性状退化问题探讨. 中国水产, 1985(5): 6–7]
- Chen XJ. *Fisheries resource and fishing ground*. Beijing: China Ocean Press, 2004 [陈新军. 渔业资源与渔场学. 北京: 海洋出版社, 2004]
- Conover DO, Baumann H. The role of experiments in understanding fishery-induced evolution. *Evolutionary Applications*, 2009a, 2(3): 276–290
- Conover DO, Munch SB, Arnott SA. Reversal of evolutionary downsizing caused by selective harvest of large fish. *Proceedings Biological Sciences*, 2009b, 276(1664): 2015–2020
- Conover DO, Munch SB. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science*, 2002, 297(5578): 94–96
- Cooke SJ, Suski CD, Ostrand KG, *et al.* Physiological and behavioral consequences of long-term artificial selection for vulnerability to recreational angling in a teleost fish. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2007, 80(5): 480
- Cooper, Edwin L. Growth of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brown trout (*Salmo trutta*) in the Pigeon River. *Michigan Academy of Science*, 1953, 38: 151–161
- Cuveliers EL, Volckaert FA, Rijnsdorp AD, *et al.* Temporal genetic stability and high effective population size despite fisheries-induced life-history trait evolution in the North Sea sole. *Molecular Ecology*, 2011, 20(17): 3555–3568
- Dercole F, Rossa FD. A deterministic eco-genetic model for the short-term evolution of exploited fish stocks. *Ecological Modelling*, 2017, 343: 80–100
- Diaz PB, Wiech M, Heino M, *et al.* Opposite selection on behavioural types by active and passive fishing gears in a simulated guppy *Poecilia reticulata* fishery. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(3): 1030–1045
- Dieckmann U, Heino M. Probabilistic maturation reaction norms: Their history, strengths, and limitations. *Marine Ecology Progress*, 2007, 335(4): 253–269
- Dunlop ES, Eikeset AM, Stenseth NC. From genes to populations: How fisheries-induced evolution alters stock productivity? *Ecological Applications*, 2015, 25(7): 1860–1868
- Dunlop ES, Heino M, Dieckmann U. Eco-genetic modeling of contemporary life-history evolution. *Ecological Applications: A Publication of the Ecological Society of America*, 2009, 19(7): 1815–1834
- Edeline E, Carlson SM, Stige LC, *et al.* Trait changes in a harvested population are driven by a dynamic tug-of-war between natural and harvest selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(40): 15799–15804
- Edley MT, Law R. Evolution of life histories and yields in experimental populations of *Daphnia magna*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1988, 34(4): 309–326
- Eikeset AM, Richter A, Dunlop ES, *et al.* Economic repercussions of fisheries-induced evolution. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(30): 12259–12264
- Elmer KR. Genomic tools for new insights to variation, adaptation, and evolution in the salmonid fishes: A perspective for charr. *Hydrobiologia*, 2016, 783(1): 191–208
- Enberg K, Jørgensen C, Dunlop ES, *et al.* Fishing-induced evolution of growth: Concepts, mechanisms and the empirical evidence. *Marine Ecology*, 2012, 33(1): 1–25
- Enberg K, Jørgensen C, Dunlop ES, *et al.* Implications of fisheries-induced evolution for stock rebuilding and recovery. *Evolutionary Applications*, 2009, 2(3): 394–414
- Engelhard GH, Heino M. Maturity changes in Norwegian spring-spawning herring *Clupea harengus*: Compensatory or evolutionary responses? *Marine Ecology Progress*, 2004, 272(3): 245–256
- Fan W, Cheng YH, Shen XQ. Effects of global environment change and human activity on fishery resources. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 91–94 [樊伟, 程炎宏, 沈新强. 全球环境变化与人类活动对渔业资源的影响. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 91–94]
- Feiner ZS, Chong SC, Knight CT, *et al.* Rapidly shifting maturation schedules following reduced commercial harvest in a freshwater fish. *Evolutionary Applications*, 2015, 8(7): 724–737
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome: 2016, 1–45
- Fu HY, Zhang YP, Fang CL, *et al.* Growth and structure analysis of *Macrobrachium nipponensis* exploited population in Poyang Lake. *Jiangxi Fishery Science and Technology*, 2015(3): 17–20 [付辉云, 张燕萍, 方春林, 等. 鄱阳湖日本沼虾捕捞种群生长与结构分析. *江西水产科技*, 2015(3): 17–20]
- Garcia SM. The ecosystem approach to fisheries: Issues, terminology, principles, institutional foundations, implementation and outlook. *FAO Fisheries Technical Paper*, 2003, 443: 71
- Gobin J, Lester NP, Cottrill A, *et al.* Trends in growth and recruitment of Lake Huron lake whitefish during a period of ecosystem change, 1985 to 2012. *Journal of Great Lakes Research*, 2015, 41(2): 405–414
- Handegard NO, Tjøstheim D. When fish meet a trawling vessel: Examining the behaviour of gadoids using a free-floating buoy and acoustic split-beam tracking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2005, 62(10): 2409–2422
- Handford P, Bell G, Reimchen T. A gillnet fishery considered as an experiment in artificial selection. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1977, 34(7): 954–961
- Hard JJ, Gross MR, Heino M, *et al.* Evolutionary consequences of fishing and their implications for salmon. *Evolutionary Applications*, 2008, 1(2): 388–408
- Haugen TO, Vøllestad LA. A century of life-history evolution in grayling. *Genetica*, 2001, 112–113(1): 475–491
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, *et al.* Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(18): 11742–11747
- Heino M, Baulier L, Boukal DS, *et al.* Can fisheries-induced evolution shift reference points for fisheries management? *ICES Journal of Marine Science*, 2013, 70(4): 707–721
- Heino M, Pauli BD, Dieckmann U. Fisheries-induced evolution. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 2015, 46: 461–480
- Hsieh C, Yamauchi A, Nakazawa T, *et al.* Fishing effects on age and spatial structures undermine population stability of fishes. *Aquatic Sciences*, 2010, 72(2): 165–178
- Hutchings JA, Sherrylynn R. Consequences of sexual selection for fisheries-induced evolution: An exploratory analysis. *Evolutionary Applications*, 2010, 1(4): 645–649
- Hutchings JA. Collapse and recovery of marine fishes. *Nature*, 2000, 406(6798): 882–885
- Hutchings JA. Evolutionary biology: The cod that got away. *Nature*, 2004, 428(6986): 899–900
- Jørgensen C, Enberg K, Dunlop ES, *et al.* Managing evolving fish stocks. *Science*, 2007, 318(5854): 1247–1248
- Jørgensen C, Ernande B, Fiksen Ø. Size-selective fishing gear and life history evolution in the Northeast Arctic cod. *Evolutionary Applications*, 2009, 2(3): 356–370
- Jørgensen C, Holt RE. Natural mortality: Its ecology, how it shapes fish life histories, and why it may be increased by fishing. *Journal of Sea Research*, 2013, 75: 8–18
- Jørgensen T. Long-term changes in age at sexual maturity of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 1990, 46(3): 235–248
- Kokkonen E, Vainikka A, Heikinheimo O. Probabilistic maturation reaction norm trends reveal decreased size and age at maturation in an intensively harvested stock of pikeperch *Sander lucioperca*. *Fisheries Research*, 2015, 167: 1–12
- Kraak SBM. Does the probabilistic maturation reaction norm approach disentangle phenotypic plasticity from genetic change? *Marine Ecology Progress*, 2007, 335(2007): 295–300
- Kuparinen A, Boit A, Valdovinos FS, *et al.* Fishing-induced life-history changes degrade and destabilize harvested ecosystems. *Scientific reports*, 2016, 6: 22245–22253
- Kuparinen A, Hutchings JA. Consequences of fisheries-induced evolution for population productivity and recovery potential. *Proceedings Biological Sciences*, 2012, 279(1738): 2571–2579
- Kuparinen A, Merilä J. Detecting and managing fisheries-induced evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 2007, 22(12): 652–629
- Langard L, Skaret G, Jensen KH, *et al.* Tracking individual

- herring within a semi-enclosed coastal marine ecosystem: 3-dimensional dynamics from pre- to post-spawning. *Marine Ecology Progress*, 2015, 518: 267–279
- Laugen AT, Engelhard GH, Whitlock R, *et al.* Evolutionary impact assessment: Accounting for evolutionary consequences of fishing in an ecosystem approach to fisheries management. *Plant Systematics and Evolution*, 2014, 15(1): 65–96
- Leclerc M, Zedrosser A, Pelletier F. Harvesting as a potential selective pressure on behavioural traits. *Journal of Applied Ecology*, 2017, 54: 1941–1945
- Li L, Zhang GF. The stress adaptation of the marine fishery organisms under the view of genome and its key scientific problems. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2016, 31(12): 1347–1354 [李莉, 张国范. 基因组视域下海洋渔业生物对胁迫环境的适应策略研究. *中国科学院院刊*, 2016, 31(12): 1347–1354]
- Li ZY, Wu Q, Shan XJ, *et al.* Interannual variations in fish community structure in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 403–413 [李忠义, 吴强, 单秀娟, 等. 渤海鱼类群落结构的年际变化. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 403–413]
- Liang ZL, Sun P, Yan W, *et al.* Significant effects of fishing gear selectivity on fish life history. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(3): 467–471
- Lin Q, Wang J, Yuan W, *et al.* Effects of fishing and environmental change on the ecosystem of the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 619–629 [林群, 王俊, 袁伟, 等. 捕捞和环境变化对渤海生态系统的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 619–629]
- Liu QG, Shen JZ, Chen MK, *et al.* Advances of the study on the miniaturization of natural economical fish resources. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, 14(1): 79–83 [刘其根, 沈建忠, 陈马康, 等. 天然经济鱼类小型化问题的研究进展. *上海海洋大学学报*, 2005, 14(1): 79–83]
- Liu Y, Gao L, Feng JR. Research progress on population genomics of marine fishes. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 30–37 [柳莹, 高丽, 冯俊荣. 海洋鱼类种群基因组学研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 30–37]
- Marty L, Dieckmann U, Ernande B. Fisheries-induced neutral and adaptive evolution in exploited fish populations and consequences for their adaptive potential. *Evolutionary Applications*, 2015, 8(1): 47–63
- Mollet FM. Evolutionary effects of fishing and implications for sustainable management: A case study of North Seas plaice and sole. Doctoral Dissertation of Wageningen University, 2010
- Morbey YE, Mema M. Size-selective fishing and the potential for fisheries-induced evolution in lake whitefish. *Evolutionary Applications*, 2018, 11(8): 1412–1424
- Musick JA. Criteria to define extinction risk in marine fishes: American fisheries society initiative. *Fisheries*, 1999, 24(12): 6–14
- Ne HY, Liu JK, Su JP, *et al.* Progress in the study of animal life history evolution. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(10): 4267–4277 [聂海燕, 刘季科, 苏建平, 等. 动物生活史进化理论研究进展. *生态学报*, 2007, 27(10): 4267–4277]
- Neubauer P, Jensen OP, Hutchings JA, *et al.* Resilience and recovery of overexploited marine populations. *Science*, 2013, 340(6130): 347–349
- Olsen EM, Heino M, Lilly GR, *et al.* Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature*, 2004, 428(6986): 932–935
- O'Malley KG, Jacobson DP, Kurth R, *et al.* Adaptive genetic markers discriminate migratory runs of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) amid continued gene flow. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(8): 1184–1194
- Pardoe H, Vainikka A, Thórdarson G, *et al.* Temporal trends in probabilistic maturation reaction norms and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) on the Icelandic shelf. *Journal Canadien Des Sciences Halieutiques et Aquatiques*, 2009, 66(10): 1719–1733
- Pauli BD, Heino M. What can selection experiments teach us about fisheries-induced evolution? *Biological Journal of the Linnean Society*, 2014, 111(3): 485–503
- Perez-Rodriguez A, Morgan J, *et al.* Disentangling genetic change from phenotypic response in reproductive; parameters of Flemish Cap cod *Gadus morhua*. *Fisheries Research*, 2013, 138(3): 62–70
- Philipp DP, Claussen JE, Koppelman JB, *et al.* Fisheries-induced evolution in largemouth bass: Linking vulnerability to angling, parental care, and fitness. *Black Bass Diversity: Multidisciplinary Science for Conservation*, 2015, 83: 223–234
- Philipp DP, Cooke SJ, Claussen JE, *et al.* Selection for vulnerability to angling in largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2009, 138(1): 189–199
- Pinsky ML, Palumbi SR. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*, 2014, 23(1): 29–39
- Pukk L, Kuparinen A, Järvi L, *et al.* Genetic and life-history changes associated with fisheries-induced population collapse. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(5): 749–760
- Quinn TP, Hodgson S, Flynn L, *et al.* Directional selection by fisheries and the timing of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) migrations. *Ecological Applications*, 2007, 17(3): 731
- Redpath TD, Cooke SJ, Robert A, *et al.* Life-history traits and energetic status in relation to vulnerability to angling in an experimentally selected teleost fish. *Evolutionary Applications*, 2009, 2(3): 312–323
- Ricker WE. Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1981, 38: 1636–1656
- Rijnsdorp AD, Grift RE, Kraak SB. Fisheries-induced adaptive change in reproductive investment in North Sea plaice (*Pleuronectes platessa*)? *Canadian Journal of Fisheries and*

- Aquatic Sciences, 2005, 62(4): 833–843
- Roff DA. Contributions of genomics to life-history theory. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(2): 116–125
- Rutter C. Natural history of the Quinnet salmon: A report on investigations in the Sacramento River, 1896–1901. *Bulletin of the United States Fish Commission*, 1902, 22: 65–141
- Shan XJ, Li ZL, Dai FQ, *et al.* Seasonal and annual variations in biological characteristics of small yellow croaker *Larimichthys polyactis* in the central and southern Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(6): 7–16 [单秀娟, 李忠炉, 戴芳群, 等. 黄海中南部小黄鱼种群生物学特征的季节变化和年际变化. *渔业科学进展*, 2011, 32(6): 7–16]
- Silva A, Faria S, Nunes C. Long-term changes in maturation of sardine, *Sardina pilchardus*, in Portuguese waters. *Scientia Marina*, 2013, 77(3): 429–438
- Sinclair AF, Swain DP, Hanson JM. Disentangling the effects of size-selective mortality, density, and temperature on length-at-age. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2002, 59(2): 372–382
- Spangler GR, Payne NR, Thorpe JE, *et al.* Responses of percids to exploitation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1977, 34(10): 1972–1982
- Sun P. A simulation study of impact of trawl selectivity on traits of fish life history. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [孙鹏. 拖网选择性对鱼类生活史性状影响的模拟研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Sutter DAH, Suski CD, Philipp DP, *et al.* Recreational fishing selectively captures individuals with the highest fitness potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(51): 20960–20965
- Swain DP. Life-history evolution and elevated natural mortality in a population of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Evolutionary Applications*, 2011, 4(1): 18–29
- Therkildsen NO, Hemmer-Hansen J, Als TD, *et al.* Microevolution in time and space: SNP analysis of historical DNA reveals dynamic signatures of selection in Atlantic cod. *Molecular Ecology*, 2013, 22(9): 2424–2440
- Uusi-Heikkilä S, Savilampi T, Leder E, *et al.* Rapid, broad-scale gene expression evolution in experimentally harvested fish populations. *Molecular Ecology*, 2017, 26(15): 3954–3967
- Uusi-Heikkilä S, Whiteley AR, Kuparinen A, *et al.* The evolutionary legacy of size - selective harvesting extends from genes to populations. *Evolutionary Applications*, 2015, 8(6): 597–620
- Uusi-Heikkilä S, Wolter C, Klefoth T, *et al.* A behavioral perspective on fishing-induced evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 2008, 23(8): 419–421
- van Wijk SJ, Taylor MI, Creer S, *et al.* Experimental harvesting of fish populations drives genetically based shifts in body size and maturation. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2013, 11(4): 181–187
- Walraven LV, Mollet FM, Damme CJGV, *et al.* Fisheries-induced evolution in growth, maturation and reproductive investment of the sexually dimorphic North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Journal of Sea Research*, 2010, 64(1–2): 85–93
- Walsh MR, Munch SB, Chiba S, *et al.* Maladaptive changes in multiple traits caused by fishing: Impediments to population recovery. *Ecology Letters*, 2006, 9(2): 142–148
- Wang HY, Höök TO. Eco-genetic model to explore fishing-induced ecological and evolutionary effects on growth and maturation schedules. *Evolutionary Applications*, 2009, 2(3): 438–455
- Yang L. Effect of fishing gear and fishing method on benthic community and habitat. *Modern Fisheries Information*, 2005, 20(3): 15–17 [杨吝. 渔具渔法对底栖群落(Benthic Community)及其栖息地(Habitat)的影响. *渔业信息与战略*, 2005, 20(3): 15–17]
- Zhan BY, Lou DC, Zhong JS. An assessment of the filefish population and rational exploitation of the resource. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10(4): 409–418 [詹秉义, 楼冬春, 钟俊生. 绿鳍马面鲀资源评析与合理利用. *水产学报*, 1986, 10(4): 409–418]
- Zhan BY. Fishery resources assessment. Beijing: China Agriculture Press, 1995 [詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995]
- Zhang B. Feeding ecology of fishes in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 11–22 [张波. 渤海鱼类的食物关系. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 11–22]
- Zhu CD, Zhong S. Biology and fishery significance of fish breeding and conservation in large and medium lakes in China. *Fisheries Science and Technology Information*, 1979, 8: 2–5 [朱成德, 钟世. 论我国大中型湖泊鱼类资源繁殖保护的生物学及其渔业意义. *水产科技情报*, 1979, 8: 2–5]
- Zhu XG, Fang YY, Yan LJ, *et al.* The ecological strategy evolution of marine fishes under high intensity fishing environment. *Bulletin of Science and Technology*, 2009, 25(1): 51–55 [朱晓光, 房元勇, 严力蛟, 等. 高捕捞强度环境下海洋鱼类生态对策的演变. *科技通报*, 2009, 25(1): 51–55]
- Zhu WJ, Liang ZL, Xu BD. Preliminary study on the trawl fishing induced phenotypic traits selection differential in fish. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(1): 95–102 [朱伟俊, 梁振林, 徐宾铎. 拖网选择性引起的鱼类表型性状选择差的初步研究. *海洋湖沼通报*, 2007(1): 95–102]
- Zimmermann F, Jørgensen C. Bioeconomic consequences of fishing-induced evolution: A model predicts limited impact on net present value. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2015, 72(4): 612–624

Progress in the Study of Fishing-Induced Evolution of Fish Biological Characteristics

SHAN Xiujuan^{1,2①}, HU Zhijun^{1,3}, SHAO Changwei^{1,2}, TANG Zheng^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-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 With the increase of fishing intensity, fish gradually evolve to adapt in response to fishing pressures to maintain the reproduction of the population. This process is called fishing-induced evolution (FIE). Nowadays, many fish in the world have evolved these biological characteristics. For example, Atlantic cod (*Gadus morhua*), small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) and other fish became smaller size and earlier mature. These lead to further the simplification of fish population structure, the decline of ecosystem stability and the reduction of fishing economic benefits, finally FIE seriously affects the sustainable development of fish resources in many countries. Therefore, it is essential to recognize the fishing-induced adaptive evolution and grasp the mechanism of fishing effects on fish resources, in order to formulate a scientific and rational strategy for recovery and management of fishing resources. Although FIE has caused wide concerns, the mechanisms underlying the impact of fishing on physiological, ecological and genetic characteristics of fish are not clear, especially in the dynamic environment of climate change and multi-species interactions. The role of FIE is more complex due to a number of influencing factors and the complex evolutionary process. The existing studies mainly focus on fishing-induced changes in fish biological traits, computer-simulated population resilience and fish resource management strategies, but rarely on the mechanisms of FIE. Here, we reviewed the main research methods of fish FIE including methods of field ecology, experimental ecology, numerical simulation, and genetics. We summarized the related research results that fishing affects fish body length, sexual maturity, behavior and other factors, by selecting the larger individuals caught by the most important kind of fishing, bottom trawling, and analyzed the effects on the fish population recovery and management of fish stocks. Finally, we concluded that the key scientific problems to be solved, in order to provide help for further FIE research and scientific management of fish resources.

Key words Fish; FIE; Fisheries resource; Biological characteristics; Evolutionary impact assessment

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200218001

http://www.yykxjz.cn/

温海深, 张莹, 冯启超, 侯志帅, 齐鑫, 李昀. α -黑素细胞刺激素及黑皮质素受体-4 在能量平衡和繁殖中的功能研究. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 176-183

Wen HS, Zhang Y, Feng QC, Hou ZS, Qi X, Li Y. The functions of α -melanocyte stimulating hormone and melanocortin-4 receptor during energy homeostasis and reproduction. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 176-183

α -黑素细胞刺激素及黑皮质素受体-4 在能量平衡和繁殖中的功能研究*



温海深¹ 张莹¹ 冯启超² 侯志帅¹ 齐鑫¹ 李昀¹

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003; 2. 全国水产技术推广总站 北京 100125)

摘要 阿片黑素促皮质激素原(POMC)是黑皮质激素的前体物质,在机体中广泛分布。近年来,POMC及其衍生物黑素细胞刺激素(MSH)和黑皮质素受体-4(MC4R)在能量稳态和繁殖活动中的作用备受关注。研究发现,POMC神经元及其加工后的产物对摄食和体重的调节具有重要作用。此外,POMC神经元在下丘脑中与GnRH神经元紧密接触,由其产生的神经递质和神经肽可能对GnRH神经元具有重要的输入作用,从而直接或间接地调控下丘脑-垂体-性腺轴(HPG)中繁殖相关激素的合成并影响生殖活动。本文综述了黑皮质素系统对能量稳态和繁殖活动的调控作用以及目前MC4R在硬骨鱼类中的药理学研究,以期其能够在动物的生长发育和繁殖中具有应用前景。

关键词 阿片黑素促皮质激素原; α -黑素细胞刺激素; 黑皮质素受体-4; 能量稳态; 繁殖
中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0176-08

近年来,黑皮质素(Melanocyte-stimulating hormone, MSH)系统备受关注,作为阿片黑素促皮质激素原(POMC)衍生物,在色素沉着、摄食、能量稳态、免疫调节以及繁殖活动中起着重要的作用(史学营等, 2015; Chen *et al*, 2017; Carter *et al*, 2018; Clément *et al*, 2018; Matsuda *et al*, 2018),特别是其对能量平衡的调节作用,使之成为研究热点。通过定位 POMC 神经元及其衍生物在下丘脑中的分布位置及配受体结合的药理学分析(Tao, 2010),发现黑皮质素系统可能通过调节下丘脑-垂体-性腺轴(HPG)从而对垂体中促性腺激素(Gth)的合成产生影响以调节生殖活动。然而,此类研究多集中于哺乳动物中,缺乏在低等脊椎动物中的相关研究。本文基于黑皮质素系统在物种间的保守性以及当前研究中对其在能量稳态和繁殖活

动中的调控实验,重点论述了 POMC、 α -黑素细胞刺激素(α -MSH)以及黑皮质素受体-4(MC4R)在哺乳动物和鱼类中对能量稳态和繁殖活动的调节作用。

1 阿片黑素促皮质激素原

POMC 是黑皮质激素的前体物质,在机体中分布广泛,在脑、垂体和性腺中均有表达,特别是下丘脑弓状核中有大量表达(Kineman *et al*, 1989; 杜富宽等, 2017),经组织特异性转录调控加工成不同的衍生物。

1.1 POMC 在能量稳态中的作用

POMC 神经元作为能量稳态的中央调节器(Cone, 1999),对摄食和能量平衡的调控作用一直备受关注。Cheung 等(1997)在弓状核的 POMC 神经元中检测到

* 国家自然科学基金项目(41676216; 41976089)资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41676216; 41976089)]

① 通讯作者: 温海深, 教授, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-02-18, 收修改稿日期: 2020-03-23

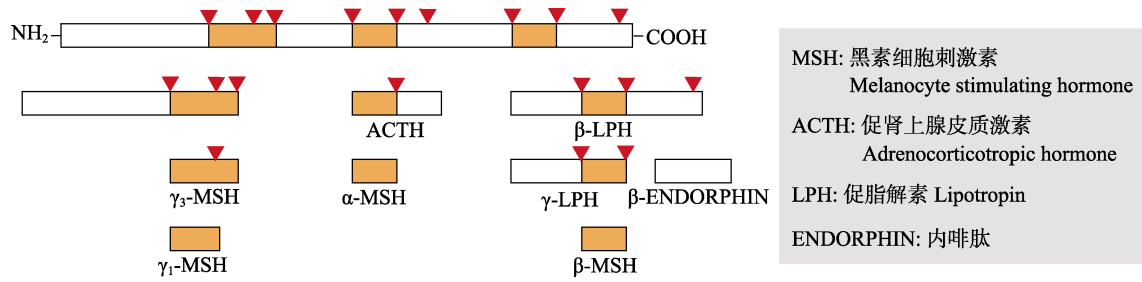


图 1 POMC 翻译后加工产物

Fig.1 Post-translational processing of POMC (Butler *et al.*, 2017)

瘦素表达; Caron 等(2018)发现动物处于饥饿状态时,瘦素和 POMC 表达水平下降,摄食量增加。POMC 与肥胖息息相关,研究发现,POMC 突变患者出现早发性肥胖(Krude *et al.*, 1998);敲除 POMC 后,采用瘦素治疗也不能降低体重(Chhabra *et al.*, 2016)。由此说明,POMC 可能作为瘦素调控能量稳态的中介物质调节摄食和体重。

1.2 POMC 在繁殖活动中的功能

POMC 除在能量调控中发挥重要作用外,在生殖活动中的作用也不可忽视。光镜和电镜下观察到 GnRH 的轴突末端与 POMC 细胞体并置(Sotonyi *et al.*, 2010)。POMC 神经元还可能通过 Kisspeptin 中间神经元影响 GnRH 的表达(Backholler *et al.*, 2010)。Higo 等(2016)在下丘脑弓状核中定位 Kisspeptin 发现,Kiss1r 表达神经元中分布着大约 63% 的 POMC 神经元。因此,POMC 与 GnRH 神经元在脑中的位置分布表明,POMC 神经元可能对 GnRH 神经元具有重要的输入作用,它能够直接或间接地参与中枢神经系统中生殖功能的调控。目前,已通过脑内室注射(Intracerebroventricular injection, ICV)和基因敲除技术对 POMC 神经元在 HPG 轴中的作用进行探究。大鼠(*Rattus norvegicus*) ICV 注射促性腺激素抑制激素(GnIH)降低了 GnRH 和 POMC 的表达水平(司丽娜等, 2017); POMC 基因敲除小鼠(*Mus musculus*)的产仔率有显著下降(Faulkner *et al.*, 2015), POMC 可能通过与 GnRH 神经元相互联系,从而调控 HPG 轴中激素的合成而影响繁殖。

除神经肽外, POMC 神经元释放的神经递质 GABA 和谷氨酸也显示出了对 GnRH 神经元的调节作用(Kuehl-Kovarik *et al.*, 2002)。综上, POMC 神经元及其释放的神经肽和神经递质均可能通过直接或间接的作用调节 GnRH 的表达,进而作用于繁殖功能,但此类研究目前多集中在哺乳动物中,且其作用机制还有待进一步研究。

2 黑素细胞刺激素(α -MSH)

MSH 包含 α -、 β -、 γ -和 δ -MSH,由 POMC 经组织特异性翻译加工而成,对色素沉着、摄食和能量稳态、免疫调节以及繁殖等生理活动具有重要作用(Cone, 2006; 朱学武等, 2017)。由于 γ -MSH 与受体的结合率较低(Tao, 2010), δ -MSH 仅在软骨鱼中发现(Dores *et al.*, 2003),且 β -MSH 发现时间较晚(Mayer *et al.*, 2005),对此研究较少。目前,关于黑素细胞刺激素的研究多集中于 α -MSH。因此,本文仅论述了 α -MSH 对能量稳态和繁殖活动的调控作用。研究表明, α -MSH 在中枢神经系统表达量较高,主要包括背侧、外侧下丘脑以及弓状核(包新民等, 1990)。同时,在垂体、皮肤、胃肠道及性腺中也检测到 α -MSH 的分布,但表达量较低(Bardin *et al.*, 1987; 何英等, 2013)。

2.1 α -MSH 在能量稳态中的功能

哺乳动物中, Leptin-Melanocortin 系统是调控能量平衡的重要系统。脂肪组织分泌的瘦素穿过血脑屏障,与位于下丘脑(特别是弓状核)的瘦素受体结合(Lee, 2009)。此后,瘦素受体激活 α -MSH 神经元活性,刺激下丘脑弓状核分泌 α -MSH。与此同时,分泌刺鼠相关蛋白(Agouti-related protein, AgRP)的神经元被抑制, AgRP 的合成与分泌减少(Ramos-Molina *et al.*, 2016)。 α -MSH 和 AgRP 具有相互拮抗的生理功能,二者的动态平衡是有机体保证能量平衡的重要保障之一(图 2)。

鱼类中 α -MSH 相关研究结果与哺乳动物一致。 α -MSH 合成障碍的虹鳟出现食欲亢进、肝脏肿大和腹腔脂肪堆积现象(Yada *et al.*, 2002)。给予金鱼(*Carassius auratus*)ICV 注射 NDP- α -MSH(α -MSH 的高效类似物),观察到剂量依赖性的抑制食物摄入,且在中脑定位到了 α -MSH 的免疫性反应,发现 α -MSH 可能通过促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)信号通路抑制食物摄入(Cerdá-Reverter *et al.*, 2003a;

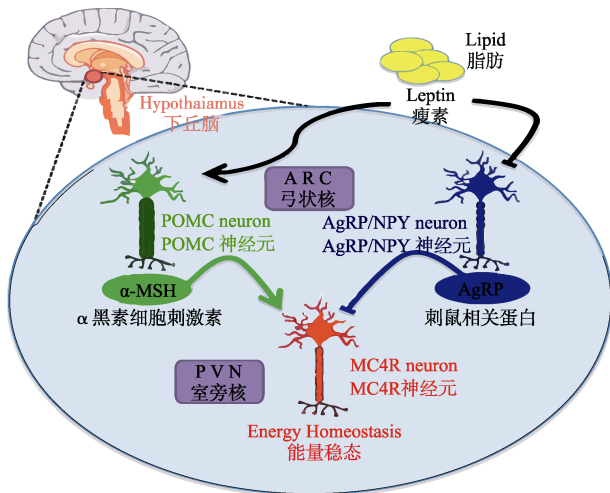


图2 瘦素-黑皮质素调控能量代谢

Fig.2 Leptin-melanocortin pathway to regulate energy homeostasis (Ramos-Molina *et al.*, 2016)

Matsuda *et al.*, 2008)。

2.2 α -MSH 在繁殖活动中的功能

α -MSH 也参与繁殖活动的调控,早期研究多集中在哺乳动物中。用 α -MSH 多肽刺激小鼠卵巢,卵巢内孕酮(P)含量显著增加(Durando *et al.*, 1998); ICV 注射 α -MSH 能够影响小鼠的性行为(Thody *et al.*, 1979),并且能够降低卵巢摘除小鼠中下丘脑和垂体组织中的 GnRH、LH 和 FSH 的表达水平(杨松鹤等, 2010)。随后发现, α -MSH 紧邻 GnRH 和 Kisspeptin 神经元(Cardoso *et al.*, 2015), α -MSH 处理可以激活 70% 的 GnRH 神经元(Roa *et al.*, 2012)。上述实验证实, α -MSH 除可以在中枢神经系统 and 外周组织中直接调控 HPG 轴,也可通过 Kisspeptin 间接调控生殖活动。

硬骨鱼类中的研究证实, α -MSH 在鱼类中同样能够调控 HPG 轴,表明其调控繁殖的生理功能具有物种间的保守性。在欧洲狼鲈(*Dicentrarchus labrax*) 和黑鲷(*Sparus aurata*) 的卵泡颗粒细胞及卵原细胞的胞浆中发现 α -MSH,且在繁殖期表达水平最高(Mosconi *et al.*, 1994),推测 α -MSH 在鱼类卵巢组织中可能直接调控性类固醇激素的合成,从而影响卵泡成熟和排卵。

3 黑皮质素受体-4(MC4R)

黑皮质素受体-4(Melanocortin-4 receptor, MC4R) 主要在下丘脑的室旁核(Paraventricular nucleus, PVN) 表达。作为 α -MSH 的重要受体之一,能够调控摄食与能量稳态、糖类与脂质代谢、心血管功能和繁殖等多种生理活动(Chen *et al.*, 2017; Huszar *et al.*, 1997;

Nogueiras *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008)。人类的 MC4R 由 332 个氨基酸编码而成,是典型的 G 蛋白偶联受体(GPCR),具有 7 个跨膜螺旋结构域(Gantz *et al.*, 1993),其 N 端和 C 端分别位于细胞外和细胞内,内环和外环较短,使之成为 GPCR 超家族中最短的成员之一(Tao, 2010)。目前,已在人、狗、猫、猪等哺乳类动物和鱼、鸡、鸽子等非哺乳动物中克隆得到 MC4R 序列(Tao, 2010),其在物种间高度保守。除 MC4R 外,在高等哺乳动物中,还观察到 MC3R 也是 α -MSH 的受体。MC3R 与 MC4R 在下丘脑中高水平表达,共同参与能量调节,二者的功能并不重合。MC3R 主要调节摄食行为和摄食效率,而 MC4R 主要调节摄食量和能量消耗(Tao, 2010)。在硬骨鱼类中,早期观点认为,硬骨鱼类的 MC3R 在进化过程中丢失,仅保留 MC4R 调控鱼类的能量代谢(Cortés *et al.*, 2014)。近年来,部分硬骨鱼类的基因组数据鉴定出 MC3R(Logan *et al.*, 2003),但其生理学功能与药理学特征尚需进一步研究。

3.1 MC4R 信号通路

MC4R 的经典信号通路是与异源 G 蛋白三聚体偶联(Mountjoy *et al.*, 2001),MC4R 被激动剂,如 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSH、ACTH 激活后,引起环腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, AC)活化,使细胞内环磷酸腺苷酸(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)增加,进而激活下游的蛋白激酶 A(PKA),PKA 催化蛋白质的磷酸化,进而调控蛋白质功能。与此同时,被 PKA 激活的某些蛋白可以作为转录因子,进入细胞核激活或抑制相关基因的转录,从而调节细胞功能。除 GPCRs 经典的 Gs-cAMP-PKA 通路外,MC4R 还能够激活丝裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶(MEK-ERK1/2)信号通路。早期实验观察到,MTII 诱导的抑制食物摄入依赖于 MEK-ERK1/2 信号通路(Sutton *et al.*, 2005)。在稳定表达的人 MC4R 的中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞中,MEK-ERK1/2 信号通路可以被 NDP- α -MSH 激活,并表现出时间和剂量依赖性(Vongs *et al.*, 2004),从而调节下游蛋白功能或相关基因的转录。

3.2 MC4R 组织分布

MC4R 研究较为广泛,早期在小鼠的丘脑、下丘脑及海马体中观察到了 MC4R 的分布(Mountjoy *et al.*, 1994)。后续研究发现,MC4R 不仅存在于中枢神经系统中,也在外周组织中表达。哺乳动物中,MC4R 在脑中的表达量显著高于其他组织,外周组织如在小

鼠、山羊和猪的性腺、肌肉、肾和心脏中也有少量表达(Mountjoy *et al.*, 2003; 张子军等, 2012; 何夏萍等, 2013)。禽类中, MC4R 在脑中与外周组织中的表达量差异不显著, 在鸡、鸭、鹅的脑、脂肪、肾、胃和肠中均有较高表达(Takeuchi *et al.*, 1998; 王婕等, 2011; 原昊等, 2011)。MC4R 在低等脊椎动物中的组织表达模式区别较大。例如, 角鲨(*Squalus acanthias*)的 MC4R 只在脑中表达(Ringholm *et al.*, 2003), 而在其他多种鱼类中, 除在脑中表达外, 外周组织中也检测到了 MC4R 的分布, 如金鱼(Cerdá-Reverter *et al.*, 2003a)、条斑星鲈(*Verasper moseri*)(Kobayashi *et al.*, 2008)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)(Zhang *et al.*, 2019)及金钱鱼(*Scatophagus argus*)(Li *et al.*, 2016)的性腺、肝脏和垂体中均有 MC4R 的表达。然而, MC4R 在斑马鱼(*Danio rerio*)的眼中也有分布(Ringholm *et al.*, 2002), 而上述鱼类的眼中未检测到 MC4R 的表达。MC4R 在脑、胃、肠中的分布, 表明其能够参与摄食和能量稳态的调控作用。在哺乳动物和鱼类中性腺的分布, 推测其可能对生殖活动产生影响。但 MC4R 的表达具有一定的组织特异性及物种特异性, 其在外周组织中的功能还有待进一步研究。

3.3 MC4R 在能量稳态中的功能

MC4R 作为瘦素介导食欲调节的最末端基因, 在摄食和能量稳态中的功能备受关注。Huszar 等(1997)发现, 敲除 MC4R 基因的小鼠食欲旺盛, 体重增加。Williams 等(2002)将 MC4R 的激动剂 MTII 对小鼠进行 ICV 注射, 发现其能抑制摄食, 而随后注射的抑制剂 SHU9119 缓解了这一现象。在瘦素基因敲除的小鼠中注射 MC4R 的激动剂, 观察到小鼠食欲减退, 体重下降(Clément *et al.*, 2018)。上述研究表明, MC4R 不但在瘦素调控能量稳态的过程中起到中介介质的作用, 还能够直接调控摄食、减少体重。

在硬骨鱼中关于 MC4R 对摄食的调控也有研究。给予金鱼和虹鳟 ICV 注射 MTII, 观察到食物摄入被抑制; 而注射 MC4R 特异性拮抗剂 HS024 会增加食物摄入(Cerdá-Reverter *et al.*, 2003b; Schjolden *et al.*, 2009)。齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)经过短期禁食后, 脑中 MC4R 的表达量显著增加(Wei *et al.*, 2013)。在处于食物短缺环境中的墨西哥洞穴鱼(*Astyanax mexicanus*)中发现, 其 MC4R 基因的保守残基出现了突变, 该突变增加了墨西哥洞穴鱼抗饥饿的能力以及对黑暗环境的适应能力(Aspiras *et al.*, 2015)。此外, 在 MC4R 的药理学研究中发现, MC4R 的反向激动剂(Inverse agonist)可以降低鱼类 MC4R

的组成性活性, 刺激鱼类摄食, 为养殖带来更高的效益。在黄鳝(*Monopterus albus*)中发现 1 种小分子物质 ML00253764, 可以作为 MC4R 的反向激动剂(Yi *et al.*, 2018)。小分子配体可以直接与饵料混合, 避免肌肉注射对鱼类的胁迫。然而, 目前 ML00253764 的生产成本较高, 制约了其在养殖中的应用(Yi *et al.*, 2018)。如若今后可以鉴定出廉价、高效的鱼类 MC4R 小分子反向激动剂, 则有进一步应用前景。

3.4 MC4R 在繁殖活动中的功能

MC4R 在繁殖调控中的生理功能研究较少, 且主要集中在哺乳动物中。实验发现, AgRP 过表达导致成年小鼠不育(Granhölm *et al.*, 1986); 通过基因敲降技术得到的 MC4R 缺陷的雄性小鼠除表现出肥胖外, 其勃起功能受损, 性行为受到影响(van der Ploeg *et al.*, 2002); MC4R 缺陷雌性小鼠发情周期不规律(Chen *et al.*, 2017), 且出现排卵率和受精率下降及早衰现象(Sandrock *et al.*, 2009)。为进一步明确 MC4R 是否参与繁殖过程, 对妊娠小鼠下丘脑弓状核中 MC4R 的含量进行了测定, 结果显示, 在妊娠早期, MC4R 的表达量较高, 随着妊娠进行, 表达水平下降(Asadi-Yousefabad *et al.*, 2015), 表明 MC4R 除影响性功能及性行为外, 也参与到妊娠的维持过程。但 Stanley 等(1999)研究发现, 给予小鼠 ICV 注射 MC4R 的抑制剂刺鼠相关蛋白(AgRP)后, GnRH、LH 和 FSH 的表达水平上升, 且在小鼠子宫内, MC4R 和雌激素(E₂)呈负相关(Cheung *et al.*, 2001)。这与之前所述结果不同, 可能与 MC4R 激动剂或抑制剂的浓度相关, 然而具体原因还未得到实验验证, 有待进一步探究。

在硬骨鱼中(如条斑星鲈、金鱼、金钱鱼), 大量实验观察到 MC4R 在性腺中表达量较高(Cerdá-Reverter *et al.*, 2003a; Li *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2008), 推测其参与繁殖调控。同时, 近期实验观察到黄鳝 MC4R 的表达具有性别特异性。雌性黄鳝脑和性腺的 MC4R 基因表达显著高于雄性, 推测 MC4R 参与大脑雌雄二象性的调控和性腺的分化与发育(Yi *et al.*, 2018)。此外, 在金钱鱼中, 使用 MC4R 的激动剂 THIQ 刺激体外培养的脑和垂体, 发现其能够促进 GnRH、LH β 和 FSH β 的表达, 而拮抗剂 SHU9119 作用相反, 表明 MC4R 除能够作用于 GnRH 调控生殖活动外, 也可以直接作用于垂体调节 Gth 的分泌(Jiang *et al.*, 2017)。

3.5 MC4R 的其他生理功能

哺乳动物中, 对 MC4R 的研究较为广泛, 除上述在能量稳态和繁殖活动中的调控作用外, 其在心血

管系统及糖类和脂质代谢中的功能也受到关注,如注射 MC4R 拮抗剂的小鼠和猕猴(*Macaca arctoides*)心率和动脉压下降(Tallam *et al.*, 2004; Kievit *et al.*, 2013), MC4R 敲除小鼠脂质的吸收和甘油三酸酯的合成增加,白色脂肪组织中脂肪积累,而注射 MTII 的小鼠脂肪利用率增加,脂肪形成减少(Nogueiras *et al.*, 2007)。由于鱼类在生理结构上与哺乳动物有较大差别,其组织和器官的分化不显著,目前,在鱼类中未有关于 MC4R 在心血管系统及糖类和脂质代谢中功能的研究。

4 总结与展望

黑皮质素系统在色素沉着、摄食和能量稳态、免疫调节以及繁殖等生理活动中具有重要作用。目前,关于黑皮质素系统中 α -MSH 和 MC4R 对能量稳态和繁殖活动调控作用的研究和应用还不充分,仍存在较多未知。能否开发出廉价的新型小分子配体作为 MC4R 的反向激动剂,促进养殖动物增加体重? MC4R 被配体激活后对 HPG 轴是否存在负反馈调控? MC4R 在种间的组织表达模式存在较大差异,其对繁殖活动的调控能力是否存在物种特异性? 随着基因敲除技术和药理学的不断发展,今后可以更加深入地探索其在能量稳态和繁殖活动中的调节通路和作用机理,并将研究结果充分应用于实际生产,以期其在动物的生长发育和遗传育种中具有更加广阔的应用前景。

参 考 文 献

- Asadi-Yousefabad SL, Sarvestani FS, Tamadon A, *et al.* Agouti-related peptide and melanocortin-4 receptor mRNAs expressions in arcuate nucleus during the pregnancy and lactation of rats. *Veterinarski Arhiv*, 2015, 85(6): 689–700
- Aspiras AC, Rohner N, Martineau B, *et al.* Melanocortin 4 receptor mutations contribute to the adaptation of cavefish to nutrient-poor conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(31): 9668–9673
- Backholer K, Smith JT, Rao A, *et al.* Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 2010, (5): 2233–2243
- Bao XM, Shu SY. Comparison and distributions of the perikaryal and fibers of the pro-opiomelanocortin derived peptidergic neurons (ACTH, β -END, α -MSH) in the rat hypothalamus. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 1990, 6(1): 43–48 [包新民, 舒斯云. 大鼠下丘脑中前阿黑皮素来源的肽能神经元(ACTH, β -END, α -MSH)胞体和纤维的分布和比较. *神经解剖学杂志*, 1990, 6(1): 43–48]
- Bardin CW, Chen CL, Morris PL, *et al.* Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 1987, 43: 1–28
- Butler AA, Girardet C, Mavrikaki M, *et al.* A life without hunger: The ups (and downs) to modulating melanocortin-3 receptor signaling. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11: 128
- Cardoso RC, Alves BRC, Sharpton SM, *et al.* Nutritional programming of accelerated puberty in heifers: Involvement of pro-opiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 2015, 27(8): 647–657
- Caron A, Dungan Lemko HM, Castorena CM, *et al.* POMC neurons expressing leptin receptors coordinate metabolic responses to fasting via suppression of leptin levels. *Elife*, 2018, 7: e33710
- Carter DW, Sood RF, Seaton ME, *et al.* MC1R gene polymorphisms are associated with dysfunctional immune responses and wound infection after burn injury. *Journal of Surgical Research*, 2018, 231: 448–452
- Cerdá-Reverter JM, Ringholm A, Schiöth HB, *et al.* Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: Involvement in the control of food intake. *Endocrinology*, 2003a, 144(6): 2336–2349
- Cerdá-Reverter JM, Schiöth HB, Peter RE. The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regulatory Peptides*, 2003b, 115(2): 101–113
- Chen X, Huang L, Tan HY, *et al.* Deficient melanocortin-4 receptor causes abnormal reproductive neuroendocrine profile in female mice. *Reproduction*, 2017, 153(3): 267–276
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, 1997, 138(10): 4489–4492
- Cheung CC, Thornton JE, Nurani SD, *et al.* A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 2001, 74(1): 12–21
- Chhabra KH, Adams JM, Jones G, *et al.* Hypothalamic pomc-deficiency impairs the function of leptin to decrease food intake and bodyweight. *FASEB Journal*, 2016, 30(1): 1293
- Clément K, Biebermann H, Farooqi IS, *et al.* MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nature Medicine*, 2018, 24(5): 551–555
- Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine Reviews*, 2006, 27(7): 736–749
- Cone RD. The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1999, 10(6): 211–216
- Cortés R, Navarro S, Agulleiro MJ, *et al.* Evolution of the melanocortin system. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 209: 3–10
- da Silva AA, Carmo JMD, Kanyicska B, *et al.* Endogenous melanocortin system activity contributes to the elevated

- arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2008, 51(4): 884–890
- Dores RM, Cameron E, Lecaude S, *et al.* Presence of the delta-MSH sequence in a proopiomelanocortin cDNA cloned from the pituitary of the galeoid shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 133(1): 71–79
- Du FK, Xu GC, Li Y, *et al.* Cloning of *POMC* cDNA and the stress response in *Coilia nasus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 231–238 [杜富宽, 徐钢春, 黎燕, 等. 刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 克隆及其应激应答. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 231–238]
- Durando PE, Celis ME. In vitro effect of α -MSH administration on steroidogenesis of prepubertal ovaries. *Peptides*, 1998, 19(4): 667–675
- Faulkner LD, Dowling AR, Stuart RC, *et al.* Reduced melanocortin production causes sexual dysfunction in male mice with *POMC* neuronal insulin and leptin insensitivity. *Endocrinology*, 2015, 156(4): 1372–1385
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, *et al.* Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(20): 15174–15179
- Granhölm NH, Jeppesen KW, Japs RA. Progressive infertility in female lethal yellow mice (*Ay/a*; strain C57BL/6J). *Journal of Reproduction and Fertility*, 1986, 76(1): 279–287
- He XP, Zhou YN, Yan ZX, *et al.* Molecular cloning and analysis and tissue distribution of melanocortin receptor 3 and 4 genes in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Sichuan University (Natural Science)*, 2013, 50(4): 899–907 [何夏萍, 周彦妮, 阎振鑫, 等. 猪黑皮质素受体 3 和 4 基因克隆及分析. *四川大学学报(自然科学版)*, 2013, 50(4): 899–907]
- He Y, Liao Y. Research progress on the anti-inflammatory effects of α -msh in the early stage of severe burns. *Medical Information*, 2013(21): 663 [何英, 廖毅. α -msh 在严重烧伤早期的抗炎作用研究进展. *医学信息*, 2013(21): 663]
- Higo S, Iijima N, Ozawa H. Characterisation of *Kiss1r* (*Gpr54*)-expressing neurones in the arcuate nucleus of the female rat hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 2016, 29(2)
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997, 88(1): 131–141
- Jiang DN, Li JT, Tao YX, *et al.* Effects of melanocortin-4 receptor agonists and antagonists on expression of genes related to reproduction in spotted scat, *Scatophagus argus*. *Journal of Comparative Physiology B*, 2017, 187(4): 603–612
- Kievit P, Halem H, Marks DL, *et al.* Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes*, 2013, 62(2): 490–497
- Kineman DR, Kraeling RR, Crim JW, *et al.* Localization of proopiomelanocortin (*POMC*) immunoreactive neurons in the forebrain of the pig. *Biology of Reproduction*, 1989, 40(5): 1119–1126
- Kobayashi Y, Tsuchiya K, Yamanome T, *et al.* Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(2): 280–287
- Krude H, Biebermann H, Luck W, *et al.* Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by *POMC* mutations in humans. *Nature Genetics*, 1998, 19(2): 155–157
- Kuehl-Kovarik MC, Pouliot WA, Halterman GL, *et al.* Episodic bursting activity and response to excitatory amino acids in acutely dissociated gonadotropin-releasing hormone neurons genetically targeted with green fluorescent protein. *Journal of Neuroscience*, 2002, 22(6): 2313–2322
- Lee YS. The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: Lessons from experiments of nature. *Annals of Academy of Medicine, Singapore*, 2009, 38(1): 34–111
- Li JT, Yang Z, Chen HP, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and pharmacological characterization of melanocortin-4 receptor in spotted scat, *Scatophagus argus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 230–231: 143–152
- Logan DW, Bryson-Richarson RJ, Taylor MS, *et al.* Sequence characterization of teleost fish melanocortin receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 994(1): 319–330
- Matsuda K, Kojima K, Shimakura S, *et al.* Corticotropin-releasing hormone mediates α -melanocyte-stimulating hormone-induced anorexigenic action in goldfish. *Peptides*, 2008, 29(11): 1930–1936
- Matsuda N, Kasagi S, Nakamaru T, *et al.* Left-right pigmentation pattern of Japanese flounder corresponds to expression levels of melanocortin receptors (MC1R and MC5R), but not to agouti signaling protein 1 (ASIP1) expression. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 262: 90–98
- Mayer JP, Hsiung HM, Flora DB, *et al.* Discovery of a β -MSH-derived MC-4R selective agonist. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48(9): 3095–3098
- Mosconi G, Carnevali O, Facchinetti F, *et al.* Ovarian melanotropic peptides and adaptation in two teleostean species: *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Peptides*, 1994, 15(5): 927–931
- Mountjoy KG, Jenny Wu CS, Dumont LM, *et al.* Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5488–5496
- Mountjoy KG, Kong PL, Taylor JA, *et al.* Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiological Genomics*, 2001, 5(1): 11–19
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, *et al.* Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular*

- Endocrinology, 1994, 8(10): 1298–1308
- Nogueiras R, Wiedmer P, Pereztilve D, *et al.* The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(11): 3475–3488
- Ramos-Molina B, Martin MG, Lindberg I. PCSK1 variants and human obesity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2016, 140: 47–74
- Ringholm A, Fredriksson R, Poliakova N, *et al.* One melanocortin 4 and two melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 82(1): 6–18
- Ringholm A, Klovin J, Fredriksson R, *et al.* Presence of melanocortin (MC4) receptor in spiny dogfish suggests an ancient vertebrate origin of central melanocortin system. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(2): 213–221
- Roa J, Herbison AE. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5587–5599
- Sandrock M, Schulz A, Merkwitz C, *et al.* Reduction in corpora lutea number in obese melanocortin-4-receptor-deficient mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009, 7: 24
- Schjolden J, Schiöth HB, Larhammar D, *et al.* Melanocortin peptides affect the motivation to feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(2): 134–138
- Shi XY, Xu YJ, Wu NN, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54
- Si LN, Wu D, Su W, *et al.* Observation of plasma GnRH, FSH levels and expression of POMC protein in hypothalamus in rats with lateral ventricle injection of GnIH. *Shandong Medical Journal*, 2017, 57(27): 34–36 [司丽娜, 吴迪, 苏玮, 等. 侧脑室注射微量 GnIH 大鼠的血浆 GnRH、FSH 水平及下丘脑组织 POMC 蛋白表达观察. *山东医药*, 2017, 57(27): 34–36]
- Sotonyi P, Mezei G, Racz B, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone fibers contact POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Reproductive Sciences*, 2010, 17(11): 1024–1028
- Stanley SA, Small CJ, Kim MS, *et al.* Agouti related peptide (Agrp) stimulates the hypothalamo pituitary gonadal axis *in vivo* and *in vitro* in male rats. *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5459–5462
- Sutton GM, Duos B, Patterson LM, *et al.* Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology*, 2005, 146(9): 3739–3747
- Takeuchi S, Takahashi S. Melanocortin receptor genes in the chicken—Tissue distributions. *General and Comparative Endocrinology*, 1998, 112(2): 220–231
- Tallam LS, Kuo JJ, da Silva AA, *et al.* Cardiovascular, renal, and metabolic responses to chronic central administration of agouti-related peptide. *Hypertension*, 2004, 44(6): 853–858
- Tao YX. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 2010, 31(4): 506–543
- Thody AJ, Wilson CA, Everard D. Facilitation and inhibition of sexual receptivity in the female rat by α -MSH. *Physiology and Behavior*, 1979, 22(3): 447–450
- van der Ploeg LH, Martin WJ, Howard AD, *et al.* A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(17): 11381–11386
- Vongs A, Lynn NM, Rosenblum CI. Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regulatory Peptides*, 2004, 120(1–3): 113–118
- Wang J, Liu XL, Hou SS, *et al.* Cloning and expression pattern of MC4R gene in Beijing duck. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2011, 20(1): 29–34 [王婕, 刘小林, 侯水生, 等. 北京鸭 MC4R 基因的克隆及其组织表达的差异. *西北农业学报*, 2011, 20(1): 29–34]
- Wei R, Yuan D, Zhou C, *et al.* Cloning, distribution and effects of fasting status of melanocortin 4 receptor (MC4R) in *Schizothorax prenanti*. *Gene*, 2013, 532(1): 100–107
- Williams DL, Grill HJ, Weiss SM, *et al.* Behavioral processes underlying the intake suppressive effects of melanocortin 3/4 receptor activation in the rat. *Psychopharmacology*, 2002, 161(1): 47–53
- Yada T, Moriyama S, Suzuki Y, *et al.* Relationships between obesity and metabolic hormones in the “cobalt” variant of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 128(1): 36–43
- Yang SH, Zhao LZ, Wang XQ, *et al.* Effect of Leptin on the neuroendocrine reproductive axis by regulating proopiomelanocortin neurons. *Chinese Journal of Family Planning*, 2010, 18(3): 143–146 [杨松鹤, 赵连志, 王小强, 等. 瘦素经 POMC 神经元对神经内分泌—生殖轴的影响. *中国计划生育学杂志*, 2010, 18(3): 143–146]
- Yi TL, Yang LK, Ruan GL, *et al.* Melanocortin-4 receptor in swamp eel (*Monopterus albus*): Cloning, tissue distribution, and pharmacology. *Gene*, 2018, 678: 79–89
- Yuan H, Zhang HY, Tian Y, *et al.* The melanocortin-4 receptor gene (MC4R) expression detected by SYBR green I real-time quantitative PCR in landes geese before and after overfeeding. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(4): 692–697 [原昊, 张红艳, 田勇, 等. SYBR Green I 荧光定量 PCR 法检测朗德鹅填饲前后黑素皮质素受体-4

- 基因(MC4R)的表达. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 692–697]
- Zhang KQ, Hou ZS, Wen HS, *et al.* Melanocortin-4 receptor in spotted sea bass, *Lateolabrax maculatus*: Cloning, tissue distribution, physiology, and pharmacology. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2019, 10: 700–705
- Zhang ZJ, Cheng X, Liu HY, *et al.* cDNA cloning, sequence analysis and tissue expression of goat MC4R gene. *Journal of Northwest A & F University(Natural Science)*, 2012, 40(12): 20–26 [张子军, 程箫, 刘洪瑜, 等. 山羊 MC4R 基因 cDNA 的克隆和序列分析及组织表达研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(12): 20–26]
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Physiological mechanisms for degeneration of blind-side hypermelanosis in pond-cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 103–110 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 103–110]

(编辑 马璀璨)

The Functions of α -Melanocyte Stimulating Hormone and Melanocortin-4 Receptor During Energy Homeostasis and Reproduction

WEN Haishen¹Ⓐ, ZHANG Ying¹, FENG Qichao², HOU Zhishuai¹, QI Xin¹, LI Yun¹

(1. Ocean University of China, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Qingdao 266003;
2. National Fisheries Technology Extension Center, Beijing 100125)

Abstract Melanocortins are the products of the precursor protein proopiomelanocortin (POMC) with extensive localization in the central nervous system and peripheral tissues. Melanocortins play important roles in the skin, stress response, immune system, feeding behavior, and sexual function. In recent years, the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) and melanocortin-4 receptor (MC4R) have received considerable attention for their regulation of energy homeostasis and reproduction. Previous studies have shown that POMC, α -MSH, and MC4R regulate food intake and the reproductive system by mediating the secretion of hormones related to the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. In this review, we summarize the physiological functions of POMC, α -MSH, and MC4R in energy homeostasis and reproduction. We also summarize the results of several studies reporting the pharmacological characteristics of teleost MC4R and discuss the potential commercial applications in aquaculture.

Key words Proopiomelanocortin; α -Melanocyte stimulating hormone; Melanocortin-4 receptor; Energy homeostasis; Reproduction

Ⓐ Corresponding author: WEN Haishen, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

《渔业科学进展》加入中国知网 《中国学术期刊（网络版）》

录用定稿网络首发征稿启事

为了以规范的网络期刊出版方式更快更好地确立作者的科研成果首发权,全面提高学术论文的传播效率和利用价值,本刊现已与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司(简称电子杂志社)签署《CAJ-N网络首发学术期刊合作出版协议》,通过《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)正式出版本刊网络版。从2018年起,凡经本刊审定录用的稿件(录用定稿)均在本刊网络版上首发,后续编排情况发布排版定稿和整期汇编定稿,最后由本刊印刷版出版。

来稿要求详见本刊网站的《作者指南》。为规范录用定稿发布版式,本刊对稿件的排版格式作如下规定:来稿为WORD格式,条目齐全,通栏版式,需打包上传矢量图,详见期刊网站中的“图表的写作要求”、“参考文献的要求”等。

录用定稿网络首发之后,在后续的排版定稿、整期汇编定稿网络版和印刷版中,**不得修改论文题目、作者署名、作者单位、资助课题以及学术内容,只可基于编辑规范进行少量文字的修改。**因此,在论文修改过程中,请谨慎定夺。

CAJ-N是国家新闻出版广电总局批准创办、国家教育部主管、清华控股有限公司主办、《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司出版的由我国各类学术期刊组成的连续型网络出版物,每篇网络首发论文将被赋予一个唯一的国际DOI编码。按国家有关网络连续型出版物管理规定,网络首发论文视为正式出版论文,本刊编辑部与电子杂志社共同为论文作者颁发《论文网络首发证书》,作为正式发表的论文提交人事、科研管理等有关部门。

竭诚欢迎海内外专家、学者来稿!

通信地址:山东省青岛市南京路106号黄海水产研究所《渔业科学进展》编辑部(1号楼312室)

网 址: <http://journal.yykxjz.cn>

电子信箱: yykxjz@ysfri.ac.cn

联系电话: 0532-85833580

2020年5月30日

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李健 LI Jian	李军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美国)CHEN Yong
林洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐跑 XU Pao
徐皓 XU Hao	黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 李健 LI Jian 孔杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第41卷 第3期 2020年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.41 No.3 Jun. 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.yyqxjz.cn>
E-mail: yyqxjz@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.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch

Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发刊

定价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986200