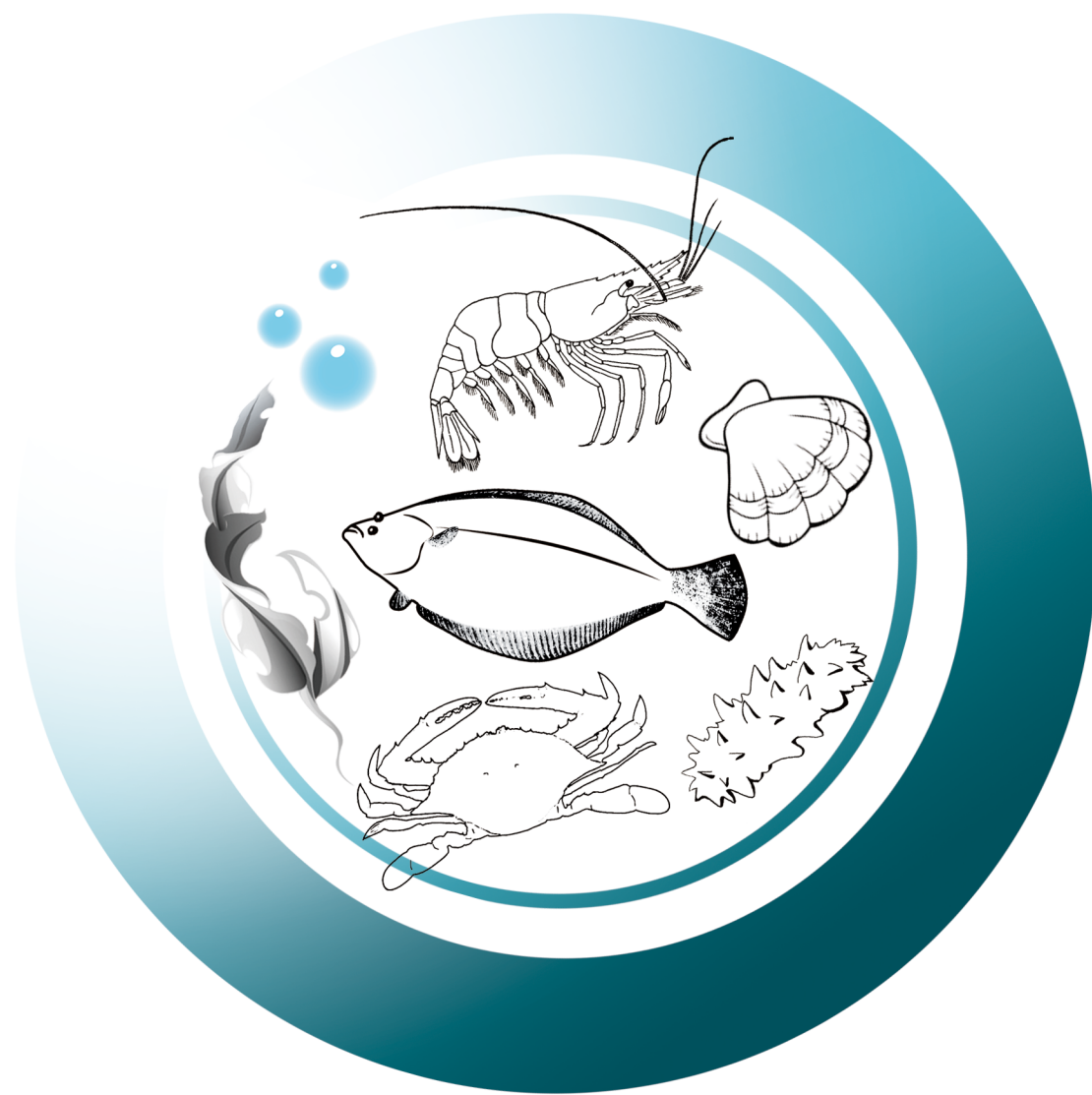


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第41卷 VOL.41

第5期 NO.5



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 5 期

2020 年 10 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

- 西北太平洋秋刀鱼 CPUE 标准化研究.....石永闯 朱清澄 黄硕琳 冯慧丽 (1)
- 渤海伏季休渔效果初步评价.....胡芷君 单秀娟 杨涛 丁琪 (13)
- 舟山群岛以东沿岸海域虾类资源状况及其多样性分析.....胡嘉豪 俞存根 刘惠 (22)
- 西江流域卷口鱼线粒体 D-loop 序列的遗传多样性分析.....彭敏 王大鹏 施军 韩耀全 雷建军 李育森 吴伟军 何安尤 (30)
- 广西仙岛公园和沙井红树林土壤碳氮储量的空间分布.....陶玉华 黄星 王薛平 钟秋平 亢振军 (38)
- 东南太平洋茎柔鱼资源丰度灰色预测研究.....闫永斌 陈新军 汪金涛 雷林 程起群 (46)
- 江苏省 4 个太湖新银鱼种群遗传多样性和遗传结构分析.....李大命 唐晟凯 刘燕山 谷先坤 刘小维 殷稼雯 张彤晴 潘建林 (52)
- 大黄鱼消化道菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力分析.....姜燕 徐永江 于超勇 柳学周 王滨 郑炜强 官曙光 史宝 陈佳 柯巧珍 (61)
- 线粒体 COI、Cyt b 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析.....陆键萍 姚琳 信红梅 曲梦 江艳华 李凤铃 郭莹莹 王联珠 许加超 (73)
- 凡纳滨对虾养殖体系中群体感应淬灭菌的筛选、安全性评估及发酵条件优化.....于鹏 叶海斌 单洪伟 马甦 王腾 (82)
- 三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆及在病原胁迫后的表达特征分析.....张云滨 任宪云 高保全 吕建建 王磊 刘萍 (92)
- 基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性分析.....方振朋 孟宪红 李旭鹏 栾生 曹家旺 陈宝龙 孔杰 闫茂仓 胡利华 (101)
- 基于 DEB 理论的皱纹盘鲍个体生长模型参数的测定.....段娇阳 刘慧 陈四清 蒋增杰 蔺凡 常丽荣 卢龙飞 (110)
- 墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传分析.....姚高友 谭杰 吴羽媛 苏晓盈 刘付少梅 张元 方家熙 陈楠生 王春德 刘志刚 (118)
- 短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢及能量收支的影响.....薛素燕 李加琦 李阳 丁敬坤 徐涵 张雯雯 毛玉泽 方建光 (127)
- 桑沟湾海带标准化养殖模式的优势探析.....房景辉 蒋增杰 蔺凡 高亚平 方建光 张鹏 郭智俐 杜美荣 孟珊 (134)
- 盐度及钒酸钠胁迫对红毛菜光合生理的影响.....魏家慧 李晓蕾 马德英 汪文俊 梁洲瑞 李国梁 刘福利 孙修涛 王飞久 (141)
- 光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆及其在全组织和卵母细胞中的表达分析.....周丹 苏泳霖 钟如卓 郭志诚 邬婧 郑哲 王庆恒 (150)
- 利用 mini-Tn10 转座子文库筛选鳃弧菌 M3 表型发生变化的基因.....李倩 李贵阳 李杰 莫照兰 (160)
- 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究.....张家源 张洪才 陈舜胜 (168)
- 印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价.....宋红梅 屈政委 汪学杰 牟希东 刘超 刘奕 赖明信 胡隐昌 (177)

综述

- 水生生物环境丰容技术及其应用研究进展.....秦传新 潘莞倪 于刚 左涛 席世改 朱文涛 马鸿梅 (185)
- 主要经济双壳贝类性别分化的分子机制概述.....周丽青 赵丹 吴宙 吴磊 杨金龙 (194)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.41 No.5 October 2020

Study on CPUE Standardization of Chinese Pacific Saury (<i>Cololabis saira</i>) Fishery in the Northwest Pacific OceanSHI Yongchuang, ZHU Qingcheng, HUANG Shuolin, FENG Huili	(1)
Preliminary Evaluation of Summer Fishing Moratorium in the Bohai SeaHU Zhijun, SHAN Xiujuan, YANG Tao, DING Qi	(13)
Current Status and Diversity Analysis of the Shrimp Resources in Coastal Waters East of the Zhoushan IslandsHU Jiahao, YU Cungen, LIU Hui	(22)
Genetic Diversity Analysis of Mitochondrial D-loop Sequence of <i>Ptychidio jordani</i> in Xijiang River BasinPENG Min, WANG Dapeng, SHI Jun, HAN Yaoquan, LEI Jianjun, LI Yusen, WU Weijun, HE Anyou	(30)
Spatial Distribution of Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Mangrove Wetland of Xiandao Park and Shajing in GuangxiTAO Yuhua, HUANG Xing, WANG Xueping, ZHONG Qiuping, KANG Zhenjun	(38)
Prediction of Abundance Index of the Humboldt Squid (<i>Dosidicus gigas</i>) in the Southeast Pacific Ocean Based on a Grey System-Based ModelYAN Yongbin, CHEN Xinjun, WANG Jintao, LEI Lin, CHENG Qiqun	(46)
Genetic Diversity and Population Structure of Four <i>Neosalanx taihuensis</i> Populations in Jiangsu ProvinceLI Daming, TANG Shengkai, LIU Yanshan, GU Xiankun, LIU Xiaowei, YIN Jiawen, ZHANG Tongqing, PAN Jianlin	(52)
Analysis of Microbiota Structure, Digestive Enzyme and Nonspecific Immune Enzyme Activity in the Gastrointestinal Tract of Large Yellow CroakerJIANG Yan, XU Yongjiang, YU Chaoyong, LIU Xuezhou, WANG Bin, ZHENG Weiqiang, GUAN Shuguang, SHI Bao, CHEN Jia, KE Qiaozhen	(61)
Applicability Analysis of Mitochondrial <i>CO I</i> , <i>Cyt b</i> and 16S rRNA Genes in Identification of Six Tuna SpeciesLU Jianping, YAO Lin, XIN Hongmei, QU Meng, JIANG Yanhua, LI Fengling, GUO Yingying, WANG Lianzhu, XU Jiachao	(73)
Screening, Safety Evaluation and Fermentation Conditions Optimization of Quorum Quenching Bacteria from <i>Litopenaeus vannamei</i> Culture SystemYU Peng, YE Haibin, SHAN Hongwei, MA Shen, WANG Teng	(82)
Cloning and Expression Analysis of c-Jun N-Terminal Kinase Gene in <i>Portunus trituberculatus</i> after Pathogenic StressZHANG Yunbin, REN Xianyun, GAO Baoquan, LÜ Jianjian, WANG Lei, LIU Ping	(92)
Genetic Diversity Analysis of Domestic Commercial Brands Seedlings of <i>Litopenaeus vannamei</i> Based on Microsatellite Molecular MarkersFANG Zhenpeng, MENG Xianhong, LI Xupeng, LUAN Sheng, CAO Jiawang, CHEN Baolong, KONG Jie, YAN Maocang, HU Lihua	(101)
The Measurement of Parameters for the Dynamic Energy Budget (DEB) Model in <i>Haliotis discus hannai</i> (Disk Abalone)DUAN Jiaoyang, LIU Hui, CHEN Siqing, JIANG Zengjie, LIN Fan, CHANG Lirong, LU Longfei	(110)
Genetic Analysis of <i>Argopecten irradians concentricus</i> , “Bohai Red” and Their HybridsYAO Gaoyou, TAN Jie, WU Yuyuan, SU Xiaoying, LIUFU Shaomei, ZHANG Yuan, FANG Jiayi, CHEN Nansheng, WANG Chunde, LIU Zhigang	(118)
Effects of Short-Term Acidification on Feeding, Respiratory Metabolism, and Energy Budget of <i>Scapharca broughtonii</i>XUE Suyan, LI Jiaqi, LI Yang, DING Jingkun, XU Han, ZHANG Wenwen, MAO Yuze, FANG Jianguang	(127)
Analysis on the Advantages of Standard Kelp Long Line Culture in Sanggou BayFANG Jinghui, JIANG Zengjie, LIN Fan, GAO Yaping, FANG Jianguang, ZHANG Peng, GUO Zhili, DU Meirong, MENG Shan	(134)
Effects of Salinity and Na ₃ VO ₄ Stress on Photosynthetic Physiology of <i>Bangia</i>WEI Jiahui, LI Xiaolei, MA Deying, WANG Wenjun, LIANG Zhourui, LI Guoliang, LIU Fuli, SUN Xiutao, WANG Feijiu	(141)
Molecular Cloning and Expression Analysis of <i>HSP90</i> of Peanut Worm <i>Sipunculus nudus</i>ZHOU Dan, SU Yonglin, ZHONG Ruzhuo, GUO Zhicheng, WU Jing, ZHENG Zhe, WANG Qingheng	(150)
Construction of A mini-Tn10 Transposon Library to Identify Genes Associated with Several Phenotypes of <i>Vibrio anguillarum</i> M3LI Qian, LI Guiyang, LI Jie, MO Zhaolan	(160)
Optimization of Extraction Process of Protamine from <i>Takifugu obscurus</i>ZHANG Jiayuan, ZHANG Hongcai, CHEN Shunsheng	(168)
Analysis and Assessment for Nutritional Components of the Muscle of <i>Datnioides pulcher</i>SONG Hongmei, QU Zhengwei, WANG Xuejie, MU Xidong, LIU Chao, LIU Yi, LAI Mingxin, HU Yinchang	(177)
Review on Environmental Enrichment for Aquatic OrganismsQIN Chuanxin, PAN Wannan, YU Gang, ZUO Tao, XI Shigai, ZHU Wentao, MA Hongmei	(185)
Review: Molecular Mechanism of Sex Differentiation in Major Economic BivalvesZHOU Liqing, ZHAO Dan, WU Zhou, WU Lei, YANG Jinlong	(194)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190407001

http://www.yykxjz.cn/

石永闯, 朱清澄, 黄硕琳, 冯慧丽. 西北太平洋秋刀鱼 CPUE 标准化研究. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 01-12
Shi YC, Zhu QC, Huang SL, Feng HL. Study on CPUE standardization of Chinese Pacific saury (*Cololabis saira*) fishery in the Northwest Pacific Ocean. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 01-12

西北太平洋秋刀鱼 CPUE 标准化研究*



石永闯¹ 朱清澄^{2,3①} 黄硕琳^{1,2,4} 冯慧丽²

(1. 上海海洋大学海洋文化与法律学院 上海 201306; 2. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306;
3. 上海海洋大学国家远洋渔业工程技术研究中心 上海海洋大学大洋渔业资源可持续开发省部共建
教育部重点实验室 上海 201306; 4. 上海海洋大学海洋政策与法律研究所 上海 201306)

摘要 秋刀鱼(*Cololabis saira*)是西北太平洋海域重要的渔业种类之一,其资源评估工作已成为热点问题,单位捕捞努力量渔获量(CPUE)标准化可以为开展有效的资源评估研究提供科学依据。为此,本研究利用 2003~2017 年中国大陆西北太平洋秋刀鱼渔业生产统计资料,结合卫星遥感获得的海洋环境数据,如海表面温度、海表温度梯度、海表面高度等,基于广义线性模型(General linear model, GLM)和广义可加模型(Generalized additive model, GAM)对中国大陆西北太平洋秋刀鱼渔业进行 CPUE 标准化。结果显示,根据 BIC 准则,在 GLM 模型结果中,年份、月份、经度、纬度、海表面温度、海表面高度、海表温度梯度及年份与月份对 CPUE 具有显著影响,并组成了 GLM 模型的最佳模型,对 CPUE 偏差的解释率为 52.47%;在 GAM 模型结果中,除上述 8 个影响变量外,交互项月份与经度和月份与纬度也对 CPUE 影响较大,GAM 的最佳模型对 CPUE 偏差的解释率为 61.9%。通过 5-fold 交叉验证分析发现,GAM 模型标准化结果较优于 GLM 模型,更适合于西北太平洋秋刀鱼渔业 CPUE 标准化。

关键词 秋刀鱼; 广义可加模型; 广义线性模型; CPUE 标准化; 西北太平洋

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0001-12

单位捕捞努力量渔获量(Catch Per Unit Effort, CPUE)常作为相对资源丰度指数而广泛运用于渔业资源评估和管理中(Hilborn, 1992; Maunder *et al*, 2004; Erisman *et al*, 2011; 冯波等, 2014)。目前,由于商业性渔业数据具有易获得和低消耗等特点,我国渔业资源评估和渔场研究仍然依赖于该类数据(Guan *et al*, 2014; 李亚楠等, 2018; 陶雅晋等, 2019)。然而,由渔业生产统计数据计算的名义 CPUE 与资源量关系较复杂,会受到海洋环境因素(海表面温度、海表面高度、海表温度梯度)、时空效应(年份、月份、经度、纬度)、捕捞能力(渔船长度)以及商业捕捞策略等因素

的影响,无法真实反映鱼类资源丰度变化,导致在渔业资源评估中 CPUE 与资源量间正比关系的假设常被诟病(Harley, 2001; Ye *et al*, 2009)。CPUE 标准化可去除部分外界因素对 CPUE 的影响,使其更加准确地表达渔业资源丰度的变化情况,从而增加资源评估的容错性和可靠性(Salthaug *et al*, 2003; Campbell, 2004; Maunder *et al*, 2004)。因此,开展 CPUE 标准化研究是进行资源评估前的一项基础性工作。

近年来,许多学者运用不同的统计模型进行了 CPUE 标准化研究,陆化杰等(2013)利用广义线性模型(General linear model, GLM)和广义可加模型

* 国家科技支撑计划(2013BAD13B05)资助 [This work was supported by National Key Technology Support Program (2013BAD13B05)]. 石永闯, E-mail: syc13052326091@163.com

① 通讯作者: 朱清澄, 教授, E-mail: qcqzhu@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-04-07, 收修改稿日期: 2019-06-05

(Generalized additive model, GAM)对中国大陆西南大西洋阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)渔业 CPUE 标准化,表明 GAM 模型比 GLM 模型更适合用于该渔业 CPUE 标准化。Mateo 等(2014)分别用 GLM 模型、GAM 模型和回归树模型对黑鲑鱼(*Anoplopoma fimbria*)进行了 CPUE 标准化研究并对比分析了标准化结果。徐洁等(2015)和李娜等(2018)分别利用基于空间自相关的 GLM 模型对西北太平洋柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)和阿根廷滑柔鱼的 CPUE 进行了标准化研究。目前, GLM 模型和 GAM 模型是 CPUE 标准化研究最常用的 2 个模型(Maunders *et al.*, 2004), GLM 模型假设响应变量与解释变量间存在线性关系,但大部分情况下,由于外界因素的影响, CPUE 与环境等因子存在非线性关系(Hinton *et al.*, 2004; Venables *et al.*, 2004; Thorson *et al.*, 2013)。GAM 模型是 GLM 模型的延伸,可以处理好这种非线性关系(Chen *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2014)。这 2 种模型具有简单、易操作等特点,均可使用用户良好型软件来执行计算(Rodriguez *et al.*, 2003),是资源评估研究处于起步阶段的渔业进行 CPUE 标准化的良好选择。

秋刀鱼(*Cololabis saira*)是一种中上层小型洄游性鱼类(Watanabe *et al.*, 1988),广泛分布在日本群岛至美国沿岸的太平洋海域,主要渔场分布在日本海、太平洋海域和鄂霍次海(Tiana *et al.*, 2004; Nakaya *et al.*, 2010)。现阶段,中国大陆、中国台湾、韩国、俄罗斯、日本、瓦努阿图为主要的秋刀鱼生产国家和地区(汤振明等, 2004; 花传祥等, 2017, 石永闯等, 2018)。中国大陆于 2003 年开始在西北太平洋海域进行秋刀鱼资源探捕,其中,2014 年到达最高产量(7.6×10^4 t),秋刀鱼渔业也成为中国最重要的渔业之一。近年来,由于捕捞强度、环境因素等影响,秋刀鱼资源量发生波动,渔获量出现明显的年间变化(Tian, 2003; Watanabe *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2013)。同时,秋刀鱼已被北太平洋渔业管理委员会列为优先管理鱼种之一(Zavolokin, 2018),相关资源评估和管理方案制定等工作已被纳入议事日程。目前,对秋刀鱼生物学(张阳等, 2013)、渔场分布(花传祥等, 2005; 晏磊等, 2012; 张孝民等, 2015)、渔具性能(许巍等, 2005; 石永闯等, 2016、2018)等进行了一些研究,但对中国大陆西北太平洋秋刀鱼渔业 CPUE 标准化的研究尚未见报道。

为此,本研究根据 2003~2017 年中国大陆在西北太平洋海域的秋刀鱼生产统计资料,结合卫星遥感获得的海洋环境数据,如海表面温度(SST)、海表面高度(SSH)以及海表温度梯度(SSTG)等,基于 GLM 和

GAM 模型对中国大陆西北太平洋秋刀鱼渔业进行 CPUE 标准化,并对比分析 2 种模型的结果。应用 GLM 和 GAM 模型对秋刀鱼渔业 CPUE 进行标准化,以期为西北太平洋秋刀鱼资源评估工作提供基础。

1 材料与方法

1.1 研究区域

研究区域位于日本和俄罗斯的专属经济区(EEZ)之外(图 1),该区域位于黑潮暖流和亲潮寒流的交汇处,它们共同为海洋生物提供了充足的营养基础,使该地区成为世界上高产海域之一(Watanabe *et al.*, 2006)。

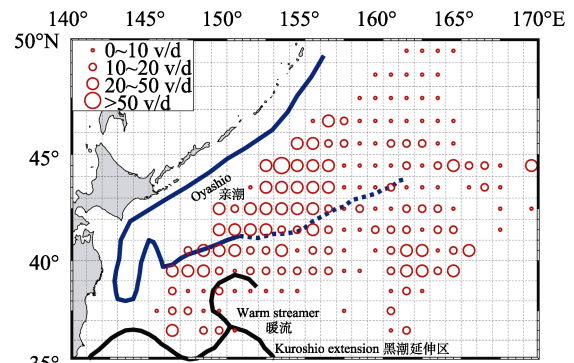


图 1 研究区域

Fig.1 Study area of Pacific saury

蓝色实线代表亲潮寒流,蓝色虚线代表亲潮延伸流,黑色线代表黑潮暖流,红色圆圈代表 CPUE

The blue solid lines represent the Oyashio cold current, the blue dashed lines represent the Oyashio extension current, the black lines correspond to Kuroshio warm current, and the red circles represent CPUE, in units of tons per vessel per day

1.2 数据来源

1.2.1 渔业数据 2003~2017 年西北太平洋秋刀鱼统计数据源自于中国远洋渔业分会上海海洋大学秋刀鱼技术组,数据包括日期、纬度、经度、产量(t)和作业天数,时间分辨率为 d、空间分辨率为 $0.5^\circ \times 0.5^\circ$ 。由于中国大陆在西北太平洋生产渔船参数基本一致,因此,本研究在数据分析时忽略其影响。

CPUE 定义为每天的捕捞产量,第 i 年、 l 月、 k 经度、 j 纬度(分辨率为 $0.5^\circ \times 0.5^\circ$)对应的月均 CPUE 定义为:

$$CPUE_{i,l,k,j} = \frac{\sum Catch_{i,l,k,j}}{\sum E_{i,l,k,j}} \quad (1)$$

式中, $\sum Catch_{i,l,k,j}$ 为第 i 年、 l 月、 k 经度、 j

纬度总产量。 $\sum E_{i,l,k,j}$ 为对应的总作业天数。

1.2.2 海洋环境数据 环境数据包括海表面温度、海表温度梯度、海表面高度。其中, SST 数据来源于 NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration; ftp.nodc.noaa.gov), 空间分辨率为 $0.1^\circ \times 0.1^\circ$; SSH 数据来自 AVISO (Archiving Validation and Interpolation of Satellite Oceanographic; www.avisometrimetry.fr), 空间分辨率为 $0.25^\circ \times 0.25^\circ$; SSTG 数据从梯度幅值估算得出, 方程如下:

$$\text{SSTG}_{i,j} = \sqrt{\left(\frac{\text{SST}_{i+1,j} - \text{SST}_{i-1,j}}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\text{SST}_{i,j+1} - \text{SST}_{i,j-1}}{\Delta y}\right)^2} \quad (2)$$

式中, $\text{SST}_{i+1,j}$ 、 $\text{SST}_{i-1,j}$ 、 $\text{SST}_{i,j+1}$ 和 $\text{SST}_{i,j-1}$ 为 4 个相邻网格的 SST 数值, i 和 j 分别代表行号和列号, Δx 是 $j-1$ 和 $j+1$ 列的经度距离, Δy 是 $i-1$ 和 $i+1$ 的纬度距离。 $\text{SSTG}_{i,j}$ 为 i,j 网格的 SSTG 值, 单位为 $^\circ\text{C}/\text{km}$ 。因渔业生产数据和海洋环境数据的空间分辨率不同, 本研究将其转化为统一标准。

1.3 变量的相互独立性检验

本研究根据秋刀鱼渔业特点选择解释变量为年份、月份、经度、纬度、海表面温度、海表温度梯度和海表面高度。通过方差膨胀因子(VIF)和 Spearman 相关系数对解释变量进行相互独立性检验(表 1)。当 $\text{VIF} < 10$ 时, 认为变量之间无严重多重共线性(Menard *et al*, 2011; Tien *et al*, 2011)。从表 1 可以看出, 各个解释变量的 VIF 均小于 10, 说明各解释变量之间无严重多重共线性。

表 1 解释变量间方差膨胀因子

Tab.1 Variance inflation factor among explanatory variables

解释变量	Explanatory variables	方差膨胀因子 VIF
年份	Year	1.19
月份	Month	2.47
经度	Longitude	3.13
纬度	Latitude	3.37
海表面温度	SST	1.55
海表温度梯度	SSTG	1.43
海表面高度	SSH	3.41

1.4 研究方法

GLM 模型是 CPUE 标准化最常用的方法之一, GLM 模型重要的假设为响应变量的期望值与解释变量呈线性关系:

$$g(\mu_i) = X_i^T \beta \quad (3)$$

式中, g 为链接函数, $\mu_i = E(Y_i)$, X_i 为第 i 个响应变量的解释变量, β 为模型估计参数, Y_i 为第 i 个响应变量。本研究没有零渔获量数据, 因此, 将 $\ln(\text{CPUE})$ 作为响应变量, 假设响应变量服从正态分布, 则 GLM 模型为:

$$\ln(\text{CPUE}) = \text{Year} + \text{Month} + \text{Longitude} + \text{Latitude} + \text{SST} + \text{SSTG} + \text{SSH} + \text{Interaction} + \varepsilon \quad (4)$$

式中, CPUE 为每船每天的产量; Interactions 为时间与空间解释变量的交互效应; ε 为误差项, 假设其服从正态分布。

GAM 模型是 GLM 模型的延伸, 可以用来表示响应变量和解释变量之间的非线性关系(Tseng *et al*, 2013), 即:

$$g(\mu_i) = \alpha + \sum_{i=1} f_i(X_i) + \varepsilon_i \quad (5)$$

式中, f_i 为平滑函数, ε_i 为误差项, GAM 模型:

$$\ln(\text{CPUE}) = \text{Year} + \text{Month} + s(\text{Longitude}) + s(\text{Latitude}) + s(\text{SST}) + s(\text{SSTG}) + s(\text{SSH}) + s(\text{Interactions}) + \varepsilon \quad (6)$$

式中, ε 为误差项, 假设其服从正态分布。时空交互项包括年份 \times 月份、年份 \times 经度、年份 \times 纬度、月份 \times 经度、月份 \times 纬度以及经度 \times 纬度等所有可能的组合, 本研究均考虑在内。

1.5 标准化 CPUE 的计算

年标准化 CPUE 通过以下公式计算:

$$\text{CPUE}_i = \frac{1}{n_i} \times \sum_{k=1}^{n_i} \text{CPUE}_k \quad (7)$$

式中, CPUE_i 是第 i 年的标准化 CPUE, n_i 是第 i 年的观测数目, CPUE_k 是第 i 年的第 k 个 CPUE。月标准化 CPUE 计算公式与年 CPUE 计算公式一致。

1.6 模型评价

GLM 和 GAM 模型中均将年份、月份、经度和纬度看作离散变量, SST、SSTG 和 SSH 为连续变量。本研究中, 将解释变量依次加入 GLM 或 GAM 模型中, 得到包含不同个数解释变量的 GLM 或 GAM 模型(Shono, 2005)。根据 BIC (Bayesian information criterion)值选择最佳的 GLM 和 GAM 模型(Quinn *et al*, 2002; Watanabe *et al*, 2006), BIC 计算公式:

$$\text{BIC} = m \ln(n) + n \ln(\text{RSS}/n) \quad (8)$$

式中, m 是模型中参数的个数, n 为观测值个数, RSS 为残差平方和。

模型间比较方面,本研究通过5折交叉验证法,通过计算模拟值与观测值之间的 Spearman 相关性,以及2个CPUE之间均方误差以评估预测性能(Kohavi, 1995; Arlot *et al.*, 2010)。本研究所有统计分析均采用R(V3.2.2)统计软件处理。

2 结果

2.1 解释变量 ln(CPUE)的统计分布检验

K-S 检验结果显示, ln(CPUE)趋向于服从正态分布($\mu=2.12$, $\sigma=1.06$) (图 2a), 同时, ln(CPUE)的数据点

基本形成一条直线(图 2b), 说明本研究关于 ln(CPUE)服从正态分布的假设是合理的, 采用 GLM 和 GAM 模型进行标准化是合适的。

2.2 GLM 模型分析

基于 BIC 原则选择的最佳 GLM 模型见表 2, 从表 2 可以看出, 该模型对 CPUE 的解释率为 52.47%。最佳 GLM 模型显著性变量检验见表 3。F 检验结果表明, 包括交互项在内的所有解释变量均为显著性变量, 对 CPUE 有显著性影响($P<0.05$)。表 4 为最佳 GLM 模型的 5-fold 交叉验证结果。

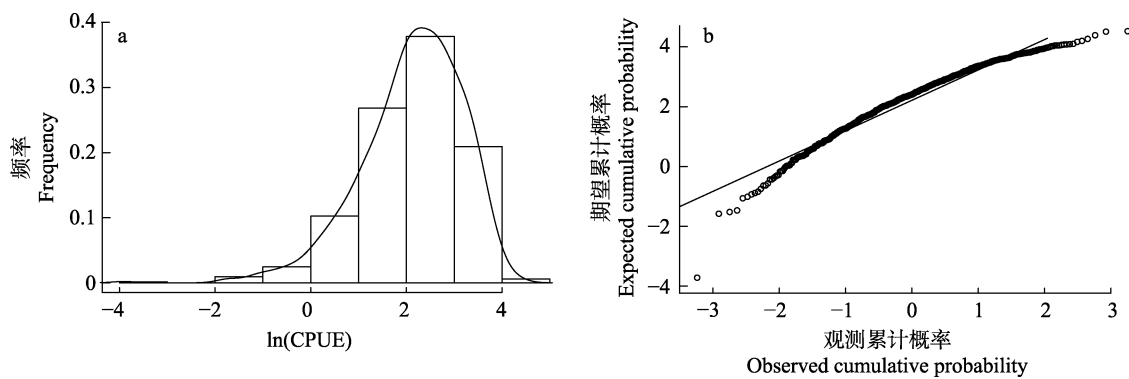


图 2 2003~2017 年西北太平洋秋刀鱼 ln(CPUE)的频次分布及其检验

Fig.2 ln(CPUE) distribution and its distribution tests of the Chinese Pacific saury fishery in 2003~2017

表 2 基于 BIC 的 GLM 模型选择

Tab.2 GLM model selection based BIC values

GLM 模型	GLM model	R^2 (%)	BIC	解释率	Explained deviance (%)
ln(CPUE)~Intercept+Year+Month+Lon+Lat		26.18	3169.14		30.71
ln(CPUE)~Intercept+Year+Month+Lon+Lat+SST		29.73	3094.05		34.52
ln(CPUE)~Intercept+Year+Month+Lon+Lat+SST+SSTG		35.61	2849.61		42.06
ln(CPUE)~Intercept+Year+Month+Lon+Lat+SST+SSTG+SSH		39.87	2735.38		47.29
ln(CPUE)~Intercept+Year+Month+Lon+Lat+SST+SSTG+SSH+Year:Month+ ε		42.66	2661.17		52.47

表 3 最佳 GLM 模型的方差分析

Tab.3 Anova test for the best GLM model

因素	自由度	偏差	残差自由度	残差偏差	F	Pr(>F)
Parameter	df	Deviance	Resid.df	Resid.Dev		
Intercept			849	952.86		
年份 Factor(Year)	13	133.31	836	819.55	15.86	$<2.2 \times 10^{-16}$
月份 Factor(Month)	7	201.19	829	618.36	44.46	$<2.2 \times 10^{-16}$
经度 Factor(Lon)	23	24.12	806	594.24	1.62	$<2.2 \times 10^{-16}$
纬度 Factor(Lat)	13	24.98	793	569.26	2.97	2.94×10^{-4}
海表面温度 SST	1	0.37	792	568.89	0.57	$<2.2 \times 10^{-16}$
海表面温度梯度 SSTG	1	0.34	791	568.55	0.53	3.21×10^{-5}
海表面高度 SSH	1	2.38	790	566.16	3.67	4.71×10^{-2}
年份×月份 Factor(Year) : Factor(Month)	48	86.46	742	479.7	2.79	5.08×10^{-9}

表 4 最佳 GLM 模型的 5 折交叉验证
Tab.4 Five-fold cross validation of the best GLM

情景 Case	相关性检验 Cor_GLM_test	均方误差检验 MSE_GLM_test
1	0.5154	1.2841
2	0.5219	1.2196
3	0.5086	1.3582
4	0.5217	1.2587
5	0.5308	1.1375

2.3 GAM 模型分析

基于 BIC 原则选择的最佳 GAM 模型见表 5, 从表 5 可以看出, 该模型对 CPUE 的解释率为 61.9%。最佳 GAM 模型显著性变量检验见表 6。F 检验结果表明, 包括交互项在内的所有解释变量均为显著性变量, 对 CPUE 有显著性影响($P < 0.05$)。表 7 为最佳 GAM 模型的 5-fold 交差验证结果。

表 5 基于 BIC 的 GAM 模型选择
Tab.5 GAM model selected based on BIC values

GAM 模型 GAM model	R^2 (%)	BIC	解释率 Explained deviance(%)
$\ln(\text{CPUE}) \sim \text{Intercept} + \text{Year} + \text{Month} + s(\text{Lon}) + s(\text{Lat}) + s(\text{SST}) + s(\text{SSTG}) + s(\text{SSH})$	37.69	49351.69	46.25
$\ln(\text{CPUE}) \sim \text{Intercept} + \text{Year} + \text{Month} + s(\text{Lon}) + s(\text{Lat}) + s(\text{SST}) + s(\text{SSTG}) + s(\text{SSH}) + s(\text{Year}:\text{Month})$	40.18	48372.25	52.74
$\ln(\text{CPUE}) \sim \text{Intercept} + \text{Year} + \text{Month} + s(\text{Lon}) + s(\text{Lat}) + s(\text{SST}) + s(\text{SSTG}) + s(\text{SSH}) + s(\text{Year}:\text{Month}) + s(\text{Month}:\text{Lon})$	45.93	46103.72	57.28
$\ln(\text{CPUE}) \sim \text{Intercept} + \text{Year} + \text{Month} + s(\text{Lon}) + s(\text{Lat}) + s(\text{SST}) + s(\text{SSTG}) + s(\text{SSH}) + s(\text{Year}:\text{Month}) + s(\text{Month}:\text{Lon}) + s(\text{Month}:\text{Lat}) + \varepsilon$	48.50	45254.56	61.90

表 6 最佳 GAM 模型的方差分析
Tab.6 Anova test for the best GAM model

参数 Parameter	自由度 df	F	P-value
年份 Factor(Year)	13	4.383	4.03×10^{-7}
月份 Factor(Month)	7	1.543	1.71×10^{-3}
经度 Factor(Lon)	23	2.992	4.34×10^{-6}
纬度 Factor(Lat)	13	1.344	9.88×10^{-3}
年份×月份 Factor(Year): Factor(Month)	61	3.534	$< 2 \times 10^{-16}$
月份×经度 Factor(Month): Factor(Lon)	92	1.995	8.35×10^{-7}
月份×纬度 Factor(Month): Factor(Lat)	53	1.416	3.15×10^{-3}

光滑项的显著性 Approximate significance of smooth terms:

项目 Items	edf	Ref.df	F	P-value
海表面温度 $s(\text{SST})$	4.523	5.368	5.570	$< 2 \times 10^{-16}$
海表温度梯度 $s(\text{SSTG})$	3.196	4.052	4.509	6.75×10^{-5}
海表面高度 $s(\text{SSH})$	2.116	2.776	3.602	0.0211

表 7 最佳 GAM 模型的 5 折交叉验证
Tab.7 Five-fold cross validation of the best GAM

情景 Case	相关性检验 Cor_GAM_test	均方误差检验 MSE_GAM_test
1	0.6751	0.9178
2	0.6836	0.9093
3	0.6629	0.9375
4	0.6891	0.9013
5	0.6784	0.9125

箱线图。从图 3 可以看出, GAM 模型中的时间和空间解释变量年份、月份、经度和纬度有相对较小的残差, 其值接近于零(图 3a~图 3d)。作为环境解释变量, SST 平均残差范围为-0.33~0.28, 其中, 海表面温度为 7°C 时, GAM 模型的负残差值最大, 9°C 时具有最大的正残差值(图 3e)。SSTG 的残差也存在一定波动, 其中, 海表温度梯度为 0.11 时, 具有最大的正残差值(0.58)(图 3f)。SSH 的平均残差范围为-1.39~0.31, 其中, 海表面高度为 1 m 时, GAM 模型的负残差值最大, 0.7 m 时具有最大的正残差值(图 3g)。

图 3 为最佳 GAM 模型拟合的解释变量和残差的

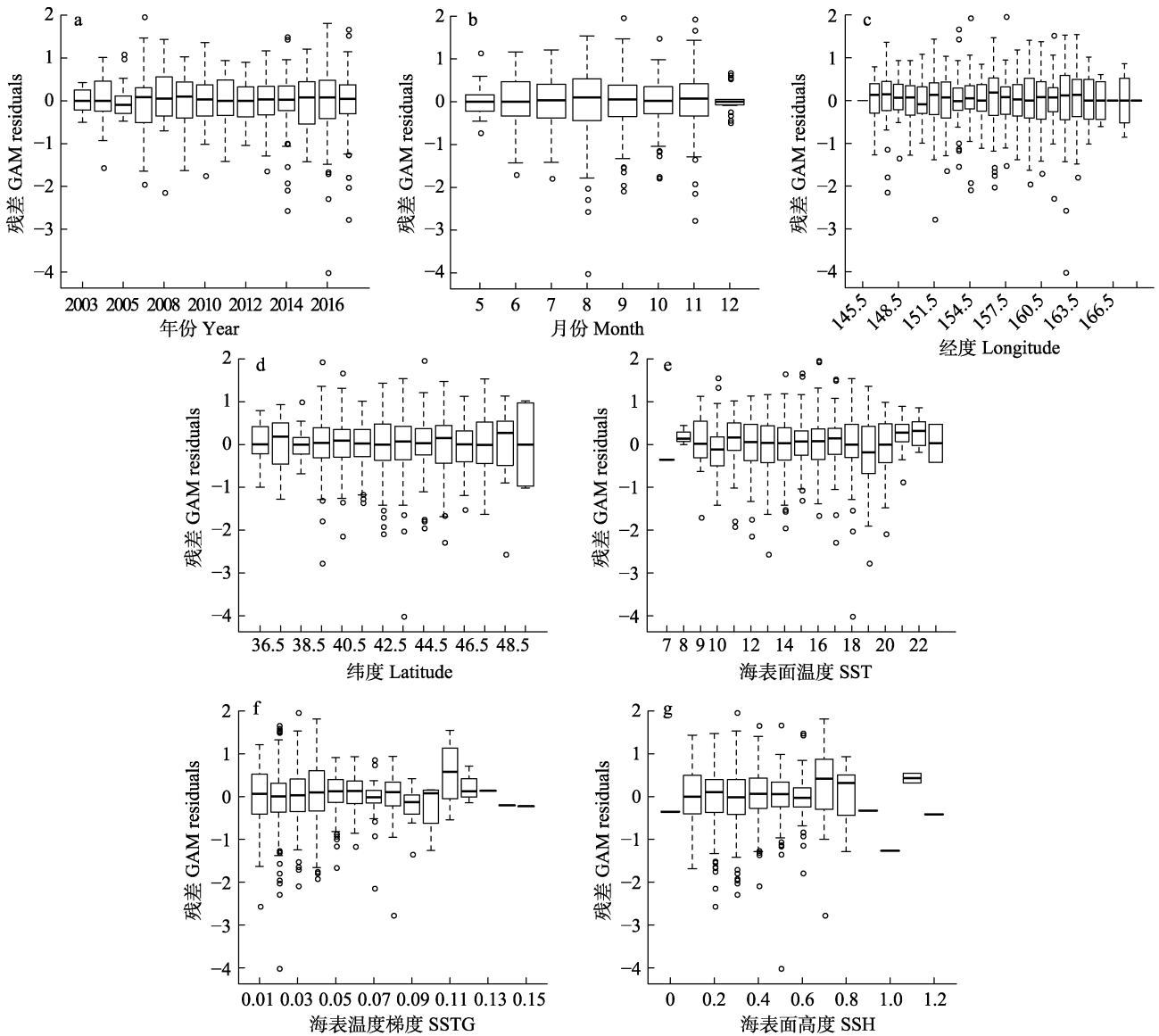


图3 最佳 GAM 模型拟合的解释变量和残差的箱线图

Fig.3 Boxplot of residuals and explanatory variables fitted by best GAM

2.4 各解释变量对 CPUE 的影响

从图 4a 可以看出, 年份对 CPUE 的影响呈先减小后增加再减小的趋势, CPUE 在 2004~2008 年间呈逐渐下降趋势, 并在 2008 年达到最低点; 在 2008~2014 年间呈稳步增长趋势; 2014 年后略有下降。月份对 CPUE 影响方面, 5~8 月 CPUE 呈逐月下降的趋势, 8 月达到最低点。在秋刀鱼主要捕捞季节(9~12 月), CPUE 随月份逐渐增加(图 4b)。空间因子方面, CPUE 在 145°~151°E 间呈逐渐上升的趋势, 在 151°E 出现最大值, 此后, 随着经度的增加, CPUE 呈缓慢下降的趋势(图 4c)。CPUE 在 36°~41°N 间缓慢上升, 在 41°N 时出现峰值, 然后在 41°~50°N 间呈逐渐下降趋势(图 4d)。环境因子方面, SST 在不同的温度范围

内对 CPUE 存在不同的影响。当海表面温度在 10°C~15°C 时, SST 对 CPUE 的影响相对稳定。在 15°C~23°C 间, 呈先上升后下降再上升的趋势(图 4e)。随着 SSTG 的增加, 对 CPUE 的影响也逐渐增加(图 4f)。SSH 对 CPUE 的影响也显示出一些波动(图 4g), 当海表面高度在 0.1~0.6 m 时, CPUE 随 SSH 的增加而渐渐增加, 0.6~1.2 m 之间, CPUE 呈现下降的趋势。

2.5 名义 CPUE 和标准化 CPUE 比较

图 5 为年间及月间名义 CPUE 与基于 GLM 和 GAM 模型的标准化 CPUE 变化趋势。从图 5a 可以看出, GLM 模型标准化 CPUE 均低于名义 CPUE, 且 2003~2017 年间标准化 CPUE 与名义 CPUE 的变化趋势相近。对于 GAM 模型, 除 2003 年外, 标准化

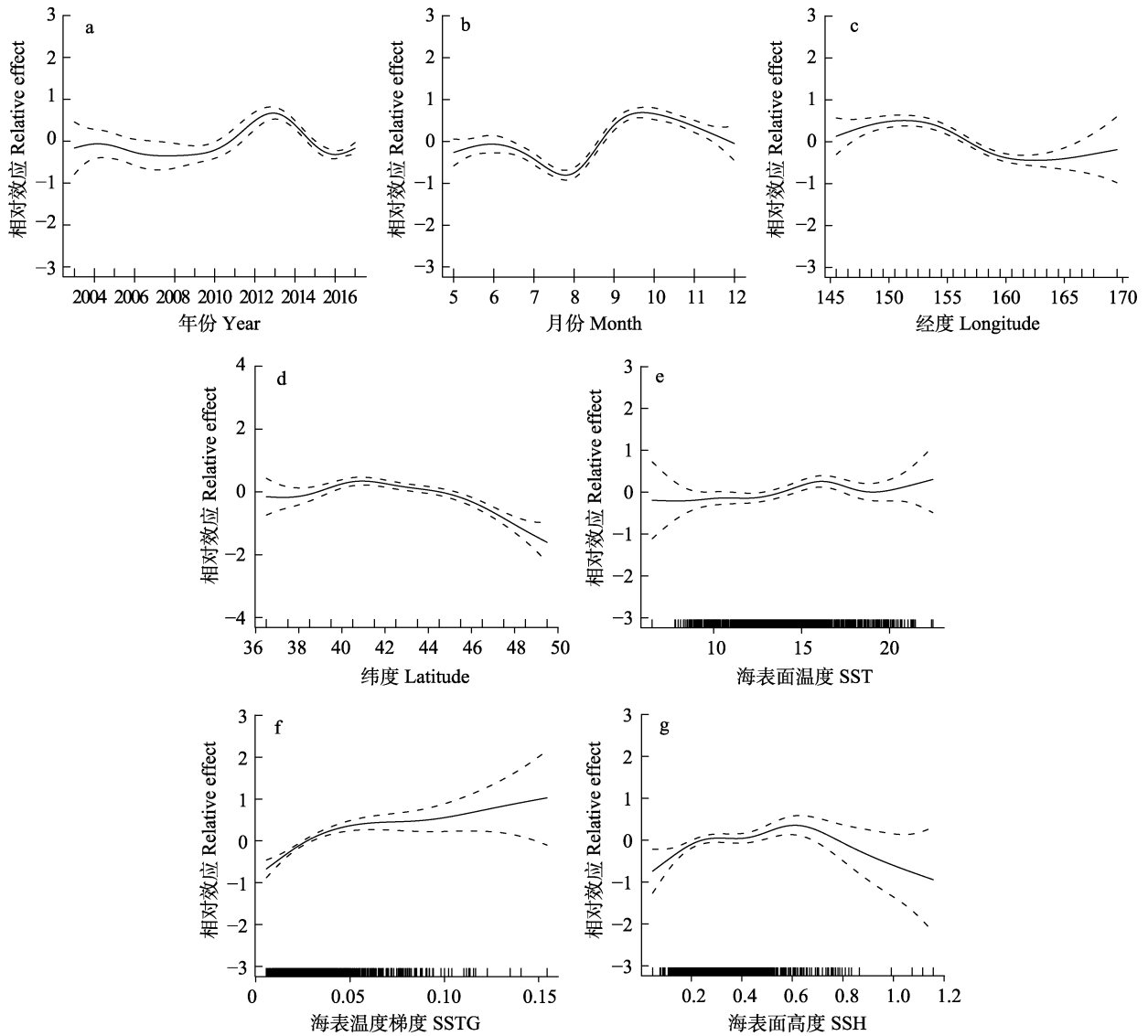


图 4 各解释变量对西北太平洋秋刀鱼渔业 CPUE 的影响

Fig.4 Effects of temporal, spatial and environmental variables on Pacific saury CPUE derived from the GAM analysis in the northwest Pacific Ocean

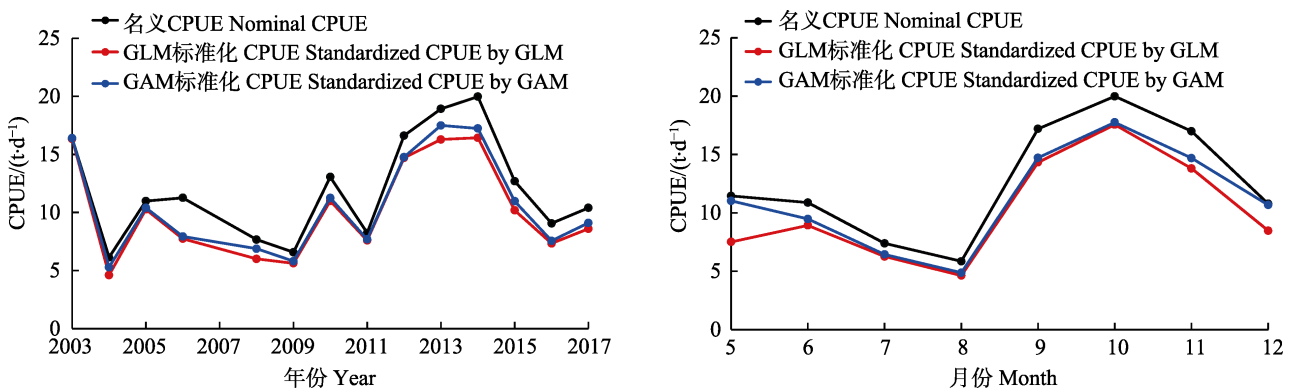


图 5 基于 GLM 和 GAM 模型的西北太平洋秋刀鱼标准化 CPUE

Fig.5 Standardized CPUE of Pacific saury in the Northwest Pacific Ocean based on GLM and GAM models

CPUE 均低于相应的名义 CPUE, 变化趋势同样与名义 CPUE 相近。GLM 和 GAM 模型的标准化 CPUE 之间存在一些差别, 这可能与 CPUE 和解释变量之间关系的假设有关。图 5b 为 GLM 和 GAM 模型估算出的月间标准化 CPUE 变化趋势, 名义 CPUE 及 GAM 模型的标准化 CPUE 从 5~8 月间标准化 CPUE 逐渐下降, 9~12 月标准化 CPUE 呈先增加后下降的趋势, 10 月 CPUE 值最高。GLM 模型的标准化 CPUE 在 5~6 月之间呈上升趋势, 其他月份与名义 CPUE 变化趋势相似。

3 讨论

3.1 时空效应对西北太平洋秋刀鱼 CPUE 影响

GLM和GAM模型分析显示, 时间因素(即年份和月份)和空间因素(即经度和纬度)均对CPUE有显著影响($P<0.05$), 在CPUE标准化建模过程中起着重要作用, 是主要的影响变量。GAM模型分析显示, 对CPUE影响最重要的因素为经度和年份, 这2个因素占较大的影响百分比。资源波动、海洋环境条件、气候和捕捞努力的变化最终导致CPUE的年间和月间波动。2003~2005年标准化CPUE呈先增加后降低的趋势, 2005~2009年CPUE逐渐下降, 并在2009年降至过去12年间最低水平(图5a)。2009年后, 标准化CPUE显著增长, 在2014年达到峰值, 但随后逐渐下降。捕捞努力量的变化可能是CPUE年间波动和下降的主要原因。2009年之前, 中国秋刀鱼渔业处于发展阶段, 秋刀鱼渔业规模较小, 产量较低。随着秋刀鱼渔船数量的上升和渔网具的优化改进, 秋刀鱼渔获量逐渐上升, CPUE同样有所提高。Tian等(2002)研究认为, 秋刀鱼资源的年间波动与南方涛动指数和太平洋冬季季风指数相关。此外, 黑潮延伸区的海表面水温对秋刀鱼资源丰度的长期变动也有重要影响。标准化CPUE在月间显著不同($P<0.05$), 从5月到8月逐渐减少, 然后从9~12月先增加后减少, 10月达到峰值(图5b), 这一结果与吴越等(2015)和晏磊等(2012)的研究结果一致。秋刀鱼的季节性洄游和渔业作业生产时间可能是CPUE季节性波动的主要原因, 因此, 产生了一定的月间波动。

GLM及GAM模型标准化后的CPUE均显示了西北太平洋秋刀鱼资源存在着空间上的差异。研究结果显示, 在 $36^{\circ}\sim 41^{\circ}\text{N}$ 和 $145^{\circ}\sim 151^{\circ}\text{E}$ 的范围内, CPUE随着经度和纬度的增加而增加, 但存在一定的波动, 这与Chang等(2018)的结果相似, 在 41°N 和 151°E 附近海域达到峰值, 随后出现下降趋势, 这种变化波动可能

与秋刀鱼的迁徙路线有关。秋刀鱼在8月之前, 从南部海域迁移到北部海域索饵, 然后, 从9月开始沿 46°N 附近返回到南部海域(Tian, 2003; 沈建华等, 2004)。在其向北迁徙期间, 秋刀鱼分布广泛, 渔场相对分散, 在其向南迁徙过程中, 由于亲潮海流强度的增加和丰富的海水养分导致了浮游生物的增加, 使得秋刀鱼鱼群逐渐集中在沿海水域附近(何敏等, 1999), 该处渔获量不断增加, 直到12月初的捕捞季节结束。同时, 秋刀鱼高集群、大密度的洄游会对CPUE产生影响。由此可见, 时空效应对西北太平洋秋刀鱼CPUE具有较大影响, 在CPUE标准化建模中应占较大权重。

3.2 环境效应对西北太平洋秋刀鱼 CPUE 影响

秋刀鱼的资源分布与海洋环境因素密切相关(Stephens *et al*, 2004; Takasuka *et al*, 2014; 张人禾等, 2017)。本研究中, GLM 和 GAM 模型检验结果均表明, SST 对 CPUE 有极显著影响($P<0.01$)。在 $11^{\circ}\text{C}\sim 15^{\circ}\text{C}$ 的海表面温度范围内, CPUE 随 SST 的增加而缓慢增加, 这与朱清澄等(2006)的研究结果一致。Tseng 等(2013)研究发现, 在北太平洋公海海域, 秋刀鱼产量主要分布在海表面温度 $14^{\circ}\text{C}\sim 16^{\circ}\text{C}$ 范围。Syah 等(2017)研究认为, 西北太平洋海域秋刀鱼最适水温为 $13^{\circ}\text{C}\sim 18^{\circ}\text{C}$ 。Ito 等(2013)研究发现, 海表面温度升高及尺度降低将阻止或延缓秋刀鱼在冬季的南下洄游, 这也验证了本研究的结果。SST 在海洋小型中上层鱼类(如秋刀鱼)资源分布中有重要的影响(石永闯等, 2019), 因此, 在秋刀鱼 CPUE 标准化研究中应着重考虑, 赋予其较大权重。

GLM 和 GAM 模型结果显示, CPUE 与 SSH 和 SSTG 均存在显著相关性($P<0.05$)。SSH 在 $0.2\sim 0.6\text{ m}$ 之间, CPUE 随 SSH 的增加而增加; 在 $0.6\sim 1.2\text{ m}$ 之间, CPUE 呈波动略有下降的趋势。SSTG 为 $0.05\sim 0.15^{\circ}\text{C}/\text{km}$ 时, CPUE 随 SSTG 的增加而增加, 该结果与 Tian 等(2004)的研究结果一致。因此, 环境因素对秋刀鱼 CPUE 有重大影响, 在未来的秋刀鱼渔业资源分布、生物学及资源评估研究中应予以考虑。

3.3 GLM 和 GAM 模型对比

GLM 和 GAM 模型是进行 CPUE 标准化的常用模型, 二者均存在各自的优点和局限性。GLM 模型假设响应变量和解释变量之间存在线性关系。然而, 鱼群密度和环境因素之间通常存在非线性关系(Walsh *et al*, 2001; Denis *et al*, 2002)。例如, 对秋刀鱼 CPUE 影响最重要的 3 个影响因子 SST、纬度和经度均可能与秋刀鱼 CPUE 存在非线性关系。GAM 模型

是 GLM 模型的扩展, 其中, 解释变量已被平滑函数替换, 以处理响应变量和解释变量之间的非线性关系。应用 GAM 模型对 CPUE 进行标准化的例子非常多, 但其任何形式的推断过程(假设检验、置信区间等)均可能存在问题。尽管如此, 本研究中, GLM 和 GAM 模型在估算相对资源丰度时均有良好的表现。

本研究 GLM 模型分析显示, 年份、月份、经度、纬度、SST、SSTG、SSH 和交互项年份×月份均为显著变量, 对 CPUE 有显著的影响($P < 0.05$)。而 GAM 模型分析显示, 交互项包括年份×月份、月份×经度、月份×纬度、经度×纬度对 CPUE 有显著影响($P < 0.05$)。GAM 模型解释偏差百分比高于 GLM 模型(表 2 和表 5), 可以看出 CPUE 和解释变量之间的线性关系可能较弱, 偏差解释率仅为 52.47%, CPUE 和解释变量可能存在更多的非线性关系, 解释偏差率达到 61.9%。比较 GLM 和 GAM 模型分析中的 5 折交叉验证结果发现(表 4 和表 7), 通过 GAM 模型观察到测试数据的观察值和预测值之间有更高的 Spearman 相关性和更低的均方误差(MSE)。因此, GAM 模型可能比 GLM 模型更适合西北太平洋秋刀鱼 CPUE 标准化。

结果显示, 对于年均 CPUE, GLM 模型和 GAM 模型标准化后的 CPUE 均小于名义 CPUE, 且年间波动均较名义 CPUE 波动小, 但 GLM 模型标准化后的 CPUE 与名义 CPUE 的变化趋势有一定差异, 而 GAM 模型得到的 CPUE 与名义 CPUE 的变化趋势基本相同(图 5a)。对于月平均 CPUE, GLM 模型得到的 CPUE 和名义 CPUE 变化趋势存在差异(图 5b), GAM 模型标准化的 CPUE 值均比名义 CPUE 小, 且趋势与名义 CPUE 基本一致。从统计学来看, GLM 模型只能应用于响应变量的期望值与解释变量呈线性关系的 CPUE 标准化中, 而影响秋刀鱼渔业的很多因素和 CPUE 之间可能呈非线性关系, GAM 模型则可以处理这种非线性关系(Yu, 2013), 同时, GAM 模型中各个解释变量都是独立的, 互不影响, 用于西北太平洋秋刀鱼渔业 CPUE 标准化更加准确。综上所述, GAM 模型较 GLM 模型更加适用于西北太平洋秋刀鱼渔业 CPUE 标准化。

3.4 不足与展望

本研究首次使用 GLM 和 GAM 模型对西北太平洋秋刀鱼 CPUE 进行了标准化研究。结果表明, GAM 模型比 GLM 模型更适合秋刀鱼渔业 CPUE 标准化研究, 研究结果可对秋刀鱼资源评估研究打下基础, 为秋刀鱼资源养护和管理提供参考。但是, 本研究仍然存在一些不足和需改善之处。例如, 本研究假设名义

CPUE 在空间上是相互独立的, 但往往 CPUE 观测存在一定的空间相关性(官文江等, 2014; 徐洁等, 2015); GLM 和 GAM 模型在处理误差结构、变量选择以及复杂交互效应问题时缺乏一定的灵活性; 模型假设响应变量为正态分布, 但经检验发现, $\ln(\text{CPUE})$ 为近似正态分布。因此, 这些因素都有可能增加秋刀鱼渔业 CPUE 标准化结果的不确定性。为得到更加准确的 CPUE 标准化结果, 制定更加科学合理的渔业管理策略, 在今后的研究中, 可以从以下几方面改进: (1)从原始渔业数据入手, 完善数据统计机制, 获取更加准确的名义 CPUE 数据; (2)考虑名义 CPUE 存在的空间自相关性, 将其加入到 CPUE 标准化模型中; (3)尽可能使用更多模型, 比如基于栖息地的 CPUE 标准化方法、回归树模型、贝叶斯 CPUE 标准化方法等, 并将研究结果进行对比分析, 以期更好地为秋刀鱼渔业的可持续发展服务。

参 考 文 献

- Arlot S, Celisse A. A survey of cross-validation procedures for model selection. *Statistics Surveys*, 2010, 4: 40–79
- Campbell RA. CPUE standardization and the construction of indices of stock abundance in a spatially varying fishery using general linear models. *Fisheries Research*, 2004, 70(2–3): 209–227
- Chang YJ, Lan KW, Walsh AW, *et al.* Modelling the impacts of environmental variation on habitat suitability for Pacific saury in the Northwestern Pacific Ocean. *Fisheries Oceanography*, 2018(9): 1–14
- Chen CS, Chiu TS. Standardising the CPUE for the *Illex argentinus* fishery in the Southwest Atlantic. *Fisheries Science*, 2009, 75(5): 265–272
- Denis V, Lejeune J, Robin JP. Spatiotemporal analysis of commercial trawler data using general additive models: Patterns of Loliginid squid abundance in the north-east Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59(3): 633–648
- Erisman BE, Allen LG, Claisse JT, *et al.* The illusion of plenty: Hyperst ability masks collapses in two recreational fisheries that target fish spawning aggregations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2011, 68(10): 1705–1716
- Feng B, Yan YR, Zhang YM, *et al.* A new method to assess the population of *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 1–6 [冯波, 颜云榕, 张宇美, 等. 南海鳶乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)资源评估的新方法. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 1–6]
- Guan WJ, Chen XJ, Gao F, *et al.* Comparisons of regression tree and GLM performance in CPUE standardization. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 123–130 [官文江, 陈新军, 高峰, 等. GLM 模型和回归树模型在 CPUE 标准化中的比较分析. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(1): 123–130]
- Guan WJ, Tian SQ, Wang XF, *et al.* A review of methods and

- model selection for standardizing CPUE. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 852–862 [官文江, 田思泉, 王学昉, 等. CPUE 标准化方法与模型选择的回顾与展望. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 852–862]
- Harley SJ, Myers RA, Dunn A. Is catch-per-unit-effort proportional to abundance? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 58(9): 1760–1772
- He M, Song WL, Chen XF. Typhoon activity in the northwest Pacific in relation to El Niño/Lanina events. *Journal of Tropical Meteorology*, 1999, 15(1): 18–26 [何敏, 宋文玲, 陈兴芳. 厄尔尼诺和反厄尔尼诺事件与西北太平洋台风活动. *热带气象学报*, 1999, 15(1): 18–26]
- Hilborn R, Walters C. *Quantitative Fisheries Stock Assessment: Choice, Dynamics, and Uncertainty*. New York: Chapman and Hall, 1992
- Hinton MG, Maunder MN. Methods for standardizing CPUE and how to select among them. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT*, 2004, 56(1): 169–177
- Hua CX, Gao YZ, Zhu QC, *et al.* Age and growth of Pacific saury (*Cololabis saira*) in the Northwest Pacific Ocean based on statolith microstructure. *Haiyang Xuebao*, 2017, 39(10): 46–53 [花传祥, 高玉珍, 朱清澄. 基于耳石微结构的西北太平洋秋刀鱼(*Cololabis saira*)年龄与生长研究. *海洋学报*, 2017, 39(10): 46–53]
- Hua CX, Zhu QC, Wu YH, *et al.* Fishing ground distribution of *Cololabis saira* and its correlation with SST in the Northwestern Pacific from July to September 2005. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2006, 8(5): 90–94 [花传祥, 朱清澄, 吴永辉, 等. 2005 年西北太平洋公海秋刀鱼渔场分布及其与表温之间的关系. *中国农业科技导报*, 2006, 8(5): 90–94]
- Ito S, Okunishi T, Kishi MJ, *et al.* Modelling ecological responses of Pacific saury (*Cololabis saira*) to future climate change and its uncertainty. *ICES Journal of Marine Science*, 2013, 70(5): 980–990
- Kohavi R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. In: 14th International Joint Conference on Artificial Intelligence (IJCAI), San Francisco, CA, 1995, <http://frodo.stanford.edu/papers/cross-validation-1.pdf>
- Li N, Chen XJ, Wang R. Incorporating spatial autocorrelation into CPUE standardization with an application to the *Illex argentinus*. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(2): 61–68 [李娜, 陈新军, 王冉. 基于空间自相关的阿根廷滑柔鱼 CPUE 标准化研究. *海洋学报*, 2018, 40(2): 61–68]
- Li YN, Dai XJ, Zhu JF, *et al.* Impact of catch uncertainty on the stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 1–9 [李亚楠, 戴小杰, 朱江峰, 等. 渔获量不确定性对印度洋大眼金枪鱼资源评估的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 1–9]
- Lu HJ, Chen XJ, Cao J, *et al.* CPUE standardization of *Illex argentinus* for Chinese mainland squid-jigging fishery in the Southwest Atlantic Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 951–960 [陆化杰, 陈新军, 曹杰, 等. 中国大陆阿根廷滑柔鱼鱿钓渔业 CPUE 标准化. *水产学报*, 2013, 37(6): 951–960]
- Mateo I, Hanselman DH. A comparison of statistical methods to standardize catch-per-unit-effort of the Alaska longline sablefish. United States Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-AFSC-269, 2014, 71
- Maunder MN, Punt AE. Standardizing catch and effort data: A review of recent approaches. *Fisheries Research*, 2004, 70(2–3): 141–159
- Maunder MN, Start PJ. Firing fisheries models to standardized CPUE abundance indices. *Fisheries Research*, 2003, 63(2): 43–50
- Menard SW. *Applied logistic regression analysis*. SAGE, Thousand Oaks, 2011
- Nakaya M, Morioka T, Fukunaga K, *et al.* Growth and maturation of Pacific saury *Cololabis saira* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, 2010, 76(1): 45–53
- Quinn GP, Keough MJ. *Experimental design and data analysis for biologists*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 277(3): 197–198
- Rodriguez ME, Arrizabalaga H, Ortiz M, *et al.* Standardization of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) catch per unit effort in the bait boat fishery of the Bay of Biscay (Eastern Atlantic). *ICES Journal of Marine Science*, 2003, 60(1): 1216–1231
- Salthaug A, Aanes S. Catchability and the spatial distribution of fishing vessels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2003, 60(3): 259–268
- Shen JH, Han SX, Fan W, *et al.* Saury resource and fishing grounds in the Northwest Pacific. *Marine Fisheries*, 2004(1): 61–65 [沈建华, 韩士鑫, 樊伟, 等. 西北太平洋秋刀鱼资源及其渔场. *海洋渔业*, 2004(1): 61–65]
- Shi YC, Chen XJ. A review of stock assessment methods on small pelagic fish. *Marine Fisheries*, 2019, 41(1): 118–128 [石永闯, 陈新军. 小型中上层海洋鱼类资源评估研究进展. *海洋渔业*, 2019, 41(1): 118–128]
- Shi YC, Zhu QC, Hua CX, *et al.* Sinking and rising performance of saury stick-held based on field measurements. *Marine Science Bulletin*, 2018, 37(4): 459–467 [石永闯, 朱清澄, 花传祥, 等. 基于海上实测的秋刀鱼舷提网沉降和提升性能研究. *海洋通报*, 2018, 37(4): 459–467]
- Shi YC, Zhu QC, Huang SL, *et al.* Stock assessment of Pacific saury (*Cololabis saira*) in the Northwest Pacific using a Bayesian Schaefer model. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 1–10 [石永闯, 朱清澄, 黄硕琳, 等. 基于贝叶斯 Schaefer 模型的西北太平洋秋刀鱼资源评估和管理. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 1–10]
- Shi YC, Zhu QC, Zhang YD, *et al.* Factors influencing the rope tension of saury stick-held lift nets. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 704–712 [石永闯, 朱清澄, 张衍栋, 等. 基于模型试验的秋刀鱼舷提网网索张力性能研究. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 704–712]
- Shono H. Is model selection using Akaike's information criterion appropriate for catch per unit effort standardization in large samples? *Fisheries Research*, 2005, 71(5): 978–986
- Stephens A, Maccall A. A multispecies approach to subsetting logbook data for purposes of estimating CPUE. *Fisheries Research*, 2004, 70(2–3): 299–310

- Syah FA, Saitoh S, Alabia DI, *et al.* Detection of potential fishing zone for Pacific saury (*Cololabis saira*) using generalized additive model and remotely sensed data. IOP Conference Series Earth and Environmental Science, IOP Publishing, 2017, 1–7
- Takasuka A, Kuroda H, Takeshi O, *et al.* Occurrence and density of Pacific saury *Cololabis saira* larvae and juveniles in relation to environmental factors during the winter spawning season in the Kuroshio current system. Fisheries Oceanography, 2014, 23(4): 304–321
- Tang ZM, Huang HL, Shi JG. An approach to exploitation and utilization of *Cololabis saira* resource in northwest Pacific Ocean. Marine Sciences, 2004, 28(10): 56–59 [汤振明, 黄洪亮, 石建高. 中国开发利用西北太平洋秋刀鱼资源的探讨. 海洋科学, 2004, 28(10): 56–59]
- Tao YJ, Feng B, Yi MR, *et al.* A novel approach to unit standardization of CPUE for multiple types of fishing gear based on fishing port sampling surveys. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 15–24 [陶雅晋, 冯波, 易木荣, 等. 基于渔港抽样调查不同捕捞方式 CPUE 单位标准化新方法. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 15–24]
- Thorson JT, Ward EJ. Accounting for space-time interactions in index standardization models. Fisheries Research, 2013, 147: 426–433
- Tian YJ, Akamine T, Suda M. Modeling the influence of oceanic-climatic changes on the dynamics of Pacific saury in the Northwestern Pacific using a life cycle model. Fisheries Oceanography, 2004, 13(S1): 125–137
- Tian YJ, Ueno Y, Suda M, *et al.* Climate-ocean variability and the response of Pacific saury (*Cololabis saira*) in the Northwestern Pacific during the last half century. Fisheries Science, 2002, 68(S1): 158–161
- Tian YJ. Variations in the abundance of Pacific saury (*Cololabis saira*) from the Northwestern Pacific in relation to oceanic climate changes. Fisheries Research, 2003, 60(2–3): 439–454
- Tiana Y, Ueno Y, Suda M. Decadal variability in the abundance of Pacific saury and its response to climatic oceanic regime shifts in the northwestern subtropical Pacific during the last half century. Journal of Marine Systems, 2004, 52: 235–257
- Tien BD, Lofman O, Revhaug I, *et al.* Landslide susceptibility analysis in the Hoa Binh Province of Vietnam using statistical index and logistic regression. Natural Hazards, 2011, 59(3): 1413–1444
- Tseng CT, Su NJ, Sun CL. Spatial and temporal variability of the Pacific saury (*Cololabis saira*) distribution in the northwestern Pacific Ocean. ICES Journal of Marine Science, 2013, 70(5): 991–999
- Venables WN, Dichmont CM. GLMs, GAMs and GLMMs: An overview of theory for applications in fisheries research. Fisheries Research, 2004, 70(2–3): 319–337
- Walsh WA, Kleiber P. Generalized additive model and regression tree analyses of blue shark (*Prionace glauca*) catch rates by the Hawaii-based commercial longline fishery. Fisheries Research, 2001, 53(2): 115–131
- Watanabe K, Tanaka E, Yamada S, *et al.* Spatial and temporal migration modeling for stock of Pacific saury *Cololabis saira* (Brevoort), incorporating effect of sea surface temperature. Fisheries Science, 2006, 72(6): 1153–1165
- Watanabe Y, Butler JL, Mori T. Growth of Pacific saury, *Cololabis saira*, in the Northeastern and Northwestern Pacific Ocean. Fishery Bulletin, 1988, 86(3): 489–498
- Wu Y, Huang HL, Liu J, *et al.* Spatiotemporal distribution pattern of saury fishing grounds and catch yield per unit effort in the Northern Pacific high sea in 2014. Fishery Modernization, 2015, 42(3): 61–64 [吴越, 黄洪亮, 刘健, 等. 西北太平洋公海秋刀鱼渔场及 CPUE 值的时空分布. 渔业现代化, 2015, 42(3): 61–64]
- Xu J, Guan WJ, Chen XJ. A study of incorporating spatial autocorrelation into CPUE standardization with an application to *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific Ocean. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 754–760 [徐洁, 官文江, 陈新军. 基于空间相关性的西北太平洋柔鱼 CPUE 标准化研究. 水产学报, 2015, 39(5): 754–760]
- Xu W, Zhu QC, Zhang XC. Bouke net fishing technology of Pacific saury in the Northwest Pacific. Shandong Fisheries, 2005, 22(10): 43–46 [许巍, 朱清澄, 张先存. 西北太平洋秋刀鱼舷提网捕捞技术. 齐鲁渔业, 2005, 22(10): 43–46]
- Yan L, Zhu QC, Zhang Y, *et al.* Fishing ground distribution of saury and its correlation with SST in the Northern Pacific high sea in 2010. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4): 609–615 [晏磊, 朱清澄, 张阳, 等. 2010 年北太平洋公海秋刀鱼渔场分布及其与表温的关系. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 609–615]
- Ye Y, Dennis D. How reliable are the abundance indices derived from commercial catch–effort standardization? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2009, 66(7): 1169–1178
- Yu H, Jiao Y, Carstensen LW. Performance comparison between spatial interpolation and GLM/GAM in estimating relative abundance indices through a simulation study. Fisheries Research, 2013, 147: 186–195
- Zavolokin A. Priority species[EB/OL]. NPFC[2018-06-09]. <https://www.npfc.int/priority-species>
- Zhang RH, Min QY, Su JZ. Impact of El Niño on atmospheric circulations over East Asia and rainfall in China: Role of the anomalous western North Pacific anticyclone. Science China Earth Sciences, 2017, 47(5): 544–553 [张人禾, 闵庆焯, 苏京志. 厄尔尼诺对东亚大气环流和中国降水年际变异的影响: 西北太平洋异常反气旋的作用. 中国科学: 地球科学, 2017, 47(5): 544–553]
- Zhang XM, Zhu QC, Hua CX, *et al.* Fishing ground distribution of saury and its correlation with marine environment factors in the Northern Pacific high sea in 2013. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(5): 773–782 [张孝民, 朱清澄, 华传祥, 等. 2013 年北太平洋公海秋刀鱼渔场与海洋环境的关系. 上海海洋大学学报, 2015, 24(5): 773–782]
- Zhang Y, Zhu QC, Yan L, *et al.* Preliminary study on biological characteristics of *Cololabis saira* in the northwest Pacific Ocean in spring. Transactions of Oceanology and Limnology, 2013(1): 53–60 [张阳, 朱清澄, 晏磊, 等. 西北太平洋公

海春季秋刀鱼生物学特性的初步研究. 海洋湖沼通报, 2013(1): 53–60]

Zhu QC, Hua CX, Xu W, *et al.* The fishing ground distribution of *Cololabis saira* and its relationship with water temperature

factors in the Northwestern Pacific from July to September. Marine Fisheries, 2006, 28(3): 228–233 [朱清澄, 花传祥, 许巍, 等. 西北太平洋公海 7~9 月秋刀鱼渔场分布及其与水温的关系. 海洋渔业, 2006, 28(3): 228–233]

(编辑 冯小花)

Study on CPUE Standardization of Chinese Pacific Saury (*Cololabis saira*) Fishery in the Northwest Pacific Ocean

SHI Yongchuang¹, ZHU Qingcheng^{2,3①}, HUANG Shuolin^{1,2,4}, FENG Huili²

(1. College of Marine Culture and Law, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. National Engineering Research Center for Pelagic Fishery, Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306;

4. Institute of Marine Policy and Law, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Pacific saury (*Cololabis saira*) is an important high-seas fishery resource in the Northwest Pacific Ocean for the Chinese mainland. The species is widely distributed in the international waters of the Northwestern Pacific Ocean ranging from the subarctic to subtropical regions. With a long-distance and large-scale migratory route, sauries experience extremely complicated oceanographic and climatic conditions throughout their entire lifecycle. They are known to pass northwards through the Kuroshio-Oyashio Transition Zone (TZ) and then return southwards to the coastal waters of Japan in winter. The species is harvested primarily by the countries of Japan, Russia, South Korea, Taiwan Province, and mainland China. China began Pacific saury fishing in the high seas in 2003, and it has since become one of the most important fisheries for China. Owing to increasingly commercial, cultural, bioeconomic, and ecological values, saury has been listed among the priority species by North Pacific Fisheries Commission (NPFC). Catch per unit effort (CPUE) is an important relative index and dataset of fish abundance commonly used in fisheries stock assessment. Reliable and accurate CPUE plays a significant role in Pacific saury stock assessment. Many statistical models have been used in the previous CPUE standardization research. Here, we compare the performance of Generalized Linear Models (GLMs) and Generalized Additive Models (GAMs) using CPUE data collected from Chinese saury fisheries in the Northwest Pacific Ocean from 2003 to 2017 (excluding data from Taipei of China) and evaluate the influence of spatial, temporal, environmental variables, and vessel length on CPUE. Optimal GLM/GAM models were selected using the Bayesian information criterion (BIC). Explained deviance and five-fold bootstrap cross-validation results were used to compare the performance of the two model types. Fitted GLMs accounted for 52.47% of the total model-explained deviance, while GAMs accounted for 61.9%. Predictive performance metrics and five-fold cross-validation results showed that the best GAM performed better than the best GLM. Therefore, we recommend a GAM as the preferred model for standardizing CPUE of Pacific saury in the Northwest Pacific Ocean. The goal of this study was to identify the best method for standardizing Pacific saury CPUE data and improve the quality of future stock assessment for Pacific saury.

Key words *Cololabis saira*; Generalized additive model; Generalized linear model; CPUE standardization; Northwest Pacific Ocean

① Corresponding author: ZHU Qingcheng, E-mail: qc Zhu@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190623001

http://www.yykxjz.cn/

胡芷君, 单秀娟, 杨涛, 丁琪. 渤海伏季休渔效果初步评价. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 13–21

Hu ZJ, Shan XJ, Yang T, Ding Q. Preliminary evaluation of summer fishing moratorium in the Bohai Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 13–21

渤海伏季休渔效果初步评价*



胡芷君^{1,3} 单秀娟^{2,3①} 杨涛^{2,3} 丁琪^{2,3}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071)

摘要 本研究基于渔业统计和资源调查数据, 比较分析了我国实施伏季休渔制度 20 多年来对渤海渔业资源的影响。结果显示, 1995 年实施伏季休渔制度以后, 渤海捕捞产量和捕捞效率在短期内大幅增加, 特别是小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)的捕捞产量分别增加了 3.96 倍和 1.74 倍, 占渤海总捕捞产量的比重有所提高。1999 年以后, 捕捞产量逐年下降, 并于 2008 年趋于稳定。资源调查结果显示, 在 1998~2014 年渤海渔业资源量急剧下降之后, 近年来有资源量增加迹象, 鳀(*Engraulis japonicus*)、银鲳(*Pampus argenteus*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)等经济种类的资源量在 2014~2015 年有所提高, 但总体低于 1992 年同期水平。休渔期内, 渤海主要渔业种类得到了生长繁殖的时间和空间, 资源量增加了 3 倍以上, 渔业生物平均体长和体重增加, 但长期以来资源小型化和低质化趋势未见好转。

关键词 渤海; 伏季休渔; 渔业资源; 养护

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)05-0002-09

渤海具有丰富的陆源性营养物质补充, 为海洋生物提供了充足的饵料生物、适宜的水动力条件和栖息环境, 是中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus haumela*)等重要经济种类的产卵场、索饵场和育幼场, 被称为我国的“战略粮仓”。20 世纪 50 年代以来, 由于受到人类活动和环境变化的影响, 渤海渔业资源严重衰退, 渔业生物群落结构和生态环境遭到破坏, 严重阻碍了渔业资源的可持续发展(单秀娟等, 2012; 李忠义

等, 2017; 吴强等, 2018)。为遏制近海渔业资源继续恶化, 我国实施了一系列渔业资源养护和管理措施, 其中, 伏季休渔制度是影响范围最广、程度最深、涉及渔船渔民数量最多的管理政策。1995 年开始, 我国相继在东海和黄渤海实施伏季休渔制度。为了更好地保护产卵群体和幼鱼等渔业资源, 2017 年伏季休渔时限调整为 4~4.5 个月, 每年 5 月 1 日~9 月 1 日期间在渤海禁止除钓具外的其他渔具类型作业。

1995 年至今, 我国实施伏季休渔制度已有 20 多

* 国家重点研发计划(2017YFE0104400)、山东省泰山学者专项基金项目 and 青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山人才培养计划项目(2017ASTCP-ES07)共同资助 [This work was supported by 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)].

胡芷君, E-mail: h_zj2019@163.com

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

收稿日期: 2019-06-23, 收修改稿日期: 2019-07-29

年,其在缓解捕捞对渔业资源带来的巨大压力和资源养护方面具体发挥了多大作用?对渔业资源的可持续补充贡献如何?这些都是评估伏季休渔制度的关键问题。有关休渔(禁渔)效果评价的研究在我国南海、东海、长江、珠江以及国外的地中海、北海中部和苏格兰西海岸水域等均有报道(卢昌彩等,2015;邹建伟等,2016;段辛斌等,2008;高原等,2017;Clarke *et al.*, 2015; Samy-Kamal *et al.*, 2015)。研究方法可分为2种:理论模型方法和统计分析方法。多数研究结果显示,伏季休渔和春季禁渔在保护产卵群体和补充群体以及提高社会经济效益等方面都起到一定的积极作用,但仍需进一步对伏季休渔制度加以完善(Demestre *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016; 严利平等, 2019)。目前,关于渤海伏季休渔制度的实施效果评价尚未见报道。本研究利用渤海渔业资源调查数据,结合《中国渔业统计年鉴》,分析了伏季休渔制度实施以来渤海渔业资源的动态变化,以及伏季休渔对渤海捕捞产量、资源量、渔获种类组成及其生物学特征等方面的影响,旨在进一步完善伏季休渔制度,为渤海渔业资源的可持续发展提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 数据来源和分析

渔业统计资料来源于《中国渔业统计年鉴》(1979~2018年),包括渤海捕捞产量、渤海沿岸三省一市(辽宁省、河北省、山东省和天津市)捕捞产量及其在渤海的捕捞产量、三省一市的各渔获种类捕捞产量和海洋渔业机动渔船功率资料。采用海洋渔业机动渔船功率作为捕捞努力量,捕捞效率为捕捞量与捕捞努力量的比值。根据三省一市在渤海的捕捞产量与其总捕捞产量的比值,利用三省一市各渔获种类的捕捞产量换算出其在渤海的捕捞产量。

渔业资源调查数据,包括1992年10月,1993年5月,1998年5、8和10月,2004年5、10月,2010年5、8月,2014年8、10月和2015年5月。调查网具网口高度约为6 m,网口宽度为22.6 m,网口周长为1740目,网目为63 mm,网囊网目为20 mm,每个站点拖曳1 h,平均拖速约3.0 kn。每次拖网结束后,记录渔获种类、单位时间渔获量(kg/h)和渔获尾数(ind/h),测量主要经济种类的长度和体重等基础生物学信息,估算渤海渔业资源量。

伏季休渔制度的实施效果评价,一方面,将伏季休渔制度实施前(1979~1994年)和伏季休渔制度实施后(1995~2017年)2个时段的渤海捕捞产量和渔获种

类进行对比分析。另一方面,利用1992~2015年渤海季度渔业资源量、主要渔业种类资源量及其生物学资料,分析伏季休渔制度实施前后和休渔期间渤海资源量及其主要渔业种类的资源变动情况,以此评价渤海伏季休渔制度的实施效果。

1.2 资源量估计

以扫海面积法估计渤海资源量,通过计算单位面积内的资源量,分别估计整个调查海域的总资源量和单种资源量,计算公式如下:

$$B = \frac{C}{aq} A$$

式中, B 为总资源量或某一物种资源量(kg); C 为单位时间取样面积内的平均渔获量或某一物种平均渔获量(kg/h); a 为单位时间内拖网扫过的面积(km²),取0.1256 km²; q 为网具对某一种类的可捕系数,取值参照金显仕等(1998); A 为渤海总面积,约为77000 km²。

2 结果

2.1 渤海捕捞产量变化

1979年以来,渤海捕捞产量、捕捞努力量和捕捞效率变化见图1。伏季休渔制度实施前(1979~1994年),捕捞努力量处于快速增长期,捕捞产量随捕捞努力量增大,由38.06万t增至106.83万t,增长率为4.3万t/年。而捕捞效率在此期间逐年下降,降幅达36.33%,1990年开始快速增加。1995年伏季休渔实施后,捕捞产量增长加快,1995~1999年平均增长率为9.98万t/年。1999年

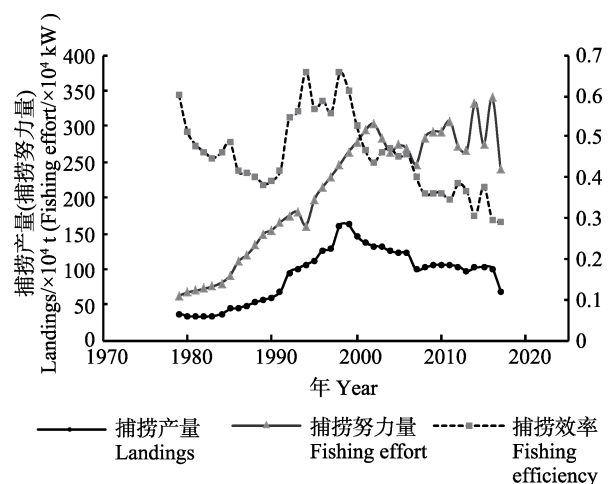


图1 1979~2017年渤海捕捞产量、捕捞努力量及捕捞效率变化

Fig.1 Landings, fishing effort and fishing efficiency in the Bohai Sea during 1979~2017

获得最大捕捞产量, 为162.45万t。捕捞效率也取得较大值(0.66 t/kW), 为1995年的1.15倍。此后, 捕捞产量持续下降, 并在2008年后基本稳定在100万t, 但2017年突然下降至69.8万t。在此期间, 捕捞努力量持续加大, 2002年突破300万kW, 近年来处于波动状态, 波动范围在239~340万kW之间, 年平均功率为286万kW。捕捞效率在1999年以后持续下降, 最低值为2017年的0.29 t/kW。

2.2 主要渔业种类捕捞产量变化

伏季休渔制度实施以来, 渤海各种主要渔业种类的捕捞产量有不同程度的增长, 其中小黄鱼和蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)等捕捞产量比重增加(图2, 图3)。1995~2007年渤海小黄鱼的捕捞产量范围为1.08~5.48万t, 平均捕捞产量为3.34万t, 比1983~1994年

伏季休渔制度实施前增加了3.96倍, 其在渤海总捕捞产量中所占比重由0.97%增加到2.60%, 2008年以后其捕捞产量基本稳定在6.5万t。带鱼、蓝点马鲛和海鳗(*Muraenesox cinereus*)等在伏季休渔制度实施前后的相同时间间隔内(12年), 捕捞产量分别增加了0.89、1.74和7.18倍, 其捕捞产量比重除带鱼外均有所增加, 2008年以后捕捞产量平均值分别为2.6、6.8和0.44万t。1995年后, 甲壳类捕捞产量总体呈下降趋势, 虽然在1996~2000年短期内有所增加(增长率为36.25%), 但2001年以后持续下降, 2017年捕捞产量仅为2000年的37.86%。20世纪90年代以来, 鳀(*Engraulis japonicus*)捕捞产量快速增加, 2003年达到最大值(22.01万t), 伏季休渔制度实施后其捕捞产量比重显著增加, 且高于小黄鱼、带鱼和蓝点马鲛所占比重的总和。

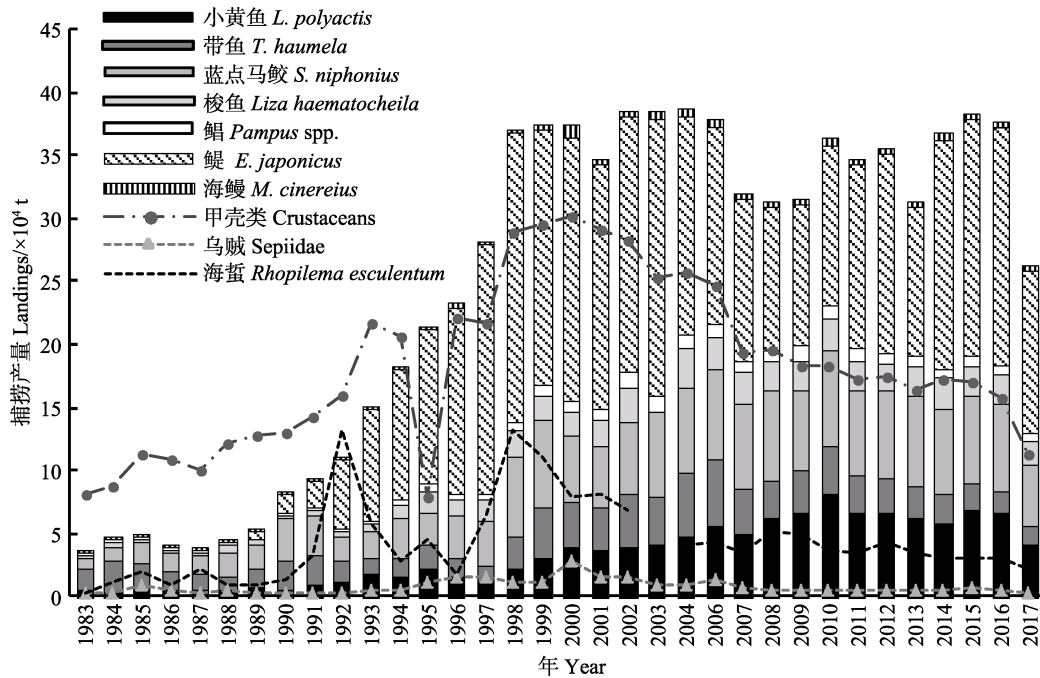


图 2 1983~2017 年渤海主要渔业种类捕捞产量变化

Fig.2 Landings of major fishery species in the Bohai Sea during 1983~2017

2.3 资源量年间和季节变动

从伏季休渔制度实施后的渔业资源来看, 季度资源量有较大波动(图 4)。1998~2010 年春季(5月)资源量呈持续下降趋势, 下降幅度为 74.6%。与 1998 年同期相比, 2010、2014 年夏季(8 月)资源量分别增加了 561%和 11.9%, 2004、2014 年秋季(10月)资源量分别减少了 90.5%和 63.4%。总体看来, 1998~2014 年平均季度资源量为 1.51 万 t, 最低为 2004 年的 0.31 万 t, 2010 年达

到最大值 2.88 万 t, 渤海渔业资源量急剧下降之后有所回升。对比春季(休渔前)、夏季(休渔期间)和秋季(休渔结束)的渔业资源量, 1998 年渔业资源量由春季的 0.83 万 t 逐渐增加为夏季的 0.84 万 t, 秋季资源量达 3.5 万 t, 增幅为 321.7%。而 2004 年总体资源量较低, 秋季资源量达到最大值, 仅为 0.33 万 t, 休渔前后资源量变化不大。2010~2014 年资源量有所回升, 平均资源量分别为 2.88 和 1.11 万 t, 2010 年夏季资源量出现最高峰 5.56 万 t, 2014 年在秋季资源量最高 1.28 万 t, 资源量增长明显。

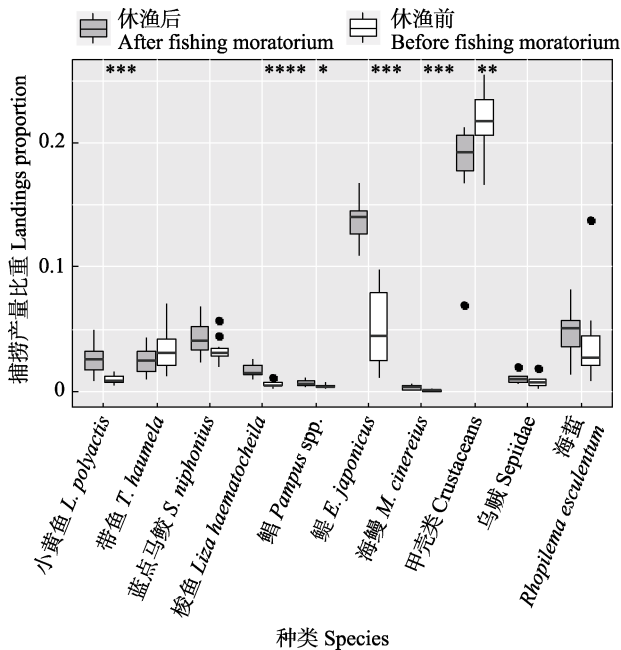


图3 伏季休渔制度实施前后主要渔业种类捕捞产量比重变化
Fig.3 Changes of major fishery species in the proportion of landings before and after the implementation of summer fishing moratorium

鳀的对比范围为伏季休渔制度实施前后6年，其他种类为伏季休渔制度实施前后12年

The comparison for anchovy (*E. japonicus*) was between 6 years before and after the summer fishing moratorium, the other species was between 12 years before and after the summer fishing moratorium

*: $P < 0.5$; **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$

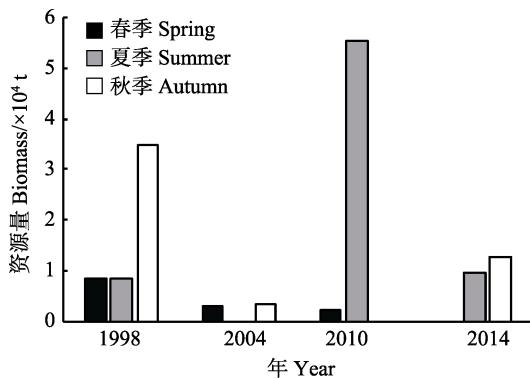


图4 1998~2014年渤海各季度资源量变化
Fig.4 Seasonal changes of the biomass in the Bohai Sea during 1998~2014

2.4 主要渔业种类资源量变动

1992~2015年渤海资源调查结果显示，银鲳(*Pampus argenteus*)和口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)在2015年春季资源量超过1993年同期，多数种类有资源

量增加迹象(图5)。银鲳春季资源量先减少后增加、且幅度较大，1993年为473 t，随后，从2004年的337 t下降为2010年89 t，2015年增长到2205 t，为1993年的4.6倍。此外，黄鲫(*Setipinna tenuifilis*)、斑鲳(*Konosirus punctatus*)、赤鼻棱鳀(*Thrissa kammalensis*)和口虾蛄春季资源量也有相似的变化趋势，在1993~2010年呈下降趋势，2015年有所增长，分别为其1993年春季资源量的12.77%、29.2%、26.59%和174.64%。三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在2004~2015年间春季资源量持续增加，涨幅为157.59%，而鳀和枪乌贼(*Loligo spp.*)春季资源量在1993~2015年间持续下降，降幅分别为99.15%和98.25%。

伏季休渔制度实施后，主要经济种类小黄鱼的秋季资源量仍呈下降趋势，由1992年的4619 t下降为2004年的320 t，降幅为93%，2014年继续下降到179 t，仅为1992年的3.87%。黄鲫和斑鲳资源量变化趋势与小黄鱼相同，1992~2014年秋季资源量分别下降了78.95%和99.5%。银鲳和青鳞小沙丁鱼(*Sardinella zunasi*)的秋季资源量呈现先增加后下降的趋势，1992年资源量分别为1920 t和1417 t，2004年增加了16.6%和220.5%，2014年银鲳秋季资源量急剧下降为2004年的17.78%，青鳞小沙丁鱼则略微下降为2004年的74.58%。与总资源量变化趋势相同，鳀、枪乌贼、三疣梭子蟹和口虾蛄秋季资源量呈急剧下降后上升的趋势，1992~2004年降幅分别为88.44%、99.23%、96.05%和98.72%，2014年增幅分别为1992年的16.72%、9.34%、18.15%和35.82%，口虾蛄恢复速度相对较快。

从资源量季节变化来看，主要渔业种类的资源量均有所增加。其中，斑鲳和三疣梭子蟹增幅较大，2004年秋季资源量分别为其春季的12.28和55.56倍。黄鲫和银鲳的涨幅分别为495.5%和564.7%。但伏季休渔结束后的高强度捕捞，使大多数渔业种类资源量严重下降。其中，鳀下降最为严重，2015年5月资源量仅为2014年10月的3.3%，黄鲫、枪乌贼和口虾蛄资源量分别下降到上年秋季的11.1%、7.75%和24.6%。然而，银鲳和三疣梭子蟹在遭受捕捞期间资源量上升，2015年5月的资源量分别为2014年10月的2.5和1.5倍。

2.5 主要渔业种类生物学特征变化

对比分析休渔期间渔业生物的体长和体重变化(图6)，2014年带鱼和黄鲫平均体长分别从8月(休渔期内)的64.16和89.49 mm增加到10月(休渔结束的)111.08和107.59 mm，涨幅分别为73.13%和20.23%，

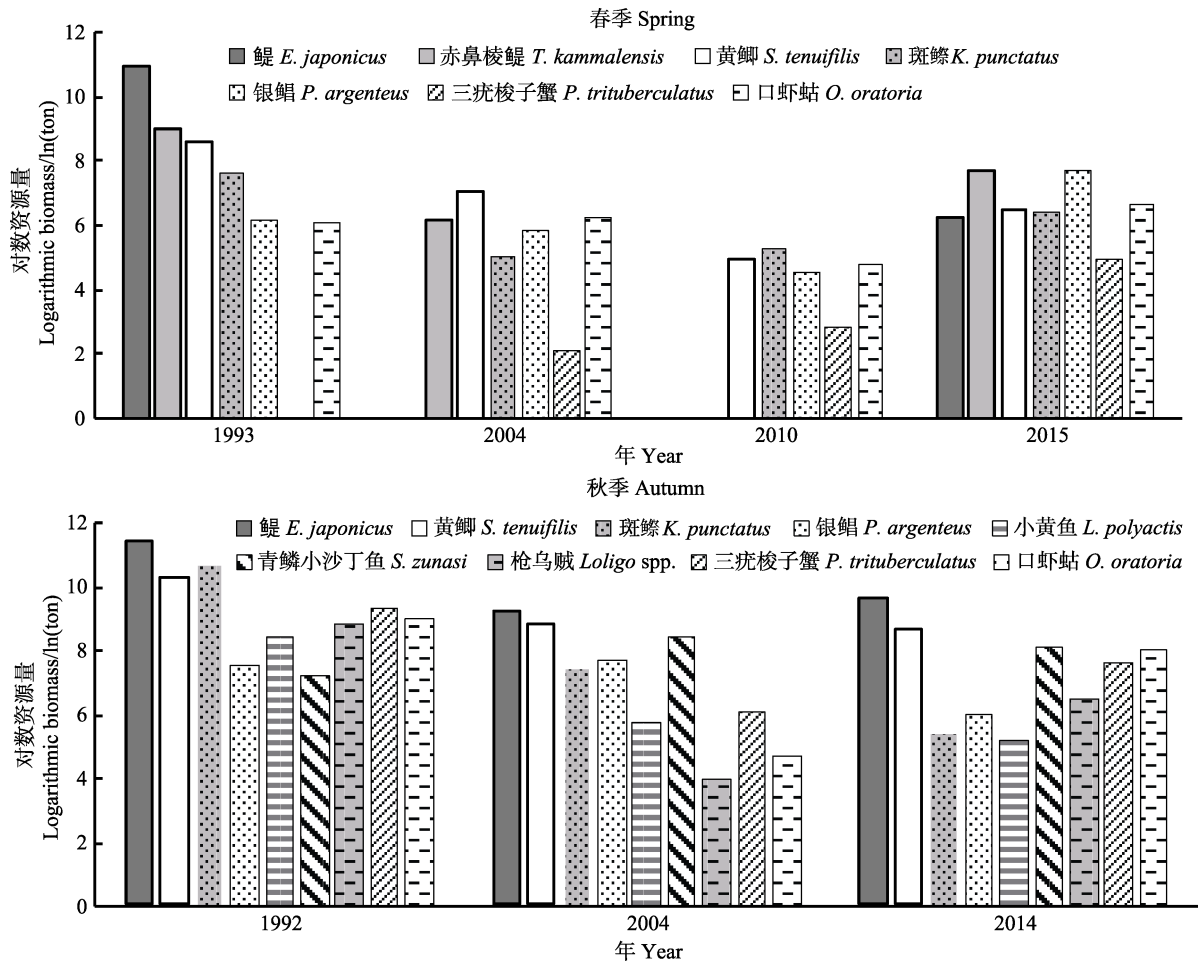


图 5 1992~2015 年春季和秋季渤海主要渔业种类资源量对数转换后的变化

Fig.5 Changes of the biomass after logarithmic conversion of the major fishery species in the Bohai Sea in spring and summer during 1992~2015

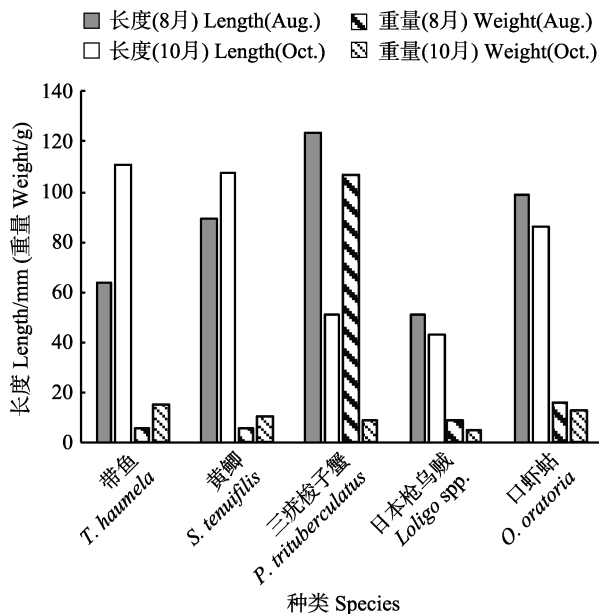


图 6 2014 年渤海主要渔业种类的平均体长和重量变化

Fig.6 Changes of the average length and weight of the major fishery species in the Bohai Sea in 2014

平均体重增幅分别为 195.74%和 87.03%。但三疣梭子蟹、口虾蛄和日本枪乌贼在此期间平均长度和重量下降,平均长度分别下降 58.7%、12.3%和 15.6%,平均体重分别下降 92.5%、18.96%和 45.58%。

3 讨论

3.1 生态效益

春、夏季是我国近海多数渔业种类的繁殖期,如小黄鱼每年 4 月进入渤海,5 月进入产卵高峰期,此时,约 80%个体处于性成熟阶段(李显森, 2008),伏季休渔在春夏季为渔业生物提供了生长繁殖的时间和空间,有利于渔业资源休养生息。自 1995 年实施伏季休渔制度以来,渤海捕捞产量和捕捞效率均有所提高。小黄鱼、蓝点马鲛、海鳗等经济种类捕捞产量及其比重增长幅度较大,其中,鳀的增长幅度高于其他种类,可能与其开发利用时间较晚,种群适应能力较强等有关(王玉衡, 2011)。在高强度的捕捞努力量和

其他因素作用下,渤海渔业资源逐渐衰退,1959年以来,其季度平均相对资源密度由193.4 kg/(网·h)下降到1982~1983年的87.8 kg/(网·h),1992~1993年平均资源量为74.8 kg/(网·h)(金显仕,2001)。在伏季休渔制度下,渤海季度平均资源量在2004年开始缓慢回升。伏季休渔在一定时间内限制捕捞努力量,减弱了捕捞对种群结构和生态环境的破坏,有利于渔业资源生物量的增加。

伏季休渔制度下,渤海多种经济种类资源量有所回升。相对于2010年春季,2015年黄鲫、斑鲚、银鲳等种类资源量有所增加,其繁殖期多在5~8月,资源量的增加说明产卵群体数量增加。同时,伏季休渔也为幼鱼群体生长提供有利条件,提高了补充群体的存活率,从而促进渔业资源量增加。在东海,休渔也有效促进了亲体和补充群体的增加(严利平等,2019)。此外,由于伏季休渔减弱了各类渔具特别是底拖网对海洋生物栖息环境的破坏,口虾蛄、三疣梭子蟹在2015年春季和秋季的资源量均高于2004年同期,与吴强等(2018)对渤海甲壳类群落调查的研究结果基本一致。此外,口虾蛄在近几年成为渤海资源优势种,可能与其捕食者减少和栖息环境条件适宜有关(吴强等,2018),三疣梭子蟹等资源量增加与增殖放流和底栖生物食性种类数量减少也有一定关系(许思思,2011)。休渔期间,渔业种类生长增重明显。2014年8~10月,带鱼平均肛长和体重分别增加了46.92 mm和9.68 g,伏季休渔短期内有效改善了资源群体结构组成和渔获质量。但甲壳类和日本枪乌贼长度和体重均下降,可能与捕捞作用和幼鱼比例增加有关(刘修泽等,2014)。与1993年相比,渤海渔业资源量仍处于较低水平,渔获种类组成变化较大,主要经济种类的资源量、平均体长和体重仍呈下降趋势。1959年,渤海渔获物小黄鱼和带鱼占绝对优势,二者资源量之和占总资源量的85.1%,小黄鱼平均体长为205.8 mm;20世纪80年代开始,鳀和黄鲫所占比重大幅度上升,占总资源量的56.7%,小黄鱼平均体长下降为143.31 mm(Jin,2004;郭旭鹏等,2006)。本研究发现,无论是春季还是秋季,1992~1993年均以鳀为主,2004年黄鲫和鳀分别在春季和秋季资源量最高,2015年鳀、赤鼻棱鳀和黄鲫都处于较高的资源量水平。近年来,渤海渔获物以鳀、黄鲫和矛尾虾虎鱼等小型鱼类为主,并在渤海食物网中发挥重要作用(李忠义等,2018),渤海生态系统仍然存在食物链缩短、渔业生物小型化和低质化等问题。捕捞对渔业生物个体大小的选择性可能导致其生物学特征发生适应性演变,在缺少反向选择压力的情况下,生物学特征的恢复所需时间要远超其生物量

(Neubauer *et al.*, 2013; Enberg *et al.*, 2009)。

3.2 经济效益

伏季休渔制度作为国内外具有较大影响力的渔业管理制度,其最直观的经济效益是伏季休渔制度下捕捞产量增加带来的经济收益。虽然,伏季休渔制度实施后捕捞作业时间缩短,但捕捞产量和经济收益仍高于实施前。以山东省为例,在20世纪末,渔民年人均收入开始快速增长,渔民生活有了明显改善和提高(图7;中国渔业统计年鉴,1986~2018年)。同时,实施伏季休渔制度后捕捞效率大幅提高,缩短捕捞作业时间有利于降低捕捞成本和渔需物资消耗。一对300 kW拖网渔船,每小时耗油量为0.56 kg/kw,柴油价格为0.24万元/t,休渔3个月仅燃油费用至少节省60万元(徐皓等,2009)。休渔期内,渔业资源得到休养生息,个体增重明显,经济种类比例增多,渔获物质量和价值的提高也有效促进了渔民增收。

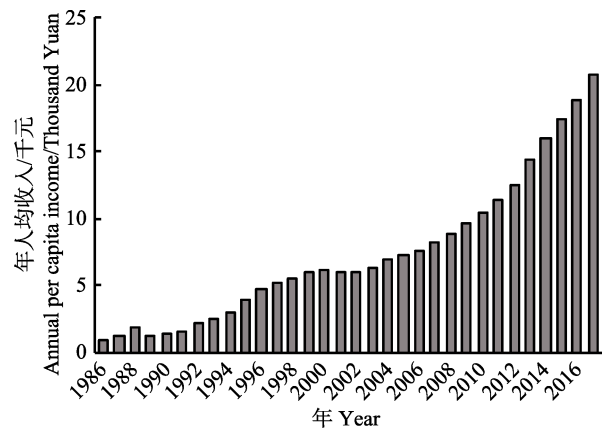


图7 1986~2016年山东省渔民年人均收入情况
Fig.7 Annual per capita income of fishermen in Shandong Province during 1986~2016

1995年我国开始在渤海实施伏季休渔制度,同时开展了一系列增殖放流活动,进一步提高了渔业生产效益。2005年山东省发布了《山东省渔业资源修复行动规划》,每年6~7月在渤海沿海进行大规模增殖放流活动,增殖放流投入逐年增加,放流品种包括褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、中国明对虾、三疣梭子蟹和海蜆(*Rhopilema esculentum*)等10余种。伏季休渔期间禁止从事捕捞活动,提高了增殖苗种的成活率。据统计,2008年仅山东省秋汛回捕增值资源达21.94万t,产值54.01亿元(张秀梅等,2009)。伏季休渔制度和增殖放流的联合在养护资源的同时,促进了渔业增效、渔民增收。

3.3 社会效益

渤海实施伏季休渔制度20多年来,捕捞作业结构得到一定改善,由于休渔主要禁止拖网、帆张网等捕捞网具作业,促进了部分渔民和生产单位转变作业类型。以山东省为例,20世纪90年代开始拖网捕捞产量的比例逐渐下降,刺网和钓具类有所增加,捕捞作业结构的完善也促进了更多有潜力的渔业资源得到合理利用(图8;中国渔业统计年鉴,1980~2017年)。此外,通过广泛的宣传和实践,社会各界对伏季休渔的关注程度逐年提高,广大渔民和基层生产单位对渔业资源和生态环境的保护意识逐渐增强,对伏季休渔工作的认识和重视程度也逐渐提高。2017年,渔民对进一步延长伏季休渔时间的新规定支持率达到84%,从“要我休渔”到“我要休渔”,渔民对伏季休渔态度逐渐转变(农业部,2017)。渔民利用休渔时间进行修补网具,参加各种法规宣传、安全教育和新的职业技能培训等,有利于提高渔民的法制观念、科学文化素质、生活质量和渔船生产安全性等。如今更多渔民自觉遵守伏季休渔管理规定,配合休渔执法检查,主动举报违法违规作业渔船,加上严厉的涉海违法打击力度,伏季休渔制度的实施得到有力保障,同时,也有利于渔民退出沿海捕捞业,践行我国的减船减产政策。

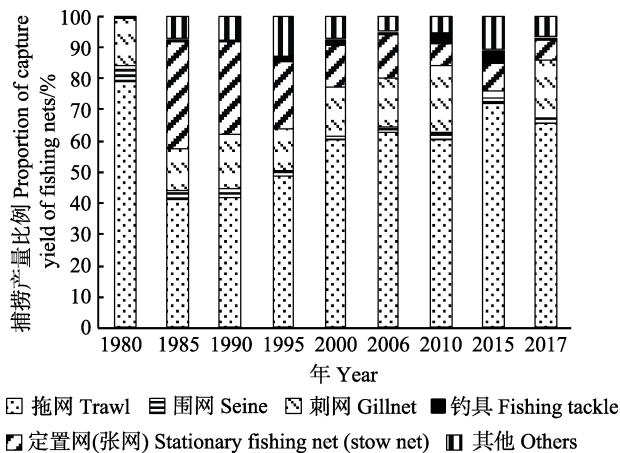


图8 1980~2017年山东省各捕捞网具的产量比例变化
Fig.8 Changes of the landings proportion of fishing nets in Shandong Province during 1980~2017

3.4 存在的问题及对策建议

伏季休渔制度的实施带来捕捞产量的增加和部分渔业种类资源量的回升,但从2000年起,渤海捕捞效率逐年下降,主要渔获种类向个体小、价值低的种类转变的趋势并未扭转。黄鲫、枪乌贼和口虾蛄等

面对开捕后的强大捕捞力量冲击,仅有平均14%能成为剩余群体进入第二年繁殖。目前,伏季休渔效果只是当年见效、当年利用的短期效应,短时间内增加的资源量,短时间内又被捕捞消耗,无法遏制资源衰退。此外,污染、涉海工程等也导致伏季休渔对渔业资源的养护作用减弱。为确保伏季休渔制度的实施效果,建议:建立和完善伏季休渔效果评价机制;形成一套科学合理、完备的、全程监控的资源养护和管理体系,同时,制定相应的扶持政策;适当降低开捕后的捕捞强度,以月为单位限制可捕量,避免短期捕捞压力过大导致的渔业资源崩溃;鼓励发展休闲渔业,以旅游、观光等进一步增加渔民经济收益。

参 考 文 献

- Clarke J, Bailey DM, Wright PJ. Evaluating the effectiveness of a seasonal spawning area closure. *ICES Journal of Marine Science*, 2015, 72(9): 2627-2637
- Demestre M, Juan SD, Sartor P, *et al.* Seasonal closures as a measure of trawling effort control in two-Mediterranean trawling grounds: Effects on epibenthic communities. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56(10): 1765-1773
- Duan XB, Liu SP, Xiong F, *et al.* Analysis of fishing structure and biodiversity in the upper mainstream of the Yangtze River before and after three years' spring fishing off. *Resources and Environment in the Yangtze Basic*, 2008, 17(6): 878-885 [段辛斌, 刘绍平, 熊飞, 等. 长江上游干流春季禁渔前后三年渔获物结构和生物多样性分析. 长江流域资源与环境, 2008, 17(6): 878-885]
- Enberg K, Christian J, Dunlop ES, *et al.* Implications of fisheries-induced evolution for stock rebuilding and recovery. *Evolutionary Applications*, 2009, 2(3): 394-414
- Gao Y, Lai ZN, Yang WN, *et al.* Changes of zooplankton community before and after the spring closed season in the Pearl River in 2014-2015. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(9): 1562-1569 [高原, 赖子尼, 杨婉玲, 等. 2014-2015年珠江春季禁渔前后浮游动物群落变化. 生态环境学报, 2017, 26(9): 1562-1569]
- Guo XP, Jin XS, Dai FQ. Growth variations of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 243-249 [郭旭鹏, 金显仕, 戴芳群. 渤海小黄鱼生长特征的变化. 中国水产科学, 2006, 13(2): 243-249]
- Jin XS, Tang QS. The structure, distribution and variation of the fishery resources in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(3): 18-24 [金显仕, 唐启升. 渤海渔业资源结构、数量分布及其变化. 中国水产科学, 1998, 5(3): 18-24]
- Jin XS. Long-term changes in fish community structure in the Bohai Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2004, 59(1): 163-171

- 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]
- Li ZY, Wu Q, Shan XJ, *et al.* Keystone species of fish community structure in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 229–236 [李忠义, 吴强, 单秀娟, 等. 渤海鱼类群落结构关键种. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 229–236]
- Lu CC, Zhao JH. The review and prospect on fish moratorium policy in the East China Sea. *Fishery Information and Strategy*, 2015, 30(3): 168–174 [卢昌彩, 赵景辉. 东海伏季休渔制度回顾与展望. *渔业信息与战略*, 2015, 30(3): 168–174]
- Liu XZ, Guo D, Wang AY, *et al.* The resource characteristics and their variation of *Oratosquilla oratoria* in Liaodong Bay. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 602–608 [刘修泽, 郭栋, 王爱勇, 等. 辽东湾海域口虾蛄的资源特征及变化. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 602–608]
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. *China fishery statistics yearbook*. Beijing: China Agricultural Press, 1979–2018 [中华人民共和国农业农村部渔业渔政管理局. *中国渔业统计年鉴*. 北京: 中国农业出版社, 1979–2018]
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. "Strict" word in the head of fisheries law enforcement and supervision work has achieved remarkable results. 2017-12-26 [中华人民共和国农业农村部. "严"字当头 渔业执法监管工作成效显著. 2017-12-26] http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/201712/t20171227_6130840.htm
- Neubauer P, Jensen OP, Hutchings JA, *et al.* Resilience and recovery of overexploited marine populations. *Science*, 2013, 340(6130): 347–349
- Samy-Kamal M, Forcada A, Lizaso JLS. Effects of seasonal closures in a multi-specific fisher. *Fisheries Research*, 2015, 172: 303–317
- Shan XJ, Jin XS, Li ZY, *et al.* Fish community structure and stock dynamics of main releasing fish species in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 1–9 [单秀娟, 金显仕, 李忠义, 等. 渤海鱼类群落结构及其主要增殖放流鱼类的资源量变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 1–9]
- Wang YH. Influence of physical environment to anchovy population dynamics in the Yellow Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [王玉衡. 黄海物理环境对鲐鱼种群动态的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- Wu Q, Li ZY, Wang J, *et al.* Inter-annual variation in the community structure of crustaceans in the Bohai Sea during summer. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 16–23 [吴强, 李忠义, 王俊, 等. 渤海夏季甲壳类群落结构的年际变化. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 16–23]
- Xu H, Zhang ZL, Zhao P. Investigation and analysis of energy consumption of fishing vessels in China. *China Fishery*, 2009(9): 5–7 [徐皓, 张祝利, 赵平. 我国渔船耗能调查与分析. *中国水产*, 2009(9): 5–7]
- Xu SS. Decline mechanisms of fishery resources in the Bohai Sea under anthropogenic activities. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, 2011 [许思思. 人为影响下渤海渔业资源的衰退机制. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011]
- Yan LP, Liu ZL, Jin Y, *et al.* Effects of prolonging the trawl net summer fishing moratorium period in the East China Sea on the conservation of fishery resources. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 118–123 [严利平, 刘尊雷, 金艳, 等. 延长拖网伏季休渔期的渔业资源养护效应. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 118–123]
- Zhang CL, Chen Y, Ren YP. The efficacy of fisheries closure in rebuilding depleted stocks: Lessons from size-spectrum modeling. *Ecological Modelling*, 2016, 332: 59–66
- Zhang XM, Wang XJ, Tu Z, *et al.* Current status and prospect of fisheries resource enhancement in Shandong Province. *Chinese Fisheries Economics*, 2009, 27(2): 51–58 [张秀梅, 王熙杰, 涂忠, 等. 山东省渔业资源增殖放流现状与展望. *中国渔业经济*, 2009, 27(2): 51–58]
- Zou JW, Huang JX, Wang QZ. Assessment on achievements of summer fishing moratorium in coastal fishing grounds in northern Beibu Gulf, 2015. *Fishery Information and Strategy*, 2016, 43(6): 318–323 [邹建伟, 黄俊秀, 王强哲. 北部湾北部沿岸渔场 2015 年伏季休渔效果评价. *渔业信息与战略*, 2016, 43(6): 318–323]

(编辑 马瑾艳)

Preliminary Evaluation of Summer Fishing Moratorium in the Bohai Sea

HU Zhijun^{1,3}, SHAN Xiujuan^{2,3}①, YANG Tao^{2,3}, DING Qi^{2,3}

(1. College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Shandong Qingdao 266071)

Abstract The Bohai Sea, a landlocked body of water in China, provides spawning, feeding, and breeding habitats for many economically important species. The summer fishing moratorium in the Bohai Sea was implemented in 1995, and for more than two decades in place it has played an important role in alleviating the intensive fishing pressure on it as a fishery resource as well as in resource conservation. However, the evaluation of the implementation effect of a summer fishing moratorium system in the Bohai Sea has not yet to be reported. Based on the Chinese Fishery Statistics Yearbook and data from the fishery resource survey, we made a comparative analysis of the implementation effects of the summer fishing moratorium system on fishery resources in the Bohai Sea. The results showed that the capture and fishing efficiency in the Bohai Sea increased rapidly in the short term following the end of the summer fishing moratorium. This was especially true for economically important species such as *Larimichthys polyactis* and *Scomberomorus niphonius*, which harvests increased 3.96 times and 1.74 times, respectively, and their proportion of total capture yield increased significantly. After 1999, capture yield declined year to year and stabilized in 2008. According to the results of the fishery resources survey, signs of recovery have shown in recent years following the sharp decline of the fishery resources in the Bohai Sea from 1998 to 2014. The biomass of the economically important species increased during the period of 2014~2015, such as *Engraulis japonicus*, *Pampus argenteus*, and *Portunus trituberculatus*, but it was lower than the same period in 1992. During the period of fishing moratorium, the primary fishery species have time and space to grow and spawn. Giving the populations time to replenish has resulted in the total resources increasing more than three times since the beginning of the moratorium, and the average length and weight of fishery organisms has also increased significantly. However, the general trend of miniaturization and degradation of fishery resources has not improved for a long time. In order to ensure the implementation effect and improve the restoration of fishery resources, it is necessary to further enhance the summer fishing moratorium system.

Key words Bohai Sea; Summer fishing moratorium; Fishery resource; Conservation

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190430003

http://www.yykxjz.cn/

胡嘉豪, 俞存根, 刘惠. 舟山群岛以东沿岸海域虾类资源状况及其多样性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 22–29
Hu JH, Yu CG, Liu H. Current status and diversity analysis of the shrimp resources in coastal waters east of the Zhoushan Islands. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 22–29

舟山群岛以东沿岸海域 虾类资源状况及其多样性分析*



胡嘉豪 俞存根^① 刘 惠

(浙江海洋大学水产学院 舟山 316022)

摘要 依据 2018 年 4 月和 11 月在舟山群岛以东沿岸海域开展的渔业资源调查所获得的虾类资料, 应用相对重要性指数公式、生物多样性指数、ABC 曲线等方法, 对虾类的种类组成、物种多样性、优势种、种类的空间分布、丰度/生物量等进行研究。经鉴定, 本次调查共捕获虾类 32 种, 隶属于 10 科 21 属。春季(4 月)出现的虾类共有 22 种, 隶属于 9 科 16 属; 秋季(11 月)共有 29 种虾类, 隶属于 9 科 20 属, 出现种类较多。两季共出现虾类 19 种。秋季虾类的种类数高于春季, 秋季有哈氏仿对虾(*Parapenaopsis hardwickii*)和中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*) 2 种优势种, 春季无优势种出现。秋季生物多样性指数与丰富度指数的平均值高于春季, 而均匀度指数则相反, 秋季小于春季。ABC 曲线的 W 值春季小于 0, 秋季大于 0, 表明春季群落结构受到较大程度的干扰, 秋季群落结构受到干扰的程度较小。春、秋季 ABC 曲线末端均有重叠, 表明舟山群岛以东沿岸海域虾类群落遭到一定程度的破坏。

关键词 虾类; 生物多样性; 优势种; ABC 曲线

中图分类号 S932.5+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0003-08

舟山渔场位于长江、钱塘江等大陆径流的入海交汇区, 地理位置优越, 其沿岸线曲折, 岛屿密布。受各种大陆径流形成的沿岸水、台湾暖流所带来的外海高盐水和黄海冷水团季节性分布的影响(俞存根等, 2011)。舟山渔场水文环境适宜, 渔业资源极其丰盛, 海洋渔业生物种类繁多, 饵料生物充足, 是虾类繁衍、索饵、发育的良好栖息场所。

国外学者对于虾类的研究报导较多, Almeida 等(2012)研究了巴西东南海岸一种虾 *Nematopalaemon schmitti* 在不同海湾的生态分布特征。Asvin 等(2014)分析了虾类幼体阶段群聚的季节组成、水平和垂直分布规律。Abushaal 等(2014)分析了在海岸带营底栖生

活虾类的丰度和其生物多样性。Takada 等(2015)研究了砂质沙滩冲浪带中环境因子对 3 种虾 *Haustorioides japonicus*、*Excirrolana chiltoni* 和 *Archaeomysis kokuboi* 资源丰度分布的影响。

在我国, 张洪亮等(2013)分析了浙江南部沿海春季产卵虾类的群落结构特征, 林群等(2018)研究了渤海生态系统的营养关系、结构及功能参数, 评估了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在渤海的生态容量变化。左涛等(2015)研究了南极大磷虾(*Euphausia superba*)的数量、体长分布和发育期组成等种群结构特点。李显森等(2015)分析了南极磷虾资源的时空分布及其渔场形成机制。陈丹等(2013)研究了南极半岛

* 国家自然科学基金(31270527)资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31270527)]. 胡嘉豪, E-mail: 1843223995@qq.com

① 通讯作者: 俞存根, 教授, E-mail: cgyu@zjou.edu.cn

收稿日期: 2019-04-30, 收修改稿日期: 2019-07-12

邻近海域的长臂樱磷虾(*Thysanoessa macrura*)数量密度、体长分布及发育期组成。阙江龙等(2014)探讨了台湾海峡附近海域的虾类数量和优势种分布特征。何贤保等(2013)、夏陆军等(2016)、徐捷等(2014)着重研究了东海的虾类群落结构及其特征。

1980 年以来,我国近海渔业资源不断减少,虾类在我国渔业资源中所占有的经济地位越来越重。2015 年全国海洋捕捞虾类的产量为 1.58×10^6 t, 占 2015 年全国海洋捕捞渔业资源产量的 12.05% (2015 年中国渔业统计年鉴, 2016)。在海洋生物食物链中,许多捕食者以虾类为食,故海洋食物链的稳定性会受虾类资源的影响,甚至整个海洋生态系统的稳定性也会受到影响。因此,分析虾类的群落结构是如何变化的、虾类的生物多样性等,不仅有利于了解海洋生物群落结构及其动态变化的生态学问题,也有利于促进渔业生产的健康发展,实现渔业资源的可持续利用。

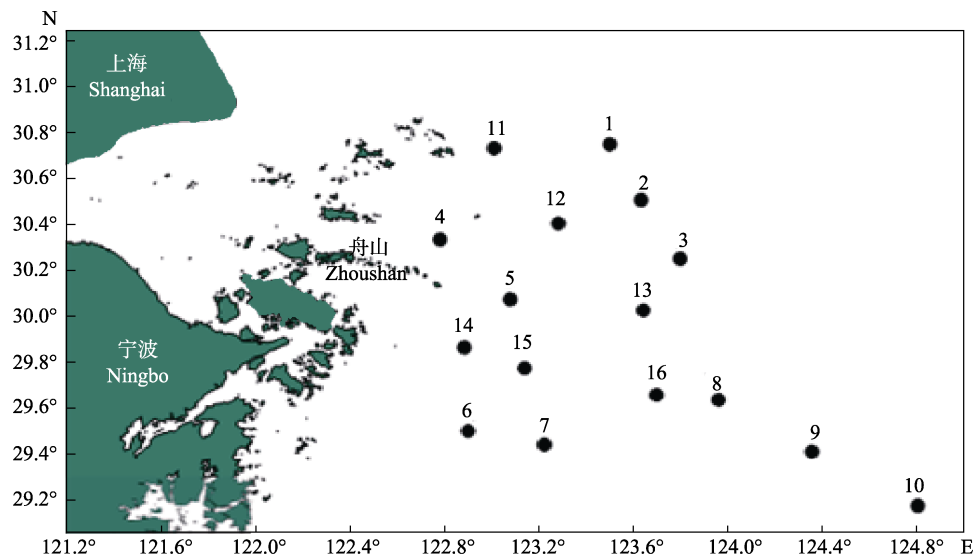


图 1 渔业资源调查站位

Fig.1 Survey stations of fishery resources

1.2 数据处理及分析方法

本研究采用 Surfer 11 软件绘制站位图及物种数的平面分布图,采用 Excel 统计分析数据,最后采用 Primer 5.0 软件进行多样性分析和相似性分析。

1.2.1 优势种的计算公式 采用相对重要性指数计算优势种,计算公式(Pinkas *et al.*, 1971):

$$IRI = [(n_i / N + w_i / W) \cdot f_i / m] \cdot 10^4$$

式中,IRI 即为相对重要性指数; n_i 、 w_i 分别为第 i 种虾类生物的个体数和生物量; N 、 W 分别为调查获得的虾类总个体数和总生物量; f_i 为第 i 种虾类生物在 m 次取样中出现的频率; m 为取样次数。本

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究所用数据来自 2018 年 4 月(春季)和 11 月(秋季)租用浙江海洋大学浙渔科 2 号科考船(科考船主机功率为 1007 kW,船上配备卫导、探渔仪、对讲机等导航、定位仪及其他助渔机械设施)在舟山群岛以东沿岸海域开展渔业资源底拖网调查所获得的虾类资料。调查范围为 $29^{\circ}10' \sim 30^{\circ}43'N$ 、 $122^{\circ}53' \sim 124^{\circ}48'E$,共设置 16 个站位,具体调查站位如图 1 所示。春、秋季网具规格为 1020 目 \times 80 mm。本次调查每站拖曳时间约为 1 h,渔船拖速约为 3.5 kn。每站拖网所得的渔获物全部取样装入样品袋,之后进行编号、记录,冰鲜保存,带回实验室之后进行种类、数量等的分析、生物学鉴定,利用精确度为 0.01 g 电子天平称重。同时,在每一个站位,使用 CTD (温盐深仪)同步测量水温及盐度等水文环境因子。

研究将 $IRI > 1000$ 者定为优势种,100~1000 之间者为常见种(俞存根等, 2005)。

由于 2018 年春、秋季实际调查过程中各站位的拖网时间有差异,拖速也不同,数据均以拖速 3.5 kn、时间 1 h 为基准标准化处理调查数据。

1.2.2 生物多样性指数计算公式 生物多样性主要采用 Shannon-Weaver(H')指数(Shannon *et al.*, 1949)、Pielou 均匀度指数(J')(Pielou, 1975)、Margalef 种类丰富度指数(D)(Margalef, 1958)计算:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

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

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

式中, S 为虾类生物的总种数; P_i 为第 i 种虾类生物的个体数或生物量占虾类生物总个体数或总生物量的比例; N 为虾类生物的总尾数。

1.2.3 丰度/生物量曲线(ABC 曲线) ABC 曲线是在同一坐标系中比较生物量优势度曲线和丰度优势度曲线, 通过 2 条曲线的分布情况分析群落处于不同干扰状况下的特征(孙儒泳等, 2002), 统计量用 W 表示(Clarke *et al*, 2001), 公式如下:

$$W = \sum_{i=1}^S \frac{B_i - A_i}{50(S-1)}$$

式中, S 为出现的物种数, B_i 、 A_i 分别为曲线中种类序号对应的生物量和丰度的累计百分比, 当生物量优势度曲线在丰度优势度曲线之上时, W 为正, 反之为负。

2 结果

2.1 种类组成及优势种

2.1.1 种类组成 舟山群岛以东沿岸海域 2018 年春季、秋季共鉴定出虾类 32 种, 隶属于 10 科 21 属。其中, 春季有 22 种, 隶属于 9 科 16 属; 秋季出现种

类较多, 共有 29 种, 隶属于 9 科 20 属。2 个季节共有种类 19 种。

2.1.2 优势种 舟山群岛以东沿岸海域 2018 年春季、秋季的虾类 IRI 如表 1 所示。从表 1 可以看出, 春季生物量最高的为须赤虾(*Metapenaeopsis barbata*), 秋季为哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)。调查海域春、秋季虾类的 IRI 差异较大, 春季虾类无优势种出现, 常见种有葛氏长臂虾(*Palaemon gravieri*)、戴氏赤虾(*Metapenaeopsis dalei*)、须赤虾和中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)等 4 种。秋季优势种为中华管鞭虾和哈氏仿对虾, 且秋季哈氏仿对虾站位出现频率为 100%。进一步分析发现, 哈氏仿对虾占总渔获重量的 30.00%, 总尾数的 30.20%。中华管鞭虾占总渔获重量的 11.30%, 总尾数的 8.10%。常见种类则有鹰爪虾(*Trachysalambria curvirostris*)、戴氏赤虾、须赤虾、东海红虾(*Plesionika izumiae*)、刀额仿对虾(*Parapenaeopsis cultrirostris* Alcock)和细巧仿对虾(*Alpheus japonicus*)等 9 种虾类。

2.2 生物多样性指数

舟山群岛以东沿岸海域虾类 2018 年春季、秋季的生物多样性指数见表 2, 春季生物多样性指数(H')在

表 1 舟山群岛以东沿岸海域虾类优势种及常见种的季节变化
Tab.1 The seasonal variation of dominant species and common species of shrimps in coastal waters east of Zhoushan Islands

种类 Species	春季 Spring				秋季 Autumn			
	总生物量 W (%)	总个体数 N (%)	频率 F	相对重要性 指数 IRI	总生物量 W (%)	总个体数 N (%)	频率 F	相对重要性 指数 IRI
扁足异对虾 <i>Atypopenaeus stenodactylus</i>	0.05	0.02	18.75	0.90	0.01	0.02	6.25	0.10
安氏白虾 <i>Exopalaemon annandalei</i>	0.00	0.01	6.25	0.00	0.46	0.88	43.75	36.80
敖氏红虾 <i>Plesionika ortmanni</i>	0.00	0.00	12.50	0.00	0.10	0.11	31.25	4.30
大管鞭虾 <i>Solenocera melantho</i>	0.43	0.06	31.25	9.70	—	—	—	—
戴氏赤虾 <i>Metapenaeopsis dalei</i>	5.42	10.36	93.75	924.70	0.60	2.46	75.00	143.40
东海红虾 <i>Plesionika izumiae</i>	0.72	1.86	25.00	40.30	1.72	3.66	50.00	168.00
葛氏长臂虾 <i>Palaemon gravieri</i>	2.42	2.01	93.75	259.20	1.63	2.65	50.00	134.00
哈氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hardwickii</i>	0.41	0.12	31.25	10.20	28.46	30.27	100.00	3670.70
红条鞭腕虾 <i>Lysmata vittata</i>	0.00	0.01	6.25	0.10	0.00	0.01	6.25	0.10
滑脊等腕虾 <i>Procletes levicarina</i>	0.08	0.07	25.00	2.40	0.04	0.07	37.50	2.60
假长缝拟对虾 <i>Parapenaeus fissuroidesfissuroides</i>	1.45	0.74	31.25	42.90	—	—	—	—
拉式爱情虾 <i>Aegaeon rathbuni</i>	0.06	0.18	18.75	2.80	0.00	0.00	6.25	0.00
日本鼓虾 <i>Alpheus japonicus</i>	0.09	0.23	62.50	12.50	1.60	5.03	81.25	336.80
细螯虾 <i>Leptochela gracilis</i>	0.00	0.04	12.50	0.40	—	—	—	—
细巧仿对虾 <i>Parapenaeopsis tenella</i>	0.09	0.11	12.50	1.60	2.07	6.35	100.00	525.90
鲜明鼓虾 <i>Alpheus distinguendus</i>	0.22	0.22	81.25	22.30	1.37	2.38	81.25	190.20
日本异指虾 <i>Processa japonica</i>	0.05	0.02	12.50	0.50	0.25	0.50	37.50	17.60

续表 1

种类 Species	春季 Spring				秋季 Autumn			
	总生物量	总个体数	频率	相对重要性	总生物量	总个体数	频率	相对重要性
	<i>W</i> (%)	<i>N</i> (%)	<i>F</i>	指数 IRI	<i>W</i> (%)	<i>N</i> (%)	<i>F</i>	指数 IRI
须赤虾 <i>Metapenaeopsis barbata</i>	16.18	11.00	37.50	637.10	8.00	2.85	50.00	339.20
鹰爪虾 <i>Trachysalambria curvirostris</i>	0.82	0.14	50.00	30.20	5.59	2.01	68.75	326.70
长角赤虾 <i>Metapenaeopsis provocatoria longirostris</i>	0.03	0.01	18.75	0.50	0.02	0.01	6.25	0.10
中华管鞭虾 <i>Solenocera crassicornis</i>	1.53	1.16	75.00	126.40	11.30	8.06	93.75	1134.60
周氏新对虾 <i>Metapenaeus joyneri</i>	0.05	0.01	12.50	0.50	0.45	0.12	18.75	6.70
中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	-	-	-	-	0.03	0.00	6.25	0.10
中国毛虾 <i>Acetes chinensis Hansen</i>	-	-	-	-	0.00	0.01	18.75	0.20
长额拟鞭腕虾 <i>Exhippolysmata ensirostris</i>	-	-	-	-	0.02	0.01	6.25	0.10
刀额仿对虾 <i>Parapenaeopsis cultrirostris</i>	-	-	-	-	4.99	2.92	87.50	432.80
高脊管鞭虾 <i>Solenocera alticarinata</i>	-	-	-	-	0.22	0.02	12.50	1.90
高脊赤虾 <i>Metapenaeopsis lamellate</i>	-	-	-	-	0.00	0.00	6.25	0.00
钩腹船形虾 <i>Tozeuma armatum</i>	-	-	-	-	0.01	0.08	31.25	1.60
矛形拟对虾 <i>Parapenaeus lanceolatus</i>	-	-	-	-	0.66	1.06	18.75	20.10
泥污疣褐虾 <i>Pontocaris pennate</i>	-	-	-	-	0.02	0.03	6.25	0.20
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	-	-	-	0.24	0.01	18.75	3.00

表 2 舟山群岛以东沿岸海域虾类生物多样性指数
Tab.2 Biological diversity index of shrimp in coastal waters east of Zhoushan Islands

站位 Station	春季 Spring			秋季 Autumn		
	丰富度	均匀度	生物多	丰富度	均匀度	生物多
	指数 <i>D</i>	指数 <i>J'</i>	样性指数 <i>H'</i>	指数 <i>D</i>	指数 <i>J'</i>	样性指数 <i>H'</i>
1	0.81	0.81	1.62	1.60	0.33	1.28
2	1.32	0.89	2.49	1.18	0.28	0.99
3	0.99	0.76	1.97	0.86	0.65	1.95
4	1.20	0.69	2.08	1.21	0.64	2.14
5	0.91	0.78	1.82	1.08	0.77	2.44
6	1.89	0.70	2.59	1.23	0.55	1.83
7	1.80	0.57	2.17	1.69	0.67	2.62
8	0.82	0.62	1.61	0.75	0.30	0.85
9	0.54	0.38	0.99	1.85	0.59	2.42
10	0.77	0.41	1.24	1.74	0.69	2.71
11	1.08	0.31	1.00	1.34	0.70	2.43
12	0.78	0.76	1.96	1.16	0.65	2.17
13	0.85	0.57	1.31	1.42	0.55	2.03
14	1.02	0.65	1.67	1.49	0.39	1.44
15	1.38	0.76	2.40	0.93	0.80	2.54
16	1.57	0.64	2.23	1.28	0.60	2.08

0.99~2.59 之间, 平均为 1.82, 最高为 6 号站位, 最低为 9 号站位; 均匀度指数(*J'*)分布在 0.31~0.89 之间, 平均为 0.64, 最高为 2 号站位, 最低为 11 号站位;

丰富度指数(*D*)分布在 0.54~1.89 之间, 平均为 1.11, 最高为 6 号站位, 最低为 9 号站位。秋季生物多样性指数(*H'*)分布在 0.85~2.71 之间, 平均为 1.99, 最高为 10 号站位, 最低为 9 号站位; 均匀度指数(*J'*)分布在 0.28~0.80 之间, 平均为 0.57, 最高为 15 号站位, 最低为 2 号站位; 丰富度指数(*D*)分布在 0.75~1.85 之间, 平均为 1.30, 最高为 9 号站位, 最低为 8 号站位。

秋季 *H'* 平均值(1.99)大于春季(1.82)。秋季 *D* 平均值(1.30)大于春季(1.11)。秋季 *J'* 平均值(0.57)小于春季(0.64)。

2.3 ABC 曲线特征

舟山群岛以东沿岸海域 2018 年春、秋季 ABC 曲线对比见图 2。2 条曲线在末端逐渐靠近, 并发生重合, *W* 统计值春季为负值, 秋季为正值。

春、秋季虾类丰度/生物量趋势相反: 春季虾类的生物量曲线在丰度曲线之下, *W* 为 -0.005 (<0); 秋季相反, 生物量曲线在丰度曲线之上, *W* 为 0.034 (>0), 表明春季群落结构受到较大程度的干扰, 秋季群落结构受到干扰的程度较小, 说明春季在调查海域的虾类群落组成中个体相对较小, 生物量占据明显优势的大个体较少, 而秋季虾类组成中主要以大个体优势种为主, 丰度占优势的小个体较少。春季的生物量曲线相对于秋季而言起点较高, 但上升较慢, 秋季生物量曲线起点较低, 但上升较快。春、秋季的丰度和生物量

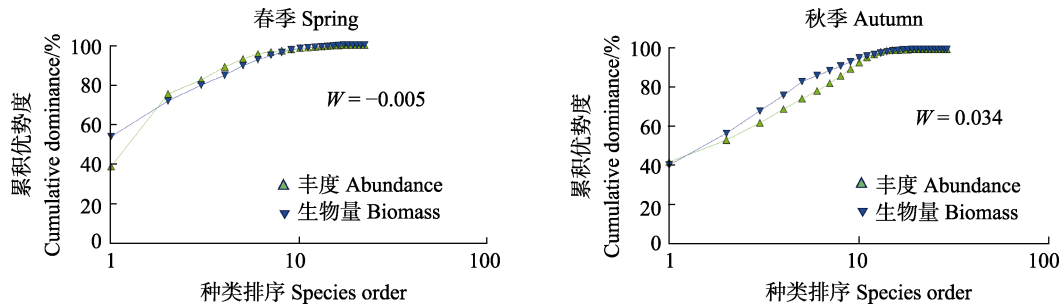


图 2 2018 年舟山群岛以东沿岸海域虾类的 ABC 曲线

Fig.2 The ABC curves of shrimp species in coastal waters east of Zhoushan Islands in 2018

2 条曲线在末端交汇, 表明调查海域受到一定程度的破坏。

3 讨论

3.1 虾类种类组成及优势种

本次调查结果显示, 在春、秋季调查渔获中虾类种类共有 32 种, 春、秋季共同出现的虾类共有 19 种, 占虾类总数的 59.38%; 较小种类出现在特定的季节, 如假长缝拟对虾(*Parapenaeus fissuroides*)和细螯虾(*Leptochela gracilis*)等只出现在春季, 刀额仿对虾和高脊管鞭虾(*Solenocera alticarinata*)等只出现在秋季, 可见分布在舟山群岛以东沿岸海域的虾类以地方性种类为主, 季节性种类相对较少。从生态类型来看, 分布于舟山群岛以东沿岸海域的虾类多为广温广盐性, 这可能是与舟山渔场的水文条件独特有关, 其地处钱塘江口外、长江口南侧, 春、秋季盐度变化巨大, 海水温度高低温相差明显(俞存根, 2011)。且须赤虾、假长缝拟对虾为舟山附近海域常见种, 但在本次调查中, 只在部分站位出现, 可能是因为多年来, 拖虾渔船数量增多、马力增大, 须赤虾和假长缝拟对虾承受着强大的捕捞压力, 群落资源受到破坏, 并且本次调查范围与方式也有所不同导致(宋海棠等, 2002)。而根据宋海棠等(2003)的调查表明, 浙江近海共有虾类 64 种, 与本次调查结果相差较大, 可能与 2 次调查范围、调查工具不同有关。

对比本调查结果(表 1)与何贤保等(2013)对舟山渔场虾类的调查结果发现, 春季虾类种类略有变化, 均无优势种, 但较高经济价值的虾类如戴氏赤虾、中华管鞭虾和细巧仿对虾等都有出现。秋季虾类种类数同样有所变化, 优势种为哈氏仿对虾和中华管鞭虾, 秋季具有较高经济价值的虾类有葛氏长臂虾、中华管鞭虾和哈氏仿对虾等。这些经济虾类资源量年际变化与张平等(2017)的调查结果相比, 春、秋季捕捞资源量均有所增加, 其原因可能是, 2 次调查站位、

调查范围、拖网网目尺寸均不同, 近年来禁渔期的实施有所成效。对比发现, 春、秋季虾类优势种更替率为 100%。究其原因, 哈氏仿对虾在春季进入沿岸水区产卵, 秋季为哈氏仿对虾成虾期, 经过夏季浅海区的索饵生长后, 哈氏仿对虾迅速生长, 并向调查海域移动。中华管鞭虾的生态习性与哈氏仿对虾类似, 常与其混栖(俞存根, 2011)。

此前诸多对舟山海域虾类的调查中, 俞存根等(2009)调查发现, 捕获量较多的虾类有戴氏赤虾、假长缝拟对虾、须赤虾和葛氏长臂虾等。与俞存根(2011)对舟山渔场渔业资源的调查结果相比, 此前鹰爪虾、葛氏长臂虾和中华管鞭虾等优势种的资源量在本次调查中不再占有绝对优势。在张平等(2017)的调查中, 此前捕获量较多的有安氏白虾(*Exopalaemon annandalei*)、中国毛虾(*Acetes chinensis Hansen*)和细螯虾等, 在本次调查中只在少数几个站位中出现, 变化巨大。在一定程度上说明, 舟山海域的渔业资源近年来遭到一定程度的破坏, 虾类群落结构出现明显的更替。

3.2 生物多样性分析

从调查海域虾类生物多样性的春、秋季季节变化情况来看(表 2), 多样性指数(H')的意义有两个方面, 分别是虾类各种间个体分布的均匀性与虾类的种类数, 即各种之间的虾类个体数分配越均匀, H' 值就越大(李德伟等, 2014)。本次调查中秋季 H' 平均值(1.99)大于春季(1.82), 说明调查海域秋季各种虾类之间的个体数量分布比春季更均匀。春、秋季调查海域的丰富度指数(D)同样有所差别, 秋季 D 平均值(1.30)大于春季(1.11), 且可以看出春、秋季各站位种类数相差较大, 秋季大部分站位丰度和生物量比春季高, 说明调查海域虾类的 Margalef 种类 D 值的空间分布在季节上有所变化。而春、秋季的均匀性指数(J')只有轻微差别, 与 H' 、 D 不同的是, 春季的 J' 平均值(0.64)大于秋季(0.57), 但相差不超过 0.1, 即虾类在不同季节分布的均匀度和区域分化程度区别不大(刘灿然等,

1998), 本研究结果显示, 调查海域的虾类群落较稳定, 整个虾类群落格局变动较小, 说明群落结构均匀度的变化与环境条件的影响较小(苗璐等, 2017)。

3.3 ABC 曲线分析

根据舟山群岛以东沿岸海域 2018 年春季 ABC 曲线(图 2)的结果来看, 春季群落结构受到的干扰较大, 而秋季群落结构受到的干扰较小。当 W 值接近于 1 时, 表明该群落生物量的优势度逐渐由较单一的物种所统治, 但各物种的丰富度呈相同趋势(苗露等, 2017)。ABC 曲线的应用具有一些局限性, 在底栖生物群落的研究中较为常见(曲方圆等, 2009)。本次调查, 春、秋季生物量曲线与丰度曲线末端均发生交错重叠的现象, 表明调查海域的群落受到了一定程度的破坏, 需要引起重视。根据方雯雯等(2016)对舟山渔场环境的调查, 破坏原因可能是舟山渔场近岸海域与长江、钱塘江、甬江等大陆径流相贯通, 其沿途夹带着大量污染物质进入舟山渔场海域。沿岸城市的混合排污口和工业企业的直接排污口排放的有毒有害物质直接流向调查海域。排放的营养盐导致海水富营养化而形成赤潮, 加剧了水体恶化。

沿用底栖生物研究中的解释(蔡丽萍等, 2018), 春季生物量曲线位于丰度曲线之上, 存在部分重合, 因此, 调查海域的环境受到的扰动程度较大, 使整个虾类群落处于动态变化中, 使较大个体的优势种受到削弱, 丰度和生物量优势度不均等程度减弱, 这种变化也说明了当前群落趋于小型化, 群落处于一种低水平的稳定状态(沈新强等, 2013)。秋季生物量曲线位于丰度曲线上方, 存在部分重合, 调查海域中虾类群落受到扰动程度较小。

4 结论

本次调查所获 32 种虾类, 主要以广温、广盐性虾类为主, 春、秋季共同出现的虾类有 19 种, 59.38% 的虾类是洄游性虾类; 优势种有哈氏仿对虾和中华管鞭虾 2 种。秋季的 H' 和 D 高于春季, J' 小于春季。春季虾类群落受到的破坏程度大于秋季。

参 考 文 献

- Abushaala NM, Shaibi T, Howaegge HM. The abundance and diversity of benthic crustaceans along the coastal zone of Western Libya. *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment*, 2014, 20(1): 33–45
- Almeida AC, Fransozo A, Teixeira GM, *et al.* Ecological distribution of the shrimp *Nematopalaemon schmitti* (Crustacea: Decapoda: Caridea) in three bays on the south-eastern coast of Brazil. *African Journal of Marine Science*, 2012, 34(1): 93–102
- Asvin P, Torres, Santos AD, *et al.* Decapod crustacean larval communities in the Balearic Sea (Western Mediterranean): Seasonal composition, horizontal and vertical distribution patterns. *Journal of Marine Systems*, 2014, 138: 112–126
- Cai LP, Jin JL, Wu YZ. Research and investigation of benthic in Zhoushan nearby sea during the summer of 2016. *Ocean Development and Management*, 2018, 35(9): 82–87 [蔡丽萍, 金敬林, 吴盈子. 2016 年夏季舟山近岸海域底栖生物调查与研究. *海洋开发与管理*, 2018, 35(9): 82–87]
- Chen D, Zuo T, Zhao XY, *et al.* Distribution and development of *Thysanoessa macrura* in waters adjacent to the Antarctic Peninsula. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 29–37 [陈丹, 左涛, 赵宪勇, 等. 南极半岛邻近海域长臂樱磷虾的数量分布与生长发育. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 29–37]
- Clarke KR, Warwick RM. *Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation*: 2nd ed. Plymouth: Primer-E, 2001
- Fang WW, Lü JM. Research on restoring and revitalizing Zhoushan fishing ground. *Rural Economy and Science and Technology*, 2016, 27(9): 95–96, 266 [方雯雯, 吕金缪. 关于修复振兴舟山渔场的问题研究. *农村经济与科技*, 2016, 27(9): 95–96, 266]
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau, Ministry of Agriculture. *China Fisheries Statistical Yearbook in 2015*. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2016, 47–49 [农业部渔业渔政管理局. 2015 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016, 47–49]
- He XB, Yu CG, Qin T, *et al.* The analysis of the community characteristics of shrimps in Zhoushan fishing ground and its adjacent waters. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 553–559 [何贤保, 俞存根, 覃涛, 等. 舟山渔场及附近海域虾类群落结构特征分析. *水生生物学报*, 2013, 37(3): 553–559]
- Li DW, Zhou QS, Yu CG, *et al.* Shrimp community structure research in the Guanshan Sea in Zhoushan fishing ground. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2014(1): 19–25 [李德伟, 周青松, 俞存根, 等. 舟山渔场官山附近海域春秋两季虾类群落结构特征的研究. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2014(1): 19–25]
- Li XS, Zhang JC, Zhao XY, *et al.* Spatiotemporal distribution of *Euphausia superba* in CCAMLR area 48 during 2012/2013 fishing season. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 1–9 [李显森, 张吉昌, 赵宪勇, 等. 2012/2013 渔季 CAMLR 48 区南极磷虾(*Euphausia superba*)资源时空分布. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 1–9]
- Lin Q, Shan XJ, Wang J, *et al.* Changes in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) carrying capacity of the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 19–29 [林群,

- 单秀娟, 王俊, 等. 渤海中国对虾生态容量变化研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 19–29]
- Liu CR, Ma KP, Lü YH, *et al.* Measurement of biotic community diversity VI: The statistical aspects of diversity measures. Chinese Biodiversity, 1998, 6(3): 229–239 [刘灿然, 马克平, 吕延华, 等. 生物群落多样性的测度方法VI: 与多样性测度有关的统计问题. 生物多样性, 1998, 6(3): 229–239]
- Margalef R. Information theory in ecology. General Systematics, 1958(3): 36–71
- Miao L, Yu CG, Zhou QS, *et al.* Fish community structure research in the sea area near Putuo Mountain of Zhoushan Fishery. Fisheries Science and Technology Information, 2017, 44(3): 131–137 [苗露, 俞存根, 周青松, 等. 舟山渔场普陀山附近海域鱼类群落结构特征研究. 水产科技情报, 2017, 44(3): 131–137]
- Pielou EC. Ecological diversity. New York: Wiley, 1975
- Pinkas L, Oliphant MS, Iverson K. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California waters. Fishery Bulletin, 1971
- Qu FY, Yu ZS, Sui JX, *et al.* The limitations of abundance biomass comparison method. Marine Science, 2009, 33(6): 118–121 [曲方圆, 于子山, 隋吉星, 等. 丰度生物量比较法应用局限性. 海洋科学, 2009, 33(6): 118–121]
- Que JL, Xu ZL, Chen JJ. Shrimp density and dominant species in onshore waters of the Central Taiwan Strait. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1211–1219 [阙江龙, 徐兆礼, 陈佳杰. 台湾海峡中部近海虾类数量和优势种分布特征. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1211–1219]
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana IL: University of Illinois Press, 1949
- Shen XQ, Shi YR, Chao M, *et al.* Analysis of taxonomic diversity of fish community in Yangtze River estuary. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(4): 1–7 [沈新强, 史赟荣, 晁敏, 等. 长江口鱼类群落分类学多样性变动的分析. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 1–7]
- Song HT, Yao GZ, Yu CG, *et al.* Shrimp species composition and quantity distribution in the East China Sea. Acta Oceanica Sinica, 2003, 25(sl): 171–179 [宋海棠, 姚光展, 俞存根, 等. 东海虾类的种类组成和数量分布. 海洋学报, 2003, 25(sl): 171–179]
- Song HT, Yao GZ, Yu CG, *et al.* The quantitative distribution and biological characteristics of *Parapenaeus fissuroides* in East China Sea. Marine Fisheries Research, 2002, 23(4): 8–12 [宋海棠, 姚光展, 俞存根, 等. 东海假长缝拟对虾的数量分布和生物学特性. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 8–12]
- Sun RY, Li QF, Niu CJ, *et al.* Basic ecology. Beijing Higher Education Press, 2002 [孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟, 等. 基础生态学. 北京: 高等教育出版社, 2002]
- Takada Y, Kajihara N, Mochizuki S, *et al.* Effects of environmental factors on the density of three species of peracarid crustaceans in micro-tidal sandy shores in Japan. Ecological Research. 2015, 30(1): 101–109
- Xia LJ, Yu CG, Cai HC, *et al.* Community structure and diversity of shrimp in Nanji Islands marine conservation area. Acta Oceanica Sinica (Chinese Version), 2016, 38(2): 73–83 [夏陆军, 俞存根, 蔡厚才, 等. 南麂列岛海洋自然保护区虾类群落结构及其多样性. 海洋学报(中文版), 2016, 38(2): 73–83]
- Xu J, Chen JJ, Xu ZL. Shrimp community structure in the Lüsi fishing ground during spring and summer. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1097–1105 [徐捷, 陈佳杰, 徐兆礼. 吕泗渔场沿岸海域春夏季虾类群落特征. 水产学报, 2014, 38(8): 1097–1105]
- Yu CG, Chen XQ, Song HT, *et al.* Analysis on community structure and diversity of shrimps in the East China Sea in spring. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(7): 3593–3604 [俞存根, 陈小庆, 宋海棠, 等. 春季东海海域虾类群落结构及其多样性. 生态学报, 2009, 29(7): 3593–3604]
- Yu CG, Song HT, Yao GZ, *et al.* Crab community structure in the East China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(3): 213–220 [俞存根, 宋海棠, 姚光展, 等. 东海蟹类群落结构特征的研究. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 213–220]
- Yu CG. Fishery ecology of Zhoushan fishing ground. Beijing: Science Publishing House, 2011, 1–238 [俞存根. 舟山渔场渔业生态学. 北京: 科学出版社, 2011, 1–238]
- Yu CH, Chen XQ, Hu HY, *et al.* Species composition and community structure characteristics of zooplankton in the Zhoushan fishing ground and its adjacent area. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(1): 183–193 [俞存根, 陈小庆, 胡颖琰, 等. 舟山渔场及邻近海域浮游动物种类组成及群落结构特征. 水生生物学报, 2011, 35(1): 183–193]
- Zhang HL, Wang ZM, Zhu ZJ, *et al.* Analysis on the community characteristics of shrimps in the coastal spawning ground of south Zhejiang during spring. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(4): 712–721 [张洪亮, 王忠明, 朱增军, 等. 浙江南部沿岸产卵场春季虾类群落结构特征分析. 水生生物学报, 2013, 37(4): 712–721]
- Zhang P, Yu CG, Shui YY, *et al.* Species composition and quantitative distribution of shrimp and its changing tendency in Zhoushan coastal waters. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(4): 580–587 [张平, 俞存根, 水玉跃, 等. 舟山近岸海域虾类种类组成与数量分布及其变动趋势. 上海海洋大学学报, 2017, 26(4): 580–587]
- Zuo T, Chen D, Zhao XY, *et al.* The abundance, distribution, and stage-specific compositions of *Euphausia superba* in the water around the Antarctic Peninsula. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 1–10 [左涛, 陈丹, 赵宪勇, 等. 南极半岛邻近海域南极大磷虾(*Euphausia superba* Dana)的数量组成和分布. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 1–10]

Current Status and Diversity Analysis of the Shrimp Resources in Coastal Waters East of the Zhoushan Islands

HU Jiahao, YU Cungen^①, LIU Hui

(College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022)

Abstract In order to assess the current diversity and status of shrimp resources in the coastal waters east of the Zhoushan Islands, data was collected and shrimp fishery resources were investigated from April and November 2018. We used the relative importance index, biodiversity index, and ABC stock curve to identify prawn class based on species composition, biodiversity, dominant species, the spatial distribution of species, and abundance/biomass. The results showed that a total of 32 shrimp species distributed across one order, ten families, and 21 genera, were captured and identified in coastal waters east of the Zhoushan Islands. In the spring, 22 shrimp species were observed, which belonged to nine families and 16 genera. Twenty-nine shrimp species were observed in the fall season, belonging to nine families and 20 genera. There were 19 shrimp species in common between the spring and fall. The number of shrimp species in fall was higher than that of spring, and the dominant species in fall included *Parapenaeopsis hardwickii*, and *Solenocera crassicornis*; however, no dominant species was found in spring. The mean value of the biodiversity index and richness index in fall were higher than those in spring, while the evenness index was lower in fall than in spring. The *W* value of the ABC curve was negative in the spring and positive in the fall. This indicates that the community structure in the spring was greatly disturbed, while that in the fall was less disturbed. In spring and fall, the end of the ABC curve overlapped, showing that the shrimp communities in the coastal waters east of the Zhoushan Islands were certainly polluted to some extent.

Key words Shrimp; Biodiversity; Dominant species; ABC curve

① Corresponding author: YU Cungen, E-mail: cgyu@zjou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190527002

http://www.yykxjz.cn/

彭敏, 王大鹏, 施军, 韩耀全, 雷建军, 李育森, 吴伟军, 何安尤. 西江流域卷口鱼线粒体 D-loop 序列的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 30–37
Peng M, Wang DP, Shi J, Han YQ, Lei JJ, Li YS, Wu WJ, He AY. Genetic diversity analysis of mitochondrial D-loop sequence of *Ptychidio jordani* in Xijiang River Basin. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 30–37

西江流域卷口鱼线粒体 D-loop 序列的遗传多样性分析*



彭 敏 王大鹏 施 军 韩耀全 雷建军
李育森 吴伟军 何安尤^①

(广西遗传育种与健康养殖重点实验室 广西水产科学研究院 南宁 530021)

摘要 为研究西江流域广西境内卷口鱼(*Ptychidio jordani*)种群的遗传变异情况,自广西境内 6 个江段采集了 139 尾样本,采用 PCR 与 DNA 测序技术分析其线粒体 D-loop 序列的遗传多样性及群体历史动态;139 条 D-loop 序列长度均为 725 bp,碱基组成 A+T (65.7%)远远高于 C+G (34.3%),共检测到变异位点 25 个,转颠换比 R 值为 11.5。139 尾样本共定义 23 个单倍型。单倍型的 NJ 系统树以及网络结构图显示,23 个单倍型间有 2 个明显分支,不同地理群体来源的单倍型混杂分布在 2 个分支中,未能观察到明显的地理聚群。6 个群体遗传多样性较好,单倍型多样性 $H_d=0.71585\sim 0.92063$,核苷酸多样性 $P_i=0.00173\sim 0.00668$,遗传分化极其显著(遗传分化系数 $F_{st}=0.36737$, $P<0.001$)。AMOVA 分析表明,群体内变异占 63.26%,群体间为 36.74%。中性检验(Tajima's $D=-0.50322$, $P=0.34600$; Fu's $F_s=-5.05210$, $P=0.08800$)与核苷酸错配分布表明,西江流域卷口鱼种群近期内未经历过种群扩张。综上所述,西江流域广西境内的卷口鱼遗传多样性表现为高单倍型、低核苷酸多样性的特征,群体间不同程度的遗传分化表明水坝阻隔及捕捞因素可能促进其发生,而水利梯级开发可能是促进卷口鱼群体遗传分化的首要原因。

关键词 卷口鱼; D-loop; 遗传多样性; 遗传分化; 西江流域

中图分类号 Q319.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)05-0004-08

线粒体 DNA 为环状闭合结构,因具有突变率高、重组率低、严格遵循母系遗传等特点,常被作为鱼类分子群体遗传学和分子系统学的重要标记(Xiao *et al.*, 2000)。其中,应用较为广泛的有线粒体控制区序列(D-loop)、细胞色素 B 基因(*Cyt b*)和线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (*CO I*)。孙超等(2018)通过 *Cyt b* 和 D-loop

基因判别不同鲚属鱼类早期生活史个体;李瑶瑶等(2018)通过线粒体 *CO I* 基因研究魁蚶(*Scapharca brouhtonii*)中国群体的分类学地位;黄镇宇等(2019)通过线粒体 *CO I* 基因分析中国前鳞鲷(*Liza affinis*)的遗传多样性;周华兴等(2019)通过线粒体 D-loop 序列解析温州光唇鱼(*Acrossocheilus wenchowensis*)的群

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303048)和广西自然科学基金重大项目(2013GXNSFEA053003)共同资助 [This work was supported by Public Welfare Industry (Agriculture) Research Project (201303048), and Major Project of Guangxi Natural Science Foundation (2013GXNSFEA053003)]. 彭 敏, E-mail: gxnnpm@126.com

① 通讯作者: 何安尤, 高级工程师, E-mail: 919384987@qq.com

收稿日期: 2019-05-27, 收修改稿日期: 2019-07-23

体遗传变异规律。诸多应用均表明, 线粒体中部分基因在鱼类遗传进化的研究方面具有重要作用。

卷口鱼 (*Ptychidio jordani*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、野鲮亚科 (Labeoninae)、卷口鱼属 (*Ptychidio*), 俗称嘉鱼, 其因肉质细嫩、味道鲜美而深受消费者喜爱, 经济价值极高, 与斑鳊、鲈鱼、鳊鱼并称为“珠江四大淡水名鱼”。近年来, 因过度捕捞和江河污染加剧, 卷口鱼自然资源急剧衰退, 因此, 其种质资源保护和人工养殖越来越引起重视。

关于卷口鱼的研究在 21 世纪初期主要集中在形态分析、年龄与生长、生理生态、人工繁殖等(崔森等, 2001; 谢刚等, 2001; 廖显平等, 2016; 廖国璋等, 2016; 祁宝嵩等, 2001)。随着珠江水系鱼类资源日益下降, 特别是梯级电站开发后, 鱼类种群规模与种类日趋减少(王崇等, 2015), 众多学者的关注点开始转向卷口鱼自然种群的健康发展, 即通过分子生物学的手段, 检测卷口鱼的遗传多样性以评估该群体未来的遗传发展趋势, 但相关研究相对较少(刘毅辉等, 2007)。杜合军等(2006)利用 RAPD 技术检测了广西桂平至广东肇庆之间的卷口鱼群体, 认为其中至少存在 2 个群体; 赵建(2007)采用了传统形态学和框架分析的方法对珠江水系柳江、浔江、西江 3 个地理群体的卷口鱼的形态变异进行分析, 认为 3 个江段卷口鱼形态差异明显, 有一定程度的分化。范凤娟等(2010)开

展了广西合山、柳州、桂平和广东郁南 4 个地理群体卷口鱼线粒体 *Cyt b* 基因的遗传变异分析, 认为 4 个地理群体间无显著的遗传分化。众多学者对珠江水系卷口鱼的遗传分化情况得出不同结论, 可能是由于分析方法不同造成的差异, 亦有可能是样品数量较少造成的误差。但是, 现行捕捞强度是否对某些群体造成毁灭性打击, 梯级电站的开发是否对不同河段的卷口鱼群体造成地理隔离, 种群是否能持续健康的发展仍需进行持续的调查评估。

本研究采用 mtDNA D-loop 序列测定的方法, 对采自西江流域广西境内 6 条支流的卷口鱼群体进行遗传结构、遗传分化程度和基因交流状况分析, 对广西境内的卷口鱼野生群体遗传状况进行评价, 掌握其遗传背景资料, 为今后西江卷口鱼的种质资源管理、保护和开发利用提供基础数据和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料采集

卷口鱼样本于 2014 年 6 月~2016 年 12 月采自西江水系广西境内, 分别为红水河(HSH)、柳江(LIUJ)、西江(XIJ)、右江(YOUJ)、郁江(YUJ)和左江(ZJ)江段, 共 139 尾。活体每尾取约 5 g 背部肌肉样本, 用 95% 酒精保存于 15 ml 离心管备用, 每天更换 1 次酒精(持续 2 d)。样本数量、采样点见表 1。

表 1 卷口鱼 D-loop 遗传多样性指数
Tab.1 Genetic diversity parameters of *P. jordani*

河段 Reach	样品数 Sample number	变异位点 Variation locus	单倍型数 Number of Haplotype	单倍型多样性 Haplotypes diversity	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
红水河 HSH	28	17	12	0.92063	4.83333	0.00669
柳江 LIUJ	41	5	6	0.71585	1.25366	0.00173
西江 XIJ	10	5	6	0.88889	1.64444	0.00227
右江 YOUJ	15	11	5	0.74286	3.67619	0.00508
郁江 YUJ	31	11	8	0.82581	2.36559	0.00327
左江 ZJ	14	8	5	0.73626	1.68132	0.00233
总计 Total	139	25	23	0.91263	3.74330	0.00518

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

取约 50 mg 保存肌肉于 1.5 ml 的 EP 管中, 采用醋酸铵法提取卷口鱼的总 DNA(彭敏等, 2011), 采用微量核酸蛋白分析仪对所提 DNA 的浓度和纯度进行检测, DNA 质量检测采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 经检测合格的 DNA 模板保存于 -20℃ 冰箱备用。采用由

生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成的 D-loop 通用引物对卷口鱼的 D-loop 序列进行扩增, 引物序列为 D-loop-F (5'-CACCCYTRRCTCCCAAAGCYA-3') 和 D-loop-R (5'-GGTGCGGRKACTTGCATGTRTAA-3')(Xiao *et al*, 2001)。

PCR 反应体系 50.0 μ l, 包括 2 \times Ex Taq Master Mix 25 μ l, 10 μ mol/L 的上、下游引物各 2 μ l, 250 ng/ μ l

DNA 模板 2.0 μl , 用 ddH₂O 补至 50.0 μl 。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 35 次循环。

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测合格的 PCR 扩增产物送至深圳华大基因公司进行正反 2 次重复测序。

1.3 数据处理

采用 MEGA 4.1 软件中的 ClustalW 程序并辅以人工校对去除序列两端不稳定部分, 分析序列碱基含量及变异位点, 利用该软件的 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离, 并以大眼卷口鱼 (*Ptychidio macrops*) (GenBank 登录号: MF457481.1) 作为外类群, 构建单倍型的 NJ 系统树 (金逍等, 2013)。单倍型及遗传多样性参数使用 DnsSP 5.10 软件 (Librado *et al*, 2009) 统计。采用 Arlequin 3.5 软件 (Excoffier *et al*, 2010) 进行分子方差分析、评估种群的遗传分化, 并进行 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 中性检验以及核苷酸不配对分布; 用 Network 4.0 软件 (Bandelt *et al*, 1999) 构建单倍型网络结构图。

2 结果与分析

2.1 卷口鱼线粒体 D-loop 碱基组成及突变类型

2.1.1 碱基组成 6 个卷口鱼群体的 139 条 D-loop 序列 (去除序列两端不稳定部分) 忽略插入、缺失时长均为 725 bp, 碱基 T、C、A 和 G 的平均含量分别

为 34.6%、20.1%、31.0% 和 14.2%, 其中, A+T (65.7%) 远远高于 C+G (34.3%), 表现出较强的碱基偏倚性, 与脊椎动物线粒体 DNA 序列特征类似。其中, 本研究所获得的卷口鱼 23 个单倍型序列已上传至 GenBank (登录号: MN093128-MN093150)。

2.1.2 突变类型 139 尾卷口鱼 D-loop 序列共检测出变异位点 25 个, 占总位点数的 3.45%, 其中, 简约信息位点 19 个, 单一变异位点 6 个, 共检测到 1 个插入或缺失位点。其中, 红水河群体变异位点最多, 共 17 个; 其次为右江和郁江群体, 为 11 个; 柳江和西江群体变异位点最少, 均为 5 个 (表 1)。转换比 *R* 值为 11.5, 其中, 23 个为转换, 2 个为颠换。

2.2 卷口鱼线粒体 D-loop 的遗传多样性

2.2.1 群体间遗传多样性差异 将 6 个不同地理群体设置为同一组群, 单倍型多样性 $H_d=0.91263$, 核苷酸多样性 $P_i=0.00517$ 。群体间的 $H_d=0.71585\sim 0.92063$, 其中, 红水河群体最高 (0.92063), 其次为西江群体 (0.88889), 最低为柳江群体 (0.71585); 群体间 $P_i=0.00173\sim 0.00668$, 与单倍型多样性表现相一致。平均核苷酸差异以红水河群体最高, 为 4.83333, 最低为柳江群体, 为 1.25366。遗传多样性各指数均以红水河最好, 柳江最差 (表 1)。

2.2.2 NJ 系统树与单倍型网络结构 单倍型网络结构 (图 1) 和 NJ 系统树 (图 2) 表现出较高的一致性。

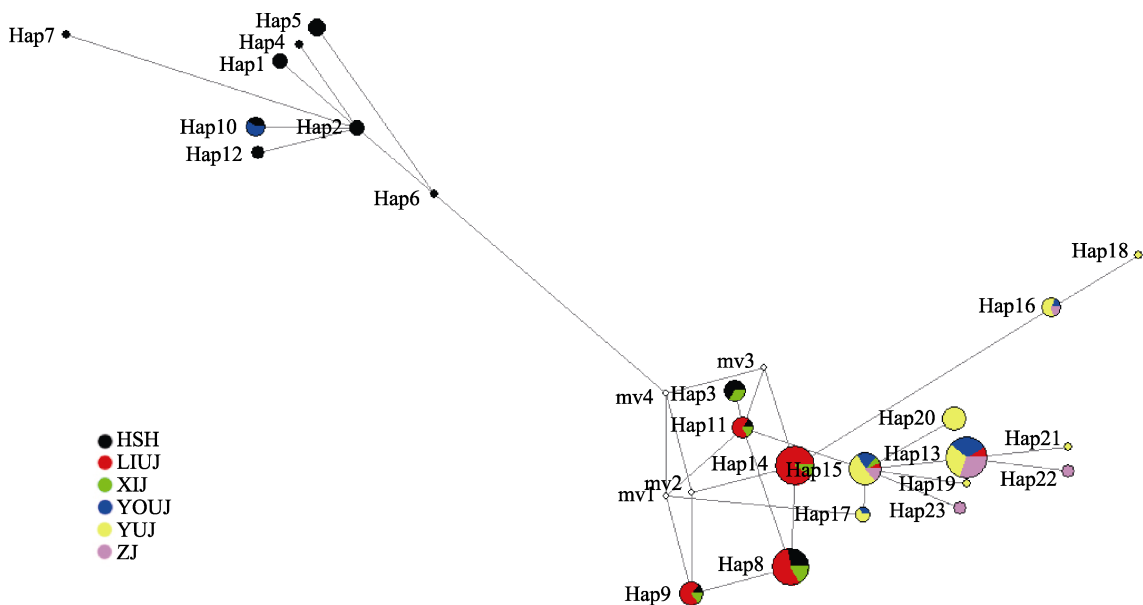


图 1 卷口鱼单倍型网络结构
Fig.1 Haplotype network structure of *P. jordani*

圆面积代表单倍型出现的频率, 彩色扇形代表各群体在同一单倍型中所占的比例, 空圈代表未发现或已经灭绝的单倍型
Circle portion represents the frequencies of haplotype, and the colored portion represents the percentage of the same haplotype in each populations, the empty circles represents the haplotypes which were not found or extinct

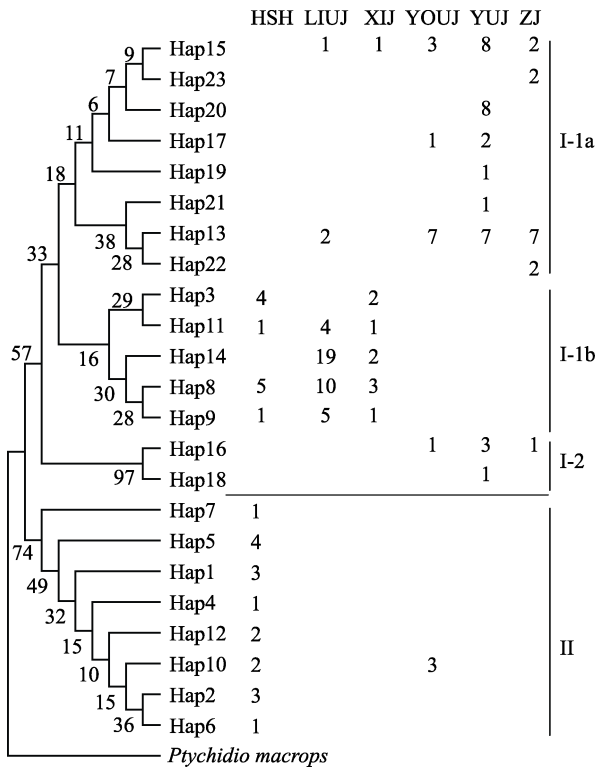


图 2 卷口鱼单倍型系统树
Fig.2 Haplotype system tree of *P. jordani*

139 尾个体拥有 23 个单倍型, 主要分为 2 大支(I 和 II), 分支 II 仅由红水河群体大半个体和右江群体的 3 个个体构成, 其余个体构成分支 I。hap13 为优势单倍型, 由 23 尾个体共享, 占总个体数的 16.55%, 主要分布于柳江、右江、郁江和左江群体; hap14 仅分布于柳江和西江群体, 有 21 尾个体, 占总个体数的 15.11%。单倍型丰度最多的为红水河群体, 拥有 12 个单倍型; 其次为郁江群体, 拥有 8 个单倍型; 柳江与西江群体均拥有 6 个单倍型; 左江与右江群体有 5 个单倍型。共有 13 个单倍型为不同群体独享, 其中, 红水河群体独享 7 个, 郁江群体 4 个, 左江群体

2 个, 右江群体 1 个, 柳江与西江群体均无独享单倍型。单倍型网络结构和 NJ 系统树拓扑结构显示, 不同地理群体个体的单倍型分布混杂, 未能观察到明显的地理聚群。

2.3 卷口鱼的遗传分化

利用 MEGA 4.1 软件分析结果如表 2 所示: 红水河群体和左江、郁江群体间的遗传距离最远, 均为 0.00863; 遗传距离最近的是西江群体和柳江群体 (0.00210)。群体内遗传距离由大到小依次为红水河群体 (0.00673)> 右江 (0.00513)> 郁江 (0.00329)> 西江 (0.00228)> 左江 (0.00233)> 柳江 (0.00174)。依据 NJ 系统树划分的 2 大分支计算, 分支 I 遗传距离为 0.003120, 分支 II 遗传距离为 0.004869, 2 分支间遗传距离为 0.010280。

群体间 $F_{st}=0.05533\sim 0.58351$, 除了左江与郁江、右江群体外, 其余群体间均存在显著的遗传分化 ($P<0.05$), 左江与柳江群体的遗传分化程度最大 (0.52351), 与郁江群体间的遗传分化程度最小 (0.05533)。

AMOVA 分析 (表 3) 发现, 各地理群体间存在极显著的遗传分化 ($F_{st}=0.36737, P<0.01$)。群体间变异占 36.74%, 群体内变异占 63.26%, 变异大部分来自群体内部, 基因流 $N_m=0.430513$ 。按图 2 将所有个体划分为 2 个谱系, 分支间仍存在极显著的遗传分化 ($F_{st}=0.69318, P<0.01$), 其中, 分支间变异占 69.32%, 分支内变异占 30.68%, 基因流 $N_m=0.221313$, 表明 2 分支间基因交流处于较低水平。

2.4 群体动态分析

核苷酸错配分布 (图 3) 及 Tajima's D 和 Fu's F_s 的检验 (表 4) 结果如下: Fu's F_s 检验 (Fu's $F_s=-5.05210, P=0.08800$) 和 Tajima's D (Tajima's $D=-0.50322, P=0.34600$) 检验均为不显著负值 ($P>0.05$), 核苷酸错配

表 2 卷口鱼遗传距离与遗传分化系数 (F_{st})
Tab.2 Genetic distance and genetic differentiation coefficient (F_{st}) of *P. jordani*

	红水河 HSH	柳江 LIUJ	西江 XIJ	右江 YOUJ	郁江 YUJ	左江 ZJ
红水河 HSH	0.00673	0.41905**	0.29707**	0.22857**	0.42336**	0.43090**
柳江 LIUJ	0.00692	0.00174	0.05900	0.44877**	0.44908**	0.58351**
西江 XIJ	0.00704	0.00210	0.00228	0.27950**	0.30606**	0.46545**
右江 YOUJ	0.00778	0.00548	0.00530	0.00513	0.08939*	0.06772
郁江 YUJ	0.00863	0.00446	0.00416	0.00455	0.00329	0.05533
左江 ZJ	0.00863	0.00467	0.00432	0.00401	0.00300	0.00233

注: 对角线为群体内遗传距离; 对角线下方表示群体间遗传距离; 对角线上方表示 F_{st} 值。“***”表示 $P<0.01$, “**”表示 $P<0.05$

Note: The diagonal is the genetic distance within the population; and below the diagonal is the genetic distance between the populations; above the diagonal is the genetic differentiation coefficient (F_{st}). **: $P<0.01$; *: $P<0.05$

表3 AMOVA 分析
Tab.3 Analysis of molecular variances (AMOVA)

项目 Items	变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Quadratic sum	方差组分 Variance components	变异百分率 Percent of variation (%)	统计量 F	基因流 N _m
6个群体 Six populations	群体间 Between populations	5	88.419	0.74168 Va	36.74	0.36737**	0.430513
	群体内 Within populations	133	169.869	1.27721 Vb	63.26		
	总体 Total	138	258.288	2.01889			
两谱系 Two pedigree	群体间 Between populations	1	97.669	2.81571 Va	69.32	0.69318**	0.221313
	群体内 Within populations	137	170.748	1.24634 Vb	30.68		
	总体 Total	138	268.417	4.06205			

**：P<0.01

表4 卷口鱼 D-loop 序列 Tajima's D 和 Tajima's D 检验
Tab.4 Tajima's D and Tajima's D test of *P. jordani* mtRNA D-loop

项目 Items	红水河 HSH	柳江 LIUJ	西江 XIJ	右江 YOUJ	郁江 YUJ	左江 ZJ	总体 Total
Tajima's D	0.36913	0.18413	-0.27902	0.33405	-0.45015	-1.25061	-0.50322
Tajima's D P-value	0.67600	0.61400	0.40500	0.67400	0.35900	0.10600	0.34600
Fu's F _S	-1.33004	-0.58449	-2.36445	1.89454	-0.65605	-0.3516	-5.05210
Fu's F _S P-value	0.29200	0.40100	0.03100	0.83700	0.39800	0.38800	0.08800

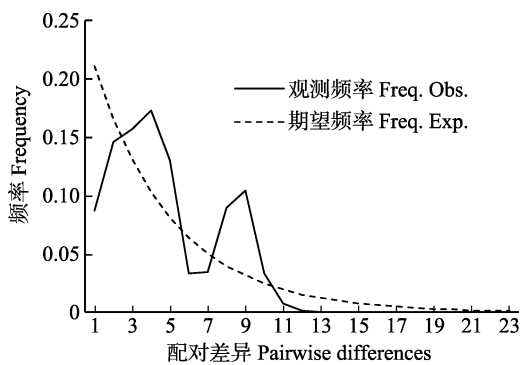


图3 卷口鱼核苷酸错配分布

Fig.3 Nucleotide mismatch profile of *P. jordani*

分布为双峰，表明西江水系卷口鱼基于 D-loop 序列的群体动态分析支持西江水系卷口鱼未经历过种群扩张。各江段分析结果发现，除西江群体 Fu's F_S 检验为显著负值外(P=0.031)，其他为不显著负值或正值(P>0.05)，表明除西江群体可能发生过种群扩张外，其他江段并无种群扩张迹象。

3 讨论

3.1 卷口鱼的遗传多样性

遗传多样性通常是物种长期进化的结果，是物种

或其群体持续生存并适应不断变化的环境而进化的前提。通常物种的遗传多样性或变异性越丰富，则表明该物种的进化潜力越大，对环境改变响应的进化能力就越强(Laikre *et al.*, 2005; 宋娜等, 2018)。遗传多样性大小决定该生物能否继续在生物圈繁衍和生活，多样性下降将会对种群的健康发展产生负面影响(Ryman *et al.*, 1987; 姜艳艳等, 2003; 杨子拓, 2016)。单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数通常被用于评估生物遗传多样性(Vrijenhoek, 1994; 李大命等, 2017)。本研究发现，西江流域广西境内 6 个地理群体的卷口鱼多样性指数 $H_d=0.91260$, $P_i=0.00517$ 。与同样基于 D-loop 序列为分子标记分析的同一流域的其他鲤科鱼类相比，高于位于可渡河的光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatius*)种群($H_d=0.733$, $P_i=0.0027$) (韩虎峰等, 2010)，低于赤眼鳟(*Spualiobarbus curriculus*)种群($H_d=0.978$, $P_i=0.00791$) (陈方灿等, 2015; 李潮等, 2018)和大眼华鲮(*Sinibrama macrops*)群体($H_d=0.91600$, $P_i=0.01569$)；与翘嘴鲌(*Culter alburnus*)群体($H_d=0.87506$, $P_i=0.0070$)，和大眼近红鲌(*Ancherythroculter lini*)群体($H_d=0.847$, $P_i=0.00693$)相比，具有更高的单倍型多样性与较低的核苷酸多样性(杨子拓等, 2016; 杨子拓, 2016)。本研究中，各群体的遗传多样性差异

较大,除了红水河与右江群体,其他各江段的遗传多样性仍相对较低。西江流域广西境内多个江段卷口鱼群体呈现出高单倍型和低核苷酸多样性特征,可能是种群发生瓶颈效应后快速增长,使得单倍型的丰度提高,但时间不足以提高核苷酸多样性所造成(Grant, 1998)。

3.2 卷口鱼的遗传分化

群体间的遗传距离是物种分类的一个重要依据。遗传距离越大表明群体间亲缘关系越远(张鹤千等, 2015)。本研究中,各群体间遗传距离为 0.00210~0.00863,各群体内的遗传距离为 0.00228~0.00673,无明显差异,表明该 6 个群体间具有较近的亲缘关系。单倍型的 NJ 系统树和网络图显示,本次采样的 6 个不同地理群体个体来源的单倍型分布混杂,未能观察到明显的地理聚群。但按 NJ 系统树划分的两分支间存在显著较高的遗传分化($F_{st}=0.69318$, $P<0.01$)。

群体遗传学认为, F_{st} 是测量群体间遗传分化的重要参数, F_{st} 值越大表明分化程度较高(Wright, 1979; 沈朕等, 2017)。Wright(1965)提出遗传分化标准($F_{st}<0.05$, 无遗传分化; $0.05<F_{st}<0.15$, 较小遗传分化; $0.15<F_{st}<0.25$, 中度遗传分化; $F_{st}>0.25$, 遗传分化较大)。研究表明,柳江与西江、右江与郁江/左江、郁江与左江群体之间的遗传分化值为 0.05~0.15, 遗传分化较小;红水河与右江间的遗传分化值为 0.15~0.25, 为中度遗传分化;而红水河与柳江/西江/郁江/左江、柳江与右江/郁江/左江、西江与右江/郁江/左江间 $F_{st}>0.25$, 遗传分化较大,地理隔离造成群体间基因交流减少可能是造成该结果的原因之一。如左江、右江是郁江、西江的上游,群体间遗传距离均小于 0.00500,其主要受水坝阻隔的影响;又如红水河与郁江、右江群体的遗传距离均大于 0.00500,因受大坝阻隔与不同支流的双重影响,遗传距离远大于前者,水坝阻隔与不同支流间的地理阻碍使基因交流更加困难,相应分化程度就越高,而红水河与其他群体遗传距离较远,可能与红水河过于密集的梯级开发程度有关。在 2010 年的调查中,红水河干流 11 个梯级中有 10 个已建或在建(薛联芳等, 2010)。匡天旭等(2018)在对珠江鲫(*Carassius auratus auratus*)遗传种质资源分析中亦发现,大量的水利开发可能是导致遗传多样性差异分布的原因之一。

3.3 西江流域卷口鱼的历史动态

Tajima(1989)认为,如果 Tajima's D 与 Fu's F_s 值呈负值,且在统计学上达到显著标准,则说明序列中含有比中性进化模型更多的核苷酸位点变化,可能预

示着被研究种群曾经历过一个扩张的历史。同一组群 AMOVA 分析及核苷酸错配分布图表明, Fu's F_s 检验 (Fu's $F_s=-5.05210$, $P=0.08800$) 和 Tajima's D (Tajima's $D=-0.50322$, $P=0.34600$) 检验均为不显著负值,核苷酸错配分布为双峰。结果支持西江流域卷口鱼未经历过种群扩张。

3.4 西江流域卷口鱼的种质资源保护

鱼类作为水域生态系统的消费者,在水域环境中处于食物链的末端,对维护水域生态系统的物质循环与能量流动具有重要作用,任何水环境污染及水利工程开发等都有可能对鱼类群体的健康发展造成不良影响,从而影响水域生态系统的稳定及正常运行。西江流域广西境内的卷口鱼群体仍保持着较好的遗传多样性,但部分群体间遗传分化程度较大,水坝阻隔和捕捞因素可能促进了卷口鱼的遗传分化,其中,以红水河水利梯级开发对卷口鱼的基因交流造成的影响更为明显。建议加强对卷口鱼以及西江流域其他土著鱼类遗传多样性的监控;水电大坝合理设置过鱼设施以促进各江段群体间迁移;适当引入同一流域不同江段的亲鱼进行人工繁育以获得杂合度更高的子代,并通过增殖放流增进各江段群体间基因交流,以此弥补因地理阻隔造成的基因缺失。

参 考 文 献

- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(1): 37-48
- Chen FC. Study on the population diversity of *Squaliobarbus curriculus* in Xijiang. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [陈方灿. 西江赤眼鲮群体多样性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Cui M, Zhao J, Chen XL. Age and growth of *Ptychidio jordani*. *Journal of South China Normal University (Natural Science)*, 2001(4): 9-15 [崔森, 赵俊, 陈湘舜. 卷口鱼的年龄和生长. 华南师范大学学报(自然科学版), 2001(4): 9-15]
- Du HJ, Zhu XP, Chen KC, et al. RAPD analysis of genetic diversity of wild *Ptychidio jordani* in Pearl River. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(3): 305-310 [杜合军, 朱新平, 陈昆慈, 等. 珠江野生卷口鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 水产学报, 2006, 30(3): 305-310]
- Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite Ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564-567
- Fan FJ, Zhang Q, Zhao S, et al. Sequence analysis of mitochondrial Cytb gene in genetic variation of endemic *Ptychidio jordani* in Pearl River. *Agricultural Science in Guangdong Province*, 2010, 46(4): 161-164 [范凤娟, 章群, 赵爽, 等. 珠江水系特有卷口鱼遗传变异的线粒体 Cytb 基因序列分析. 广东农业科学, 2010, 46(4): 161-164]
- Grant W. Shallow population histories in deep evolutionary

- lineages of marine fishes: Insight from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415–426
- Han HF, Dai YG. Polymorphism analysis of mtDNA D-loop from *Schizothorax lissolabiatatus* Tsao in Kedu River population of Pearl River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 143–149 [韩虎峰, 代应贵. 珠江水系光唇裂腹鱼可渡河种群 mtDNA D-loop 序列多态性分析. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 143–149]
- Huang ZY, Zhang Q, Lu LF, *et al.* Genetic diversity of *Liza affinis* in coastal waters of China deduced from mitochondrial CO I sequence. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 46–52 [黄镇宇, 章群, 卢丽锋, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的中国前鳞鲷遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 46–52]
- Jiang YY, Kong XY, Yu ZN, *et al.* Variation analysis of mtDNA D-loop from *Scomberomorus niphonius* in Yellow Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(3): 177–183 [姜艳艳, 孔晓瑜, 喻子牛, 等. 黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析. *中国水产科学*, 2003, 10(3): 177–183]
- Jin XX, Sun YN, Wang RX, *et al.* Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the gobies. *Hereditas*, 2013, 35(12): 1391–1402 [金逍逍, 孙悦娜, 王日昕, 等. 虾虎鱼线粒体全基因组序列结构特征分析及系统发育关系探讨. *遗传*, 2013, 35(12): 1391–1402]
- Kuang TX, Shuai FM, Chen WT, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Carassius auratus auratus* from Xijiang. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(5): 29–35 [匡天旭, 帅方敏, 陈蔚涛, 等. 西江鲫的遗传多样性与群体结构. *南方水产科学*, 2018, 14(5): 29–35]
- Laikre L, Palm S, Ryman N. Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 2005, 34(2): 111–120
- Li C, Lan ZJ, Zhao J. Genetic diversity and differentiation of *Squaliobarbus curriculus* in Pearl River based on mitochondrial control region (D-loop) sequence. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(3): 615–622 [李潮, 蓝昭军, 赵俊. 基于线粒体控制区(D-loop)序列的珠江赤眼鳟遗传多样性与遗传分化. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(3): 615–622]
- Li DM, Li K, Zhang TQ, *et al.* Sequence polymorphism of Cytb and CO I genes in *Protosalanx hyalocranius* from Hongze Lake. *Progress in Fisheries Science*, 2017, 38(6): 25–31 [李大命, 李康, 张彤晴, 等. 洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)Cytb 和 CO I 基因序列多态性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 25–31]
- Li YY, Liu YG, Liu XL, *et al.* The taxonomic status of Chinese population of *Scapharca broughtonii* based on sequences of CO I and 12S rRNA genes. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 73–80 [李瑶瑶, 刘运国, 刘晓玲, 等. 基于线粒体基因组 CO I 和 12S rRNA 序列的魁蚶中国群体分类学地位研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 73–80]
- Liao GZ, You BZ, Bai YQ, *et al.* Study on age growth, feeding and reproduction of *Ptychidio jordani* in Pearl River. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 10(1): 71–86 [廖国璋, 尤炳赞, 白岳强, 等. 珠江卷口鱼年龄生长食性和繁殖的研究. *水产学报*, 2001, 10(1): 71–86]
- Liao XP, Lin WQ, Xu ZS, *et al.* Study on artificial reproduction of *Ptychidio jordani*. *Agricultural Science Bulletin of Anhui*, 2016, 22(11): 117–119 [廖显平, 林伟强, 许政生, 等. 卷口鱼人工繁殖技术研究. *安徽农学通报*, 2016, 22(11): 117–119]
- Librado P, Rozas J. Dnasp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452
- Liu YH, Jiao ZY, Chen YL, *et al.* Morphological characteristics and karyotype of the Pearl River of *Ptychidio jordani*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 721–725 [刘毅辉, 焦宗垚, 陈永乐, 等. 珠江卷口鱼形态特征与染色体组型. *水产学报*, 2007, 31(6): 721–725]
- Peng M, Chen XL, Jiang WM, *et al.* Extraction of genomic DNA from *Trachinotus ovatus* by ammonium acetate. *Tianjin Journal of Agricultural Science*, 2011, 17(1): 114–117 [彭敏, 陈秀荔, 蒋伟明, 等. 醋酸铵法提取卵形鲳鲹基因组 DNA. *天津农业科学*, 2011, 17(1): 114–117]
- Qi BL, Xie G, Ye X, *et al.* Preliminary experiment of artificial domestication of *Ptychidio jordani*. *Water Fishery*, 2001, 21(3): 26 [祁宝崙, 谢刚, 叶星, 等. 野生卷口鱼的人工驯养初步试验. *水利渔业*, 2001, 21(3): 26]
- Ryman N, Utter F. *Population genetics and fishery management*. Washington: University of Washington Press, 1987
- Shen Z, Guan HB, Zheng FR, *et al.* Genetic diversity analysis of four *Hexagrammos otakii* populations based on Cytb and D-loop. *Advances in Marine Science*, 2017, 35(4): 524–534 [沈朕, 关洪斌, 郑风荣, 等. 基于 cytb 和 D-loop 的 4 个大泷六线鱼群体遗传多样性分析. *海洋科学进展*, 2017, 35(4): 524–534]
- Song N, Zhou W, Jin BS, *et al.* Population genetics analysis of *Pelteobagrus nitidus* in the Yellow River Basin based on mitochondrial DNA control region. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(8): 20–26 [宋娜, 周伟, 金斌松, 等. 基于线粒体 DNA 控制区高变区的黄河流域光泽黄颡鱼群体遗传学分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(8): 20–26]
- Sun C, Liu HB, Jiang T, *et al.* Comparison of D-loop and cytochrome b sequences among different *Coilia* species and their potential use in analysis for the identification of species at early life stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 27–35 [孙超, 刘洪波, 姜涛, 等. 不同鲚属鱼类 Cyt b 和 D-loop 序列的比较及其判别早期生活史个体的潜力分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 27–35]
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 1989, 123: 585–595
- Vrijenhoek RC. Genetic diversity and fitness in small populations. *Conservation Genetics*, 1994, 68: 37–53
- Wang C, Xie S, Xie WX, *et al.* Investigation of fish resources in the main stream of Hongshui River after cascade operation. *Journal of Freshwater Fisheries*, 2015, 45(2): 30–36 [王崇, 谢山, 谢文星, 等. 红水河干流梯级运行后鱼类资源调查. *淡水渔业*, 2015, 45(2): 30–36]
- Wright S. *Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations*. International Biometric Society, 1979
- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 1965: 395–420
- Xiao WH, Zhang YP. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384–391 [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384–391]
- Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia.

- Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(2): 163–173
- Xie G, Qi BL, Xu SY, *et al.* Critical water temperature and dissolved oxygen content of *Ptychidio jordani*. Journal of Freshwater Fisheries, 2001, 31(2): 47–48 [谢刚, 祁宝伦, 许淑英, 等. 卷口鱼的临界水温和溶氧量. 淡水渔业, 2001, 31(2): 47–48]
- Xue LF, Gu HB, Cui L, *et al.* Investigation and study on the impact of cascade development on water temperature accumulation in the main stream of Hongshui River. Journal of Hydropower, 2010, 36(11): 9–12 [薛联芳, 顾洪宾, 崔磊, 等. 红水河干流梯级开发对水温累积影响的调查研究. 水力发电, 2010, 36(11): 9–12]
- Yang ZT. Analysis of genetic structure and diversity of three species of subfamily cockroaches in the Pearl River Basin. Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 [杨子拓. 珠江流域三种鲃亚科鱼类的遗传结构及遗传多样性分析. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Yang ZT, Sun JJ, Li GF, *et al.* Study on autogenetic diversity and genetic differentiation of Pearl River *Culter alburnus Basilewsky* based on mitochondrial D-loop gene. Journal of Sun Yat-Sen University (Natural Science), 2016, 55(3): 89–96 [杨子拓, 孙际佳, 李桂峰, 等. 基于线粒体 D-loop 基因的珠江翘嘴鱼自遗传多样性与遗传分化研究. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(3): 89–96]
- Zhao J, Zhu XP, Chen YL, *et al.* Morphological variation of different geographical populations of *Ptychidio jordani* in Pearl River. Acta Animal, 2007, 53(5): 921–927 [赵建, 朱新平, 陈永乐, 等. 珠江卷口鱼不同地理种群的形态变异. 动物学报, 2007, 53(5): 921–927]
- Zhang HQ, Yang ZT, Li GF, *et al.* Sequence analysis of Cytb gene of wild *Peheobagrus fulvidraco* in Pearl River Basin. Journal of Sun Yat-Sen University (Natural Science), 2015, 54(5): 102–108 [张鹤千, 杨子拓, 李桂峰, 等. 珠江流域野生黄颡鱼 *Peheobagrus fulvidraco* 的 Cytb 基因序列分析. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(5): 102–108]
- Zhou HX, Hu YT, Duan GQ, *et al.* Population genetic analyses of *Acrossocheilus wenchowensis* in Xin'an Basin based on the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene. Progress of Fishery Sciences, 2019, 40(2): 43–50 [周华兴, 胡玉婷, 段国庆, 等. 基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的新安江流域温州光唇鱼群体遗传研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 43–50]

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity Analysis of Mitochondrial D-loop Sequence of *Ptychidio jordani* in Xijiang River Basin

PENG Min, WANG Dapeng, SHI Jun, HAN Yaoquan, LEI Jianjun, LI Yusen, WU Weijun, HE Anyou^①

(Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,
Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021)

Abstract To study the genetic diversity and genetic differentiation of a *Ptychidio jordani* population in the Xijiang River Basin, Guangxi Province, China, mitochondrial D-loop sequences from six rivers were subjected to polymer chain reaction and DNA sequencing analysis. The A+T base composition was much higher (65.7%) than the C+G combination (34.3%) in 139 individuals, which have a D-loop sequence length of 725 bp, and a transversion ratio *R* of 11.5. Twenty-five polymorphic sites were defined. An NJ system tree of haplotypes and network structure diagram revealed two distinct branches among 23 haplotypes but no obvious geographic clusters, because the haplotypes from different geographic groups were mixed in two branches. Individuals from six different geographic populations had superior genetic diversity ($H_d=0.71585\sim0.92063$, $P_i=0.00173\sim0.00668$) and extremely significant genetic differentiation ($F_{st}=0.36737$, $P<0.001$). Analysis of molecular variance indicated that most of the variation was intragroup (63.26%). The results of a neutrality test (Tajima's $D=-0.50322$, $P\text{-value}=0.34600$; Fu's $F_s=-5.05210$, $P\text{-value}=0.08800$) and nucleotide mismatch distribution showed that the population of *P. jordani* in the Xijiang River Basin had not experienced a population expansion in recent years. The genetic diversity of the *P. jordani* in the Xijiang River Basin exhibited high haplotype and low nucleotide diversity. Various degrees of genetic differentiation intergroups indicate that a dam barrier and fishing factors may be contributing to their occurrence, and a cascade development of water resources may be the primary cause of population genetic differentiation of *P. jordani*.

Key words *Ptychidio jordani*; D-loop; Genetic diversity; Genetic differentiation; Xijiang River Basin

① Corresponding author: HE Anyou, E-mail: 919384987@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190629001

http://www.yykxjz.cn/

陶玉华, 黄星, 王薛平, 钟秋平, 亢振军. 广西仙岛公园和沙井红树林土壤碳氮储量的空间分布. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 38–45

Tao YH, Huang X, Wang XP, Zhong QP, Kang ZJ. Spatial distribution of soil carbon and nitrogen stocks in Mangrove Wetland of Xiandao Park and Shajing in Guangxi. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 38–45

广西仙岛公园和沙井红树林 土壤碳氮储量的空间分布*



陶玉华^① 黄 星 王薛平 钟秋平 亢振军

(北部湾大学 广西北部湾海洋灾害研究重点实验室 广西北部湾海岸科学与工程实验室 钦州 535011)

摘要 通过对广西茅尾海的仙岛公园和沙井红树林土壤有机碳(SOC)、全氮(TN)含量和空间分布特征,以及碳氮比(C/N)与SOC和TN的相关性研究,结果显示,仙岛公园红树林的SOC和TN的平均含量分别为24.5和1.06 g/kg,沙井红树林的SOC和TN平均含量分别为11.9和0.71 g/kg。仙岛公园和沙井红树林的SOC储量分别为181.03和92.4 t/hm²,存在显著性差异($P<0.05$),仙岛公园和沙井红树林的TN储量分别为8.23和5.12 t/hm²,SOC和TN储量垂直分布,随土层深度的增加呈先减少后增加的趋势(沙井TN除外)。沙井红树林的SOC与TN储量之间相关性极显著($P<0.01$, $R=0.947$),仙岛公园红树林的SOC与TN储量之间相关系数为0.407。这2个研究地点的C/N值为16.77~24.39,其有机质主要来源于陆地,仙岛公园红树林的C/N值与SOC储量存在显著的相关性($P<0.01$),沙井红树林的C/N值与TN储量呈显著负相关($P<0.05$)。仙岛公园红树林的SOC储量高于我国森林土壤平均碳储量,显示了红树林土壤较高的固碳能力。

关键词 仙岛公园; 沙井; 红树林; 碳氮储量; 空间分布

中图分类号 S154.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0005-08

红树林是热带、亚热带海岸重要的湿地生态系统,是全球生产力最高的区域之一,具有极其重要的生态和环境价值(高天伦等, 2017; 许永辉等, 2018)。碳和氮是海洋初级生产力的关键营养元素(张雪等, 2018),土壤有机碳(Soil organic carbon, SOC)和全氮(Total nitrogen, TN)是评价土壤肥力的重要指标,直接影响湿地生态系统的生产力,对生态系统结构和功能的形成具有重要作用。土壤的碳氮比(C/N)是反映土壤质量变化的敏感指标,也是反映土壤微生物群落结构

的重要标志,印证着区域生态系统的演变规律(肖玉等, 2003)。人类活动对红树林产生了极大的干扰,从填海造地等土地利用变化到过度挖掘、捕获海洋经济动物对红树林的损坏,以及船只出入对红树林的压踩等,都影响了红树林生态系统的物质循环。通过对不同人类活动区域的红树林碳氮储量变化的研究,可为红树林物质循环及其保护提供理论依据。全球气候变化日益受到重视,滨海湿地碳氮储量及其分布特征越来越受到关注(Liu *et al*, 2007)。国外对红树林生态系

* 钦州学院高层次人才科研启动项目(2017KYQD203)和广西北部湾海洋灾害研究重点实验室自主项目(2018TS01)共同资助 [This work was supported by Qinzhou University High-level Scientific Research Foundation for the Introduction of Talent(2017KYQD203), and Guangxi Key Laboratory of Marine Disaster in the Beibu Gulf(2018TS01)].

① 通讯作者: 陶玉华, 教授, E-mail: arlenetao12@aliyun.com

收稿日期: 2019-06-29, 收修改稿日期: 2019-07-16

统碳氮储量研究较多,尤其是集中于有机碳储量的研究(Chen *et al*, 2014; Laanbroek *et al*, 2018; Marchand, 2017; Morimaru *et al*, 2017)。我国关于红树林湿地研究多集中在重金属、微生物和有机碳等方面(罗松英等, 2018; 丁苏丽等, 2018; 胡杰龙等, 2015), 少有同时对其碳库和氮库的研究以及 C/N 与碳、氮相关性的研究, 而且对红树林湿地碳库和氮库的研究多集中在海南、闽江和广东等地, 而对于广西红树林湿地的相关研究不多, 不利于总结规律性的成果。

本研究地点设立在广西北部湾茅尾海红树林保护区。茅尾海红树林是我国面积最大、最典型的岛群红树林和特有的岩滩红树林, 是北部湾最北端的红树林分布区, 植物群落类型为桐花树(*Aegiceras corniculatum*)群落、秋茄(*Kandelia candel*)+桐花树群落、白骨壤(*Avicennia marina*)+桐花树群落和白骨壤群落。仙岛公园是红树林受到较好保护的地点, 而沙井位于渔业区范围内, 受到人为活动影响较大, 研究其土壤有机碳和全氮储量及分布特征, 分析 C/N 与 SOC 和 TN 储量之间的相关性, 试图揭示广西茅尾海红树林湿地 SOC 和 TN 的分布规律, 有助于更好地认识茅尾海红树林湿地的碳汇能力, 为区域性碳氮循环研究和红树林保护提供理论依据, 对理解生物地球化学循环和生态作用具有重要意义。

1 地理概貌

茅尾海位于北部湾顶部钦州湾海域, 为半封闭式内海, 连接着钦江和茅岭江, 面积约为 135 km², 处于亚热带, 受热带海洋气候的影响, 季风环流明显,

年均气温为 22°C, 平均年降雨量为 2104.2 mm, 年平均降雨日数为 171 d(刘永泉等, 2009)。茅尾海海底底质以淤泥、淤泥质土以及粗、中、细和粉砂为主。沿岸红树林面积约为 2302 km², 主要为木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)、秋茄、桐花树、海漆(*Excoecaria agallocha*)、白骨壤、红海榄(*Rhizophora stylosa*)、无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)、银叶树(*Heritiera littoralis*)、黄槿(*Hibiscus tiliaceus*)、露兜树(*Pandanus tectorius*)、小花老鼠簕(*Acanthus ebracteatus*)和老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*)。茅尾海红树林自然保护区于 2005 年成立, 所在海域为不规则全日潮, 平均潮差为 2.52 m(常涛等, 2014)。选取茅尾海的仙岛公园和沙井作为研究地点, 与保护较好的仙岛公园相比, 沙井是钦州养殖大蚝的主要产区, 受人为活动影响稍大。研究区域红树林种类包括桐花树、秋茄、白骨壤和少量的无瓣海桑及半红树植物老鼠簕, 通过样方调查测定仙岛公园红树林平均胸径为 4.03 cm, 树高为 3.03 m, 沙井红树林平均胸径为 2.4 cm, 树高为 2.1 m。

2 研究方法

2.1 采集土样

分别在仙岛公园和沙井红树林区域设立 8 个 5 m×5 m 的样方, 在每个样方内随机选取 3 个土壤采样点, 土壤剖面深度分别为 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm, 采用 100 cm³ 环刀取样, 并测定土壤容重。将土壤样品放入聚乙烯自封袋后运回实验室, 经过自然风干、过筛和去除凋落物、石砾和根系(杂物)后, 用于 SOC 含量和全氮含量的测定。

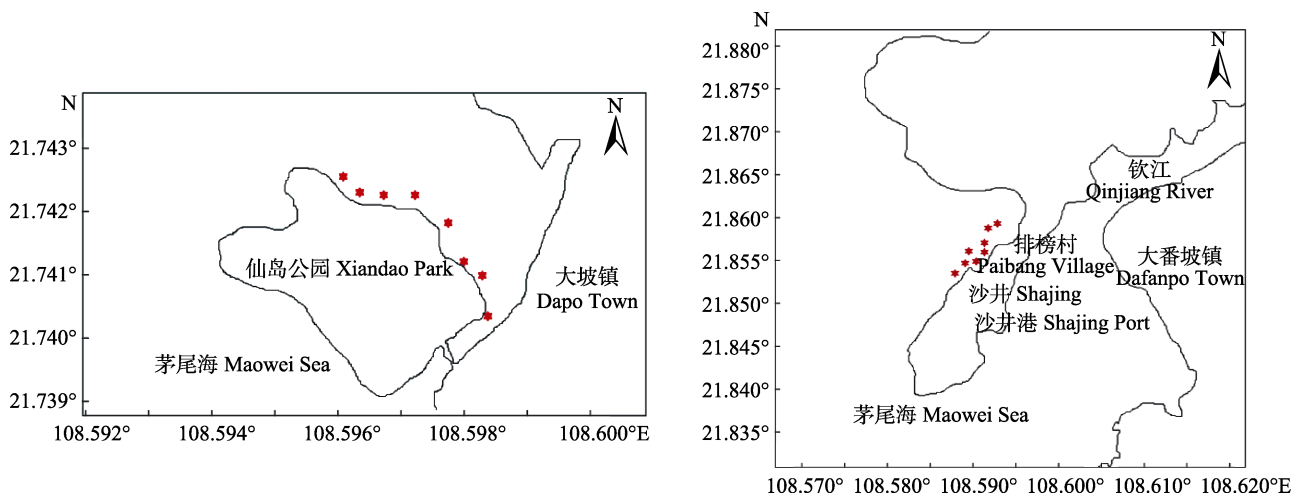


图 1 仙岛公园和沙井采样点
Fig.1 Sample sites in Xiandao Park and Shajing

2.1.1 SOC 和 TN 的测定 SOC 含量采用重铬酸钾外加热法测定, 土壤 TN 含量采用凯氏定氮法测定。

2.1.2 土壤 SOC 储量和 TN 储量的计算 土壤容重的计算公式如下:

$$rs = g \cdot 100 / v \cdot (100 + W)$$

式中, rs 为土壤容重(g/cm^3), g 为环刀土鲜重(g), v 为环刀容积($100 cm^3$), W 为样品含水百分数(不带%)

SOC 储量和 TN 储量计算公式如下:

$$SOC_S = \sum_i^n D_i \times M_i \times H_i \times 0.1$$

$$STN_S = \sum_i^n D_i \times N_i \times H_i \times 0.1$$

式中, SOC_S 为一定深度内的 SOC 储量(t/hm^2), STN_S 为一定深度内土壤 TN 储量(t/hm^2), D_i 为第 i 层土壤容重(g/cm^3), M_i 为第 i 层 SOC 含量(g/kg), N_i 为第 i 层土壤 TN 含量(g/kg), H_i 为第 i 层土壤厚度(cm), n 为土层数。

2.2 统计分析

用 Pearson 相关法和 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 比较仙岛公园与沙井红树林湿地 SOC 和 TN 储量的差异, 并分析 C/N 与 SOC 和 TN 储量的相关性。

3 结果与分析

3.1 仙岛公园和沙井红树林 SOC 和 TN 含量变化

仙岛公园和沙井 SOC 和 TN 含量表现为表聚性特征, 即最高值出现在 0~20 cm。仙岛公园 SOC 含量在 0~60 cm 的范围为 22.4~27.03 g/kg, TN 含量为 1.02~1.1 g/kg。沙井 SOC 含量在 0~60 cm 的范围为 10.5~14.2 g/kg, TN 含量为 0.57~0.79 g/kg。仙岛公园 SOC 和 TN 均高于沙井, 二者 SOC 含量在 0~20 cm 土层没有显著差异, 但在 20~40 cm 和 40~60 cm 土层中, 二者 SOC 含量均有显著差异。仙岛公园和沙井 TN 含量仅在 40~60 cm 土层中有显著差异。同一研究点不同土层 SOC 和 TN 含量均无显著差异($P > 0.05$) (图 2)。

3.2 仙岛公园和沙井红树林 SOC 和 TN 储量的分配

仙岛公园红树林总 SOC 储量和总 TN 储量均大于沙井。仙岛公园红树林在 0~60 cm 土层的 SOC 总储量为 181.03 t/hm^2 , 大于沙井 SOC 储量 (92.4 t/hm^2), 二者存在显著差异。仙岛公园红树林在 20~40 cm 和 40~60 cm 土层的 SOC 均与沙井红树林存在显著性差异。仙岛公

园的 TN 储量 (8.23 t/hm^2) 大于沙井 (5.12 t/hm^2), 但差异不显著, 在各土层间无显著差异。仙岛公园和沙井红树林 SOC 储量和 TN 储量在 0~60 cm 的 3 个土层均无显著差异 ($P > 0.05$)。2 个研究地点的 SOC 储量均表现为表聚性。仙岛公园 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 层的 SOC 储量分别占总 SOC 储量的 34.5%、32.1% 和 34.4%, 沙井各层 SOC 储量则为 35.5%、30.2% 和 34.3%。仙岛公园 TN 储量最高值出现在 20~40 cm 土层, 占总 TN 储量的 34.8%。沙井 TN 储量占总储量的 35.3% (表 1)。

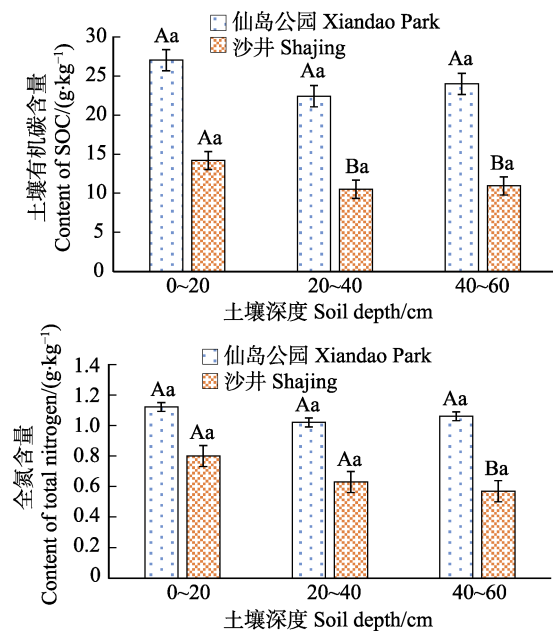


图 2 仙岛公园和沙井土壤有机碳和全氮含量
Fig.2 Content of soil organic carbon and total nitrogen in Xiandao park and Shajing

不同大写字母表示不同地点在同一土层差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一地点不同土层深度差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different capital letters mean significant differences at 0.05 level among different location in same soil layer. Small letters mean significant differences at 0.05 level among the same location in different soil layer, the same as below

3.3 C/N 与 SOC 和 TN 的相关性

由表 2 可知, 仙岛公园 C/N 值与 SOC 储量存在显著相关性 ($P < 0.01$, $R = 0.961$), C/N 值与 TN 相关性不显著, SOC 储量与 TN 储量之间相关性不显著。沙井 C/N 值与 SOC 储量无显著相关性, 与 TN 储量显著负相关 ($P < 0.05$, $R = -0.681$), SOC 储量与 TN 储量之间相关性极显著 ($P < 0.01$, $R = 0.947$)。

表 1 仙岛公园和沙井 SOC 和 TN 储量
Tab.1 Storage of soil organic carbon and total nitrogen in Xiandao Park and Shajing

处理 Treatment (t/hm ²)	土壤深度 Soil depth (cm)	仙岛公园 Xiandao Park	沙井 Shajing
SOC 储量 Storage of SOC	0~20	62.47±13.77 ^{Aa}	32.77±6.4 ^{Ab}
	20~40	58.26±13.97 ^{Aa}	27.93±8.99 ^{Bb}
	40~60	60.30±13.55 ^{Aa}	31.70±5.35 ^{Bb}
TN 储量 Storage of TN	0~20	2.66±0.17 ^{Aa}	1.81±0.57 ^{Ab}
	20~40	2.86±0.05 ^{Aa}	1.66±0.63 ^{Ab}
	40~60	2.72±0.25 ^{Aa}	1.65±0.32 ^{Ab}

注: 不同大写字母表示不同地点在同一土层差异显著($P<0.05$), 不同小写字母表示同一地点不同土层差异显著($P<0.05$)

Note: Different capital letters mean significant differences at 0.05 level among different locations in the same soil layer. Small letters mean significant differences at 0.05 level among the same location in different soil layers

表 2 仙岛公园和沙井 SOC、TN 储量与 C/N 的相关性

Tab.2 Correlation coefficients between storage of soil organic carbon, total nitrogen and C/N in Xiandao Park and Shajing

相关系数 Correlation	仙岛公园 Xiandao Park			沙井 Shajing		
	SOC 储量 Storage of SOC	TN 储量 Storage of TN	C/N	SOC 储量 Storage of SOC	TN 储量 Storage of TN	C/N
SOC 储量 Storage of SOC	1	0.407	0.961**	1	0.947**	-0.425
TN 储量 Storage of TN	0.407	1	0.141	0.947**	1	-0.681*
C/N	0.961**	0.141	1	-0.425	-0.681*	1

注: *: 在 0.05 级别(双尾), 相关性显著; **: 在 0.01 级别(双尾), 相关性显著

Note: *: The correlation was significant at 0.05 level (double tail); **: The correlation was significant at 0.01 level (double tail)

3.4 仙岛公园和沙井土壤 C/N 的变化

仙岛公园和沙井红树林土壤 C/N 值在 0~60 cm 土层的变化范围为 16.77~24.39。仙岛公园红树林土壤 C/N 值均大于沙井, 但差异不显著, 仙岛公园 C/N 最大值出现在 0~20 cm 红树林土层中, 沙井红树林土壤 C/N 最大值出现在 40~60 cm 土层(图 3)。

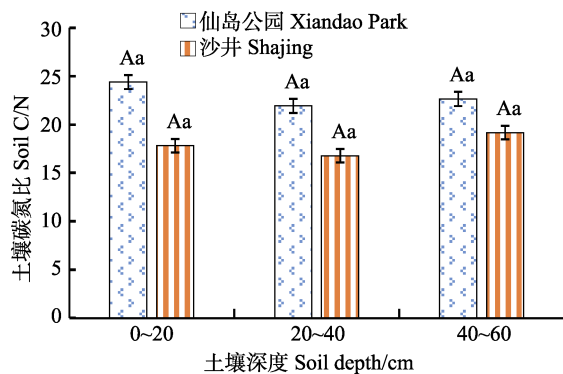


图 3 仙岛公园和沙井 C/N 值的变化

Fig.3 Soil C/N variation in Xiandao Park and Shajing

4 讨论

4.1 SOC 和 TN 的分布及碳氮相关性

仙岛公园红树林 SOC 和 TN 含量和储量均大于

沙井, 茅尾海红树林湿地是全国天然大蚝的主要繁殖场所之一, 被渔业区所包围, 距离居民区较近, 周边居民的生产生活对红树林产生了一定的影响, 尤其沙井是大蚝人工养殖区, 人为活动较多, 如制作蚝排和蚝桩、拾螺捡贝、挖泥丁和弹涂鱼以及船只出入踏踩红树林, 土壤扰动易造成营养物质的流失, 造成厌氧环境的改变, 导致土壤氮的矿化作用和加快有机碳的分解, 从而使土壤 SOC 和 TN 下降(陈志杰等, 2016; Hanke *et al*, 2013)。相比之下, 仙岛公园保护管理较好, 受人为活动影响较少。沙井红树林大多数为次生林, 较矮小, 挖掘、捕获活动对红树林根系有损害, 危及红树林幼苗和繁殖体库, 使其植物群落更新困难。仙岛公园的红树林长势较好, 树高和胸径明显高于沙井, Tian 等(2010)研究表明, 植物生物量对 SOC 积累起着重要作用, 植物与其土壤养分之间具有互相促进的关系, 高生物量区域的 SOC 和 TN 储量较高。

仙岛公园和沙井 SOC 含量均低于湛江和东寨港红树林(郭志华等, 2014; 许方宏等, 2012)。仙岛公园 SOC 含量高于雷州半岛红树林(杨娟等, 2012)和闽东红树林湿地, 沙井 SOC 平均含量与闽东红树林湿地 SOC 含量相近(廖小娟等, 2013)。除仙岛公园的 TN 储量外, 仙岛公园和沙井红树林 SOC 和 TN 含量和储量表现为表聚性现象, 即最高值出现在 0~20 cm 土

层,与海南红树林 SOC 储量的分布(辛琨等, 2014)及崇明东滩湿地 SOC 和 TN 含量的分布一致(陈怀璞等, 2017)。红树林湿地 SOC 来源有内源性和外源性 2 种输入,内源性主要来源于植物枯落物、根系和其分泌物以及动物残体和排泄物等,经过土壤中微生物的分解作用释放到土壤表层,使得土壤表层的 SOC 量高,加之红树林地处热带和亚热带地区,光照和降水充足,植被丰富,凋落物量大,增加了 SOC 的内源性输入;外源性输入主要来自潮汐、降雨和河水等携带的有机物。在受到来自人类活动影响小的情况下,红树林湿地 SOC 来源主要以内源性输入为主。红树林及其所处的动态环境,在沉积物、植被、间隙水、海水和大气之间存在多个界面的碳氮交换过程,同时受多种理化因子的影响,红树林沉积物有机碳存在很大的不确定性(Kauffman *et al.*, 2011; Giri *et al.*, 2011)。因此,不同地点、不同群落 SOC 和 TN 含量的变化会存在较大差异。闽江河口区湿地 SOC 含量最高值出现在 0~10 cm 土层(王维奇等, 2012)。海南岛红树林土壤 SOC 含量最高值出现在 20~40 cm(郭志华等, 2014)。海南东寨港秋茄红树林 SOC 含量最高值出现在 40~50 cm(詹绍芬等, 2015)。深圳红树林 SOC 含量最高值却出现在 70 cm 处(乔永民等, 2018)。

与一般陆地森林土壤分布规律不同,2 个研究地点 SOC 和 TN 垂直分布特征总体上表现为,随着土层深度的增加呈先减少后增加的趋势(沙井的 TN 除外),与广西钦州湾混交林红树林湿地 SOC 储量研究结果相近(周慧杰等, 2015)。有研究报道,土壤表层 SOC 和 TN 储量较高是因为植被地上枯落物的输入,深层土壤 SOC 和 TN 储量则主要受植物根系的影响(Yang *et al.*, 2015)。红树林根系发达,在土壤 40~60 cm 处还存在大量的细根,细根为土壤提供丰富的碳氮,根系及其活动是土壤深层碳氮的重要来源之一(辛琨等, 2014)。同时,红树林湿地所处的水淹的厌氧环境造成土壤呼吸释放缓慢,有利于深层土壤中氮和有机碳的积累。仙岛公园红树林 SOC 储量(181.03 t/hm²)远高于广西主要森林 SOC 储量(124.7 mg/hm²)(杜虎等, 2016),高于我国森林 SOC 平均储量(107.8 t/hm²)(刘世荣等, 2011),远高于福州和海南滨海人工防护林(尾巨桉、木麻黄、纹莢相思) SOC 储量(葛露露等, 2018; 宿少锋等, 2018),显示了红树林湿地巨大的碳汇能力。

SOC 和 TN 受土壤理化特性、水文气候条件和湿地生物以及人类活动等多因素的影响(张剑等, 2017; 辛琨等, 2014)。讨论 SOC 和 TN 的影响因素需要考虑外界影响因子和土壤本身特性的综合性因素,本研究

未涉及红树林沉积物间隙水以及海水的 SOC 和 TN 的研究,还不能从多个碳交换界面去全面分析与 SOC 和 TN 的关系。

沙井红树林 SOC 与 TN 储量之间相关性极显著($P<0.01$, $R=0.947$),仙岛公园红树林 SOC 与 TN 储量之间相关系数为 0.407,与陈怀璞等(2017)和崔静等(2012)的研究结果相近。陈怀璞等(2017)研究显示,土壤 SOC 与 TN 储量间呈极显著正相关性。SOC 与 TN 之间存在一定的消长和耦合效应,增加氮素可促进植物的生长,从而提高有机碳的积累,而有机碳的分解也可以促进氮素在土壤中的释放(吴旋蕾等, 2015),碳固定能引起氮固定。

4.2 土壤 C/N 变化及与 SOC 和 TN 储量的相关性

湿地沉积物中 C/N 值是确定其有机质来源的一个重要方法,当沉积物中 C/N>10 时,沉积物有机质以外源为主, C/N<10 时,以内源有机质为主, C/N≈10 时,外源与内源有机质达到平衡状态(Krishnamurthy *et al.*, 1986)。本研究中,红树林湿地 C/N 值范围为 16.77~24.39,平均值为 20.45,依此判断为标准,仙岛公园和沙井红树林湿地有机质主要来源于陆地,与夏鹏等(2015)通过同位素示踪研究广西钦州湾红树林有机质来源的结果一致。

仙岛公园 C/N 值与 SOC 储量存在极显著相关性($P<0.01$, $R=0.961$),Wang 等(2014)和 Yang 等(2013)研究报道,湿地土壤较高的 C/N 值会导致土壤微生物活性降低,使活性碳库周转率降低,减少有机碳的氧化和流失,最终,加快 SOC 的积累。所以,较高的 C/N 值表明有机碳的积累多,仙岛公园和沙井红树林平均 C/N 值大于中国土壤平均 C/N 值(王绍强等, 2008),说明红树林湿地具有强大的固碳能力。

5 结论

仙岛公园沙井红树林的 SOC 储量分别为 181.03 和 92.4 t/hm²,二者存在显著性差异($P<0.05$),其垂直分布特征均表现为随土层深度的增加呈先减少后增加的趋势。仙岛公园和沙井红树林 TN 储量分别为 8.23 和 5.12 t/hm²,仙岛公园红树林 TN 垂直特征同 SOC,沙井红树林 TN 随土层深度的增加呈减少的趋势。

沙井红树林的 SOC 与 TN 储量之间相关性极显著($P<0.01$, $R=0.947$),仙岛公园红树林 SOC 与 TN 储量之间相关系数为 0.407。2 个研究地点 C/N 值为 16.77~24.39,平均值为 20.45,说明有机质主要来源于陆地,仙岛公园红树林 C/N 值与 SOC 储量存在极显

著相关性($P < 0.01$, $R = 0.961$), C/N 值与 TN 相关性不显著, 沙井红树林 C/N 值与 TN 储量存在显著负相关($P < 0.05$)。

参 考 文 献

- Chang T, Wu ZQ, Huang LL, *et al.* Species composition and diversity of fish larvae and juveniles in the creek of mangrove of Maowei Gulf, Guangxi Province. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014(4): 52–58 [常涛, 吴志强, 黄亮亮, 等. 广西茅尾海红树林潮沟仔稚鱼种类组成及其多样性研究. *海洋湖沼通报*, 2014(4): 52–58]
- Chen GC, Ulumuddin YI, Pramudji S, *et al.* Rich soil carbon and nitrogen but low atmospheric greenhouse gas fluxes from North Sulawesi mangrove swamps in Indonesia. *Science of the Total Environment*, 2014, 487: 91–96
- Chen HP, Zhang TY, Ge ZM, *et al.* Distribution of soil carbon and nitrogen stocks in salt marsh wetland in Dongtan of Chongming. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(3): 242–251 [陈怀璞, 张天雨, 葛振鸣, 等. 崇明东滩盐沼湿地土壤碳氮储量分布特征. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(3): 242–251]
- Chen ZJ, Han SJ, Zhang JH. Effects of land use change on soil organic carbon fractions in mangrove wetland of Zhangjiangkou. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(9): 2379–2385 [陈志杰, 韩士杰, 张军辉. 土地利用变化对漳江口红树林土壤有机碳组分的影响. *生态学杂志*, 2016, 35(9): 2379–2385]
- Cui J, Chen YM, Huang JJ, *et al.* Soil carbon sequestration characteristics of *Caragana microphylla* plantations and influencing factors in loess hilly semiarid region. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(9): 1197–1203 [崔静, 陈云明, 黄佳健, 等. 黄土丘陵半干旱区人工柠条林土壤固碳特征及其影响因素. *中国生态农业学报*, 2012, 20(9): 1197–1203]
- Ding SL, Zhang QJ, Dong J, *et al.* Microbial community structure and its relationship to heavy metals in Shenzhen and Hong Kong mangrove sediments. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(10): 3018–3030 [丁苏丽, 张祁灵, 董俊, 等. 深港红树林沉积物微生物群落多样性及其与重金属的关系. *生态学杂志*, 2018, 37(10): 3018–3030]
- Du H, Zeng FP, Song TQ, *et al.* Spatial pattern of soil organic carbon of the main forest soils and its influencing factors in Guangxi, China. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2016, 40(4): 282–291 [杜虎, 曾馥平, 宋同清, 等. 广西主要森林土壤有机碳空间分布及其影响因素. *植物生态学报*, 2016, 40(4): 282–291]
- Gao TL, Guan W, Mao J, *et al.* Carbon storage and influence factors of major mangrove communities in Fucheng, Leizhou Peninsula, Guangdong Province. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(6): 985–990 [高天伦, 管伟, 毛静, 等. 广东省雷州附城主要红树林群落碳储量及其影响因子. *生态环境学报*, 2017, 26(6): 985–990]
- Ge LL, Meng QQ, Lin Y, *et al.* Carbon storage and its allocation to different plantations in a coastal sandy area. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(4): 723–728 [葛露露, 孟庆权, 林宇, 等. 滨海沙地不同树种人工林的碳储量及其分配格局. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(4): 723–728]
- Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, *et al.* Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 2011, 20(1): 154–159
- Guo ZH, Zhang L, Guo YR, *et al.* Soil carbon sequestration and its relationship with soil pH in Qinglangang mangrove wetlands in Hainan Island. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(10): 8–15 [郭志华, 张莉, 郭彦茹, 等. 海南清澜港红树林湿地土壤有机碳分布及其与 pH 的关系. *林业科学*, 2014, 50(10): 8–15]
- Hanke A, Cerli C, Muhr J, *et al.* Redox control on carbon mineralization and dissolved organic matter along a chronosequence of paddy soils. *European Journal of Soil Science*, 2013, 64(4): 476–487
- Hu JL, Xin K, Li Z, *et al.* Carbon storage and sequestration function evaluation in Dongzhaigang mangrove reserve of Hainan. *Wetland Science*, 2015, 13(3): 338–343 [胡杰龙, 辛琨, 李真, 等. 海南东寨港红树林保护区碳储量及固碳功能价值评估. *湿地科学*, 2015, 13(3): 338–343]
- Kauffman JB, Heider C, Cole TG, *et al.* Ecosystem carbon stocks of Micronesian mangrove forests. *Wetlands*, 2011, 31(2): 343–352
- Krishnamurthy RV, Bhattacharya SK, Kusumgar S. Palaeoclimatic changes deduced from $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and C/N ratios of Karewa Lake sediments, India. *Nature*, 1986, 323(6084): 150–152
- Laanbroek H, Zhang QF, Leite M, *et al.* Effects of *Rhizophora mangle* leaf litter and seedlings on carbon and nitrogen cycling in salt marshes—potential consequences of climate-induced mangrove migration. *Plant and Soil*, 2018, 426(1–2): 383–400
- Liao XJ, He DJ, Wang R, *et al.* Distribution pattern of soil organic carbon contents in the coastal wetlands in Eastern Fujian. *Wetland Science*, 2013, 11(2): 192–197 [廖小娟, 何东进, 王韧, 等. 闽东滨海湿地土壤有机碳含量分布格局. *湿地科学*, 2013, 11(2): 192–197]
- Liu CQ, Tian HQ. Spatial and temporal patterns of nitrogen deposition in China: Synthesis of observational data. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2007, 112 (D22): 229–238
- Liu SR, Wang H, Luan JW. A review of research progress and future perspective of forest soil carbon stock and soil carbon process in China. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(19): 5437–5448 [刘世荣, 王晖, 梁军伟. 中国森林土壤碳储量与土壤碳过程研究进展. *生态学报*, 2011, 31(19): 5437–5448]
- Liu YQ, Ling BW, Xu PF. On the wetland ecosystem protection of Maowei Sea mangrove reserve in Qinzhou, Guangxi.

- Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2009, 13(4): 97–99, 102 [刘永泉, 凌博闻, 徐鹏飞. 谈广西钦州茅尾海红树林保护区的湿地生态保护. 河北农业科学, 2009, 13(4): 97–99, 102]
- Luo SY, Wang JQ, Zhou M, *et al.* Spatial distribution and ecological risk assessment of heavy metals in the surface soils of mangrove wetland in Donghai Island, Zhanjiang. Ecology and Environmental Sciences, 2018, 27(8): 1547–1555 [罗松英, 王嘉琦, 周敏, 等. 湛江东海岛红树林湿地表层土壤重金属空间分布特征及生态风险评价. 生态环境学报, 2018, 27(8): 1547–1555]
- Marchand C. Soil carbon stocks and burial rates along a mangrove forest chronosequence (French Guiana). Forest Ecology and Management, 2017, 384: 92–99
- Morimaru K, Mitsutoshi T, Yasuo L, *et al.* High salinity leads to accumulation of soil organic carbon in mangrove soil. Chemosphere, 2017, 177: 51–55
- Qiao YM, Tan JB, Ma SX, *et al.* The distribution pattern and sources analysis for nitrogen and phosphorus in core sediment of Shenzhen mangrove wetland. Environmental Science and Technology, 2018, 41(2): 34–40 [乔永民, 谭键滨, 马舒欣, 等. 深圳红树林湿地沉积物氮磷分布与来源分析. 环境科学与技术, 2018, 41(2): 34–40]
- Su SF, Xue Y, Yang ZY, *et al.* Carbon storage allocation pattern of *Casuarina equisetifolia* forest with different ages in Wenchang City of Hainan. Guangdong Agricultural Sciences, 2018, 45(11): 46–52 [宿少锋, 薛杨, 杨众养, 等. 海南文昌不同林龄木麻黄人工林碳储量分配格局. 广东农业科学, 2018, 45(11): 46–52]
- Tian H, Chen G, Zhang C, *et al.* Pattern and variation of C:N:P ratios in China's soils: A synthesis of observational data. Biogeochemistry, 2010, 98: 139–151
- Wang SQ, Yu GR. Ecological stoichiometry characteristics of ecosystem carbon, nitrogen and phosphorus elements. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3937–3947 [王绍强, 于贵瑞. 生态系统碳氮磷元素的生态化学计量学特征. 生态学报, 2008, 28(8): 3937–3947]
- Wang W, Sardans J, Zeng C, *et al.* Responses of soil nutrient concentrations and stoichiometry to different human land uses in a subtropical tidal wetland. Geoderma, 2014, 232–234: 459–470
- Wang WQ, Wang C, Tong C, *et al.* Soil organic carbon along a salinity gradient in *Phragmites australis* marsh in the Minjiang River estuary. Wetland Science, 2012, 10(2): 164–169 [王维奇, 王纯, 仝川, 等. 闽江河口区盐—淡水梯度下芦苇沼泽土壤有机碳特征. 湿地科学, 2012, 10(2): 164–169]
- Wu ZL, Wang DQ, Li YJ, *et al.* The contribution of *Scirpus mariqueter* to sediment carbon storage of Chongming East Tidal Flat wetland in Yangtze River Estuary. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(11): 3639–3646 [吴绽蕾, 王东启, 李杨杰, 等. 长江口崇明东滩海三棱藨草对沉积物有机碳库的贡献研究. 环境科学学报, 2015, 35(11): 3639–3646]
- Xia P, Meng XW, Ping AP, *et al.* Historical retrospection on mangrove development using stable carbon isotopes and pollen analysis, and its response to climate change and human activity. Haiyang Xuebao, 2015, 37(3): 77–85 [夏鹏, 孟宪伟, 平爱平, 等. 广西钦州湾百年来红树林演变的有机碳同位素和孢粉示踪及其影响因素. 海洋学报, 2015, 37(3): 77–85]
- Xiao Y, Xie GD, An K. The function and economic value of soil conservation of ecosystems in Qinghai-Tibet Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(11): 2367–2376 [肖玉, 谢高地, 安凯. 青藏高原生态系统土壤保持功能及其价值. 生态学报, 2003, 23(11): 2367–2376]
- Xin K, Yan K, Li Z, *et al.* Distribution of soil organic carbon in mangrove wetlands of Hainan Island and its influencing factors. Acta Pedologica Sinica, 2014, 51(5): 1078–1086 [辛琨, 颜葵, 李真, 等. 海南岛红树林湿地土壤有机碳分布规律及影响因素研究. 土壤学报, 2014, 51(5): 1078–1086]
- Xu FH, Zhang JP, Zhang QM, *et al.* Carbon storage of three natural mangrove forests in Gaoqiao, Zhanjiang. Value Engineering, 2012, 31(15): 5–6 [许方宏, 张进平, 张倩媚, 等. 广东湛江高桥三个天然红树林的土壤碳库. 价值工程, 2012, 31(15): 5–6]
- Xu YH, Cui ZG, Qu KM, *et al.* Purification efficiency of mariculture wastewater in constructed wetlands with two salt-tolerant plants. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 80–88 [许永辉, 崔正国, 曲克明, 等. 不同耐盐植物人工湿地净化养殖外排水效果. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 80–88]
- Yang J, Jay G, Liu BL, *et al.* Edge effects of mangrove boundaries and their impact on organic carbon pool along the coast of Leizhou Peninsula. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(5): 161–168 [杨娟, Jay G, 刘宝林, 等. 雷州半岛红树林边缘效应及其对海岸有机碳库的影响. 海洋学报, 2012, 34(5): 161–168]
- Yang SL, Xu KH, Milliman JD, *et al.* Decline of Yangtze River water and sediment discharge: Impact from natural and anthropogenic changes. Scientific Reports, 2015, 5: 12581
- Yang W, Zhao H, Chen XL, *et al.* Consequences of short-term *C4* plant *Spartina alterniflora* invasions for soil organic carbon dynamics in a coastal wetland of Eastern China. Ecological Engineering, 2013, 61(12): 50–57
- Zhan SF, Huang B, Chen YJ, *et al.* Study of soil organic carbon in different mangrove communities. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(4): 397–402 [詹绍芬, 黄勃, 陈玉军, 等. 不同红树林群落土壤环境有机碳比较. 热带生物学报, 2015, 6(4): 397–402]
- Zhang J, Wang LP, Xie JP, *et al.* Distribution and influencing factors of soil organic carbon in Dunhuang Yangguan wetland. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(9): 2455–2464 [张剑, 王利平, 谢建平, 等. 敦煌阳关湿地土壤有机碳分布特征及其影响因素. 生态学杂志, 2017, 36(9): 2455–2464]
- Zhang X, Xu XF, Dai YY, *et al.* Phytoplankton community

characteristics and variation at artificial reefs of Tianjin offshore. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 1–10 [张雪, 徐晓甫, 戴媛媛, 等. 天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落及其变化特征. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 1–10]

Zhou HJ, Mo LP, Liu YD, *et al.* Correlation analysis between

soil organic carbon density and soil physical and chemical properties of mangrove wetland in Qinzhou Bay of Guangxi. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(17): 120–123, 240 [周慧杰, 莫莉萍, 刘云东, 等. 广西钦州湾红树林湿地土壤有机碳密度与土壤理化性质相关性分析. *安徽农业科学*, 2015, 43(17): 120–123, 240]

(编辑 马瑾艳)

Spatial Distribution of Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Mangrove Wetland of Xiandao Park and Shajing in Guangxi

TAO Yuhua^①, HUANG Xing, WANG Xueping, ZHONG Qiuping, KANG Zhenjun

(*Beibu Gulf University, Guangxi Key Laboratory of Marine Disaster in the Beibu Gulf, and Key Laboratory of Coastal Science and Engineering, Beibu Gulf, Qinzhou 535011*)

Abstract The contents and storage patterns of soil organic carbon (SOC) and total nitrogen (TN), spatial distribution characteristics of SOC and TN, C/N ratios, and correlation between SOC and TN in Xiandao Park and Shajing (Guangxi) mangrove wetlands were assessed. The average SOC and TN contents of the Xiandao Park mangrove wetlands were 24.5 and 1.06 g/kg, respectively, and those of the Shajing mangrove wetlands were 11.9 and 0.71 g/kg, respectively. SOC storage capacities of the Xiandao Park and Shajing mangrove wetlands were 181.03 and 92.4 t/hm², respectively, and were significantly different ($P < 0.05$). TN storage capacities of Xiandao Park and Shajing mangrove wetlands were 8.23 and 5.12 t/hm², respectively. The highest-to-lowest vertical distribution of SOC storage at both sites and TN storage at Xiandao Park was 20~40 cm > 40~60 cm > 0~20 cm, while TN storage at Shajing decreased with increasing soil depth. A significant correlation was observed between SOC and TN contents at Shajing ($P < 0.01$); the correlation coefficient was 0.947. C/N ratio at both sites ranged from 16.77 to 24.39, indicating that the organic matter came primarily from the land. A significant correlation between soil C/N and SOC storage was evident at Xiandao Park ($P < 0.01$), and a significant negative correlation between C/N and TN storage was evident at Shajing ($P < 0.05$). The SOC storage of the Xiandao Park mangrove wetlands was higher than that of Chinese forests, indicating that mangrove soil has a higher carbon sequestration capacity.

Key words Xiandao Park; Shajing; Mangrove; Storage of SOC and TN; Spatial distribution

① Corresponding author: TAO Yuhua, E-mail: arlenetao12@aliyun.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190525001

http://www.yykxjz.cn/

闫永斌, 陈新军, 汪金涛, 雷林, 程起群. 东南太平洋茎柔鱼资源丰度灰色预测研究. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 46–51
Yan YB, Chen XJ, Wang JT, Lei L, Cheng QQ. Prediction of abundance index of the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Southeast Pacific Ocean based on a grey system-based model. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 46–51

东南太平洋茎柔鱼资源丰度灰色预测研究*



闫永斌^{1,3} 陈新军^{1,2} 汪金涛^{1,2①} 雷林^{1,2} 程起群³

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 农业农村部大洋渔业开发重点实验室 国家远洋渔业工程技术研究中心 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 农业农村部大洋渔业资源环境科学观测实验站 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)是东南太平洋头足类中个体最大、资源最丰富的种类之一,经济价值高,已成为我国远洋渔业的重要组成部分。准确的资源丰度预测有利于资源的合理开发和利用。本研究基于 2003~2015 年东南太平洋茎柔鱼生产统计数据及其产卵场环境、气候因子资料,使用相关性分析和灰色系统方法,建立东南太平洋茎柔鱼资源丰度的预报模型。结果显示,2 月产卵场海表面温度(Sea surface temperature, SST)、3 月产卵场叶绿素 *a* 浓度(Chl *a*)、12 月太平洋年代气候震荡(Pacific decadal oscillation, PDO)和 10 月厄尔尼诺指数(Oceanic Nino index, ONI)与茎柔鱼资源丰度具有较好的相关性。比较多种预报模型发现,基于 2 月 SST、12 月 PDO 和 10 月 ONI 的 GM(1, 4)模型有较好的预测效果,其准确率达到 85%以上,可用于东南太平洋茎柔鱼资源丰度的预测。

关键词 东南太平洋; 茎柔鱼; 灰色预测; 资源丰度

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0006-06

茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)广泛分布于东太平洋的加利福尼亚(37°N)到智利(47°S)的海域中,在赤道附近可向西至 125°W (Anatolio *et al.*, 2001; Nigmatullin *et al.*, 2001),是头足类中个体最大、资源最丰富的种类之一(王尧耕, 2005),具有极高的经济价值,为中国、日本、韩国、秘鲁和智利等各国主要捕捞对象之一(Liu *et al.*, 2015)。自 2001 年我国对秘鲁海区茎柔鱼资源进行探捕以来,茎柔鱼资源逐渐成为我国头足类产量的重要组成部分,约占我国头足类产量的 30% (陈新军等, 2006; 贡艺等, 2018)。

资源量预报属于中长期渔情预报的一种,对资源补充量进行精确的预报是确保渔业资源科学管理、合

理开发的关键。科学预测资源量或者资源丰度,首先,必须要了解预测对象的生活史过程、栖息环境及其洄游分布。以总渔获量和单位捕捞努力量渔获量为基础进行分析预报的具体步骤:(1)筛选渔情预报指标,影响鱼群行动规律的生物性或非生物性因素等均可成为预报指标;(2)建立预报模型,以生态位(Ecological niche)或资源选择函数(Resource selection function, RSF)为理论基础,主要通过频率分析和回归等统计学方法分析目标鱼种的生态位或者对于关键环境因子的响应函数,从而建立渔情预报模型。主要渔情预报模型有线性回归模型、广义回归模型、贝叶斯方法和时间序列分析等(陈新军, 2004)。

* 国家自然科学基金(NSFC31702343; NSFC41876141)和自然资源卫星遥感业务支持服务体系项目(202001004)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (NSFC31702343; NSFC41876141), and Demonstration of Natural Resources Satellite Remote Sensing Technology System Construction and Application (202001004)].
闫永斌, E-mail: 15653831687@163.com

① 通讯作者: 汪金涛, E-mail: jtwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-05-25, 收修改稿日期: 2019-06-21

在东南太平洋海域,关于茎柔鱼资源补充量的研究多集中在单因子影响方面。如陈新军等(2006)研究指出,茎柔鱼资源状况与海洋环境关系密切,特别是厄尔尼诺和拉尼娜事件。徐冰(2012)利用典型相关性分析,分析了海表面温度(Sea surface temperature, SST)、表温距平均值(Sea surface temperature anomaly, SSTA)、茎柔鱼产卵场、索饵场最适表层水温范围占总面积的比例与资源丰度、补充量相关性,并建立了基于 SST 因子的资源丰度线性预报模型。Ichii 等(2002)指出,水温并非影响茎柔鱼资源丰度和补充量的主要限制性因子。这些研究通常是分析单一海洋环境或气候指标对茎柔鱼资源量的影响,没有综合研究环境及气候因子对茎柔鱼资源量的影响。

灰色系统理论是由邓聚龙教授于 1982 年创立的一种研究少数据、贫信息、不确定性问题的新方法。以“部分信息已知,部分信息未知”的“小样本”、“贫信息”不确定性系统为研究对象,通过对“部分”已知信息的生成、开发,提取有价值的信息,实现对系统运行行为、演化规律的正确描述和有效监控(何盛明, 1990),与一般的概率统计及模糊数学方法相比的优点在于它允许分析的样本数据较少且服从任意的分布。因此,在数据一般较少的长期(年间)资源预报中会有较大的应用前景(陈新军, 2003)。目前,该方法已在诸多领域取得成果,如方舟等(2018)利用灰色关联分析和灰色预测模型预测了中西太平洋鳀鱼(*Katsuwonus pelamis*)的资源丰度,朱文涛等(2018)利用灰色系统预测了西北太平洋秋刀鱼(*Cololabis saira*)的资源丰度。

本研究拟采用东南太平洋茎柔鱼生产统计数据和海洋环境与气候数据,使用灰色预测模型,分析影响茎柔鱼资源丰度变化因子,并建立多种资源丰度预报模型,以此反映该种类的资源丰度动态,为我国东南太平洋鱿钓渔船的科学生产与管理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 渔业数据

东南太平洋茎柔鱼生产统计资料来自上海海洋大学中国远洋渔业数据中心,时间为 2003~2015 年,数据包括日期、总产量和总作业渔船数。

单位捕捞努力量渔获量(Catch per unit effort, CPUE)可以作为表征茎柔鱼资源密度的指标(汪金涛等, 2013; 陈洋洋等, 2017),因此,计算年平均 CPUE 作为资源丰度的指标:

$$CPUE = \frac{C_y}{V_y} \quad (1)$$

式中, CPUE 为单位捕捞努力量渔获量(t/V); C_y 为历年总渔获量; V_y 为历年作业渔船总数; y 为年。

1.2 环境数据

本研究采用 4 种环境及气候因子,包括太平洋年代气候震荡(Pacific decadal oscillation, PDO)数据,厄尔尼诺指数(Oceanic Nino index, ONI),茎柔鱼产卵场海表面温度(Sea surface temperature, SST),叶绿素 a 浓度(Chl a)(余为等, 2015; 魏联等, 2017; 魏广恩等, 2018; 官文江等, 2017)。PDO 和 ONI 来自美国国家海洋和气象管理局网站(<https://www.esrl.noaa.gov/psd/data/climateindices/list>)。因 PDO 和 ONI 现象对茎柔鱼产卵及发育阶段产生影响,反应在茎柔鱼成体上有一定的滞后,所以 PDO 和 ONI 数据的时间范围为 2001~2013 年,时间分辨率为月。SST 和 Chl a 来自美国国家海洋和气象管理局网站(<https://oceanwatch.pifsc.noaa.gov>),时间为 2003~2015 年的 1~12 月,空间范围为茎柔鱼的产卵场海域($5^{\circ}\sim 7^{\circ}\text{S}$, $84^{\circ}\sim 86^{\circ}\text{E}$),时间分辨率为月,空间分辨率均为 $0.1^{\circ}\times 0.1^{\circ}$ 。

1.3 关键环境因子的选择

利用相关性分析选取显著影响东南太平洋茎柔鱼资源丰度环境因子:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2)$$

式中, x 、 y 分别为环境因子和资源丰度 CPUE 组成的时间系列值, \bar{x} 、 \bar{y} 分别为 x 、 y 的平均值, i 为第 n 项环境因子, r 为相关系数。

1.4 灰色预测模型的建立

灰色预测建模是以灰色模块概念为基础。灰色系统理论认为,一切随机量都是在一定范围内、一定时段上变化的灰色量及灰色过程。对于灰色量的处理,是从无规律的原始数据中找出规律,即对数据通过一定方式处理后,使其成为较有规律的时间序列数据,再建立模型。灰色 GM 建模实际上是生成数据模型,CPUE 序列为系统的特征数据序列,各个环境因子序列为相关因素序列,模型细节及具体建模过程参照陈新军(2003)的方法。本研究利用离散 GM(1, N)模型,考虑多种关键环境因子的不同组合,建立东南太平洋茎柔鱼资源丰度预测模型。利用相对误差和均方误差(MSE)检验模型的精度与稳定性(汤银才, 2008)。

1.5 预测验证

利用2016及2017年的环境气候因子数据和渔业生产数据对所建立的灰色预测模型进行验证。

2 结果

2.1 CPUE的变化趋势

2003~2015年,东南太平洋茎柔鱼CPUE的年间波动剧烈,最高值出现在2004年,最低值发生在2012年,CPUE均值在1200 t/V上下波动(图1)。

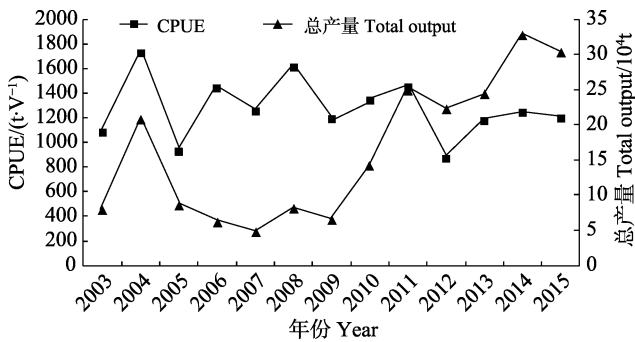


图1 2003~2015年东南太平洋茎柔鱼CPUE
Fig.1 Annual CPUE of *D. gigas* during 2003~2015 in Southeast Pacific Ocean

2.2 关键环境因子

相关性分析显示,2月产卵场(5°~7°S, 84°~86°E) SST、3月产卵场 Chl *a*、12月 PDO 和 10月 ONI 均与其资源丰度呈显著相关性(表1)。因此,选用这几个月的环境因子构建灰色系统预测模型。

表1 2003~2015年东南太平洋茎柔鱼CPUE
与环境、气候因子相关性分析

Tab.1 Correlation analysis between CPUE of *D. gigas* and environmental-climatic factors in Southeast Pacific Ocean during 2003~2015

关键环境及气候因子 Key environmental and climatic factors	相关性分析统计量 Correlation analysis statistics	
	<i>r</i>	<i>P</i>
2月产卵场 SST SST in spawning grounds in February	0.51	<i>P</i> <0.1
3月产卵场 Chl <i>a</i> Chl <i>a</i> in spawning grounds in March	0.61	<i>P</i> <0.05
12月 PDO PDO in December	0.62	<i>P</i> <0.05
10月 ONI ONI in October	0.72	<i>P</i> <0.05

2.3 灰色模型

根据选定的4种关键环境因子,以CPUE为因变量,建立5种预测模型(表2)。5种模型中相对误差由低到高依次为模型3、模型5、模型4、模型1和模型2(表3);而模型均方误差由小到大分别为模型3、模型5、模型4、模型1和模型2(表3)。因此,综合考虑这2种模型指标,选用模型3作为东南太平洋茎柔鱼资源丰度预测模型。

2.4 验证结果

对模型3的验证结果见表4,由表4可知,2016年的相对误差较大,但在30%以内,2017年的相对误差较小,预测结果较为准确。

表2 5种灰色预报模型
Tab.2 Five gray forecast models

模型1 GM(1, 5)	模型2 GM(1, 4)	模型3 GM(1, 4)	模型4 GM(1, 4)	模型5 GM(1, 4)
SST, Chl <i>a</i> , PDO, ONI	Chl <i>a</i> , PDO, ONI	SST, PDO, ONI	SST, Chl <i>a</i> , ONI	SST, Chl <i>a</i> , PDO

3 讨论与分析

2003~2015年,东南太平洋茎柔鱼年渔获量和CPUE变化趋势有差异(图1),年渔获量由于捕捞技术、捕捞规模等影响较大,并不能反映茎柔鱼资源相对丰度真实情况,因此,选用CPUE作为茎柔鱼资源丰度指标(魏联等,2017)。茎柔鱼作为短生命周期机会主义鱼种,其资源量极易受气候和海洋环境变化的影响(Rodhouse, 2001)。所以,预测其资源丰度必须要考虑茎柔鱼栖息地的气候和海洋环境因素。

本研究使用东南太平洋茎柔鱼产卵场的环境因

子和气候因子为自变量,建立多种灰色系统资源丰度预测模型。其中,不包含产卵场 Chl *a* 的模型3的预测精度高,但该模型未能准确预测2005年CPUE(图2)。因为灰色系统是一种基于贫数据的分析方法(何盛明,1990),所以,在基于少量数据构建的模型中,预测模型会受到前列数据的影响,在各组的结果间倾向于表达出相对平缓的变化趋势,对突变情况的响应能力比较差,导致模型存在一定的不确定性,在2005年的预测结果上有较大的误差,可能是因为当年捕捞作业区域发生了变化所导致的。另外,模型2自变量不包括产卵场 SST,其预测误差大,说明产卵场 SST

表 3 茎柔鱼资源丰度灰色预测模型相对误差及均方误差(%)
Tab.3 Relative errors (%) and MSE of grey models for *D. gigas* in the Southeast Pacific Ocean

年份 Year	模型 1 Model 1	模型 2 Model 2	模型 3* Model 3	模型 4 Model 4	模型 5 Model 5
2004	-18.5	-18.1	-25.7	-19.2	-17.7
2005	79.5	75.6	77.5	81.4	81.6
2006	30.4	38.7	11.8	21.6	8.8
2007	12.5	12.5	12.0	16.7	21.9
2008	2.6	12.2	-6.2	-3.6	-13.4
2009	-17.4	-23.1	-7.4	-6.2	12.5
2010	15.5	38.3	-10.2	5.5	0.3
2011	28.4	55.4	3.0	14.2	-1.6
2012	-30.8	-65.4	14.7	-7.7	20.6
2013	-9.4	-8.8	-9.4	-12.5	-13.2
2014	16.1	28.2	6.5	8.5	-0.9
2015	-4.5	-9.1	4.5	-2.1	-1.0
RE	20.5	29.6	14.5	15.3	14.9
MSE	96076.5	186544.7	64799.7	70440.9	68047.6

注: *为选择的最优模型

Note: *: The best model chosen

表 4 预测验证结果
Tab.4 Predictive verification result

项目 Items	2016	2017
实际值 Real CPUE (t/V)	750.4	794.6
预测值 Predicted CPUE (t/V)	539.7	859.9
相对误差 RE(%)	28.07	8.22

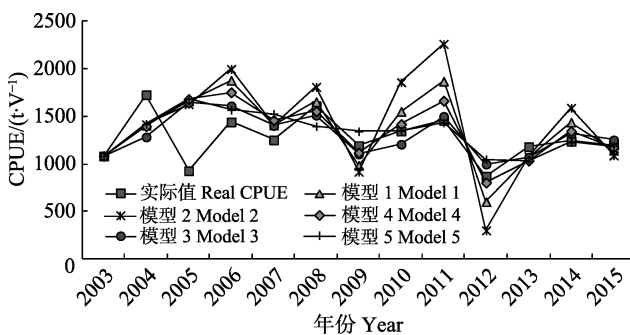


图 2 茎柔鱼资源丰度灰色模型预测结果

Fig.2 Results of the prediction of *D. gigas* in the Southeast Pacific Ocean based on grey models

与茎柔鱼资源丰度有较为密切的关系。汪金涛(2015)曾利用产卵场区水温作为其预测模型的一个因子, Cao 等(2009)也利用了产卵场适宜水温面积作为资源预报模型中的一个变量, 均取得较好的预测效果, 表明茎柔鱼早期生活栖息环境因子, 尤其是 SST, 很大程度上决定柔鱼资源丰度。

本研究去除了产卵场 Chl *a* 数据的模型 3 在相对

误差和均方误差分析中都有较为精确的预测结果, 且高于不包含部分气候因子的模型 4 和模型 5。这说明在不包含所有环境因子且加入气候因子的情况下, 建立的模型效果好于包含所有环境因子且不包含部分气候因子所建立的模型效果, 一定程度上反映了气候对茎柔鱼资源量的影响高于环境对茎柔鱼资源量的影响。Anatolio 等(2001)的研究表明, 茎柔鱼资源量与全球性气候条件有关, 特别是厄尔尼诺和拉尼娜现象。厄尔尼诺现象将导致秘鲁外海的茎柔鱼资源量减少, 捕捞产量下降(Anderson *et al*, 2001)。高雪等(2017)的研究也表明, 茎柔鱼资源量与 PDO 和厄尔尼诺事件有关, 且 PDO 比厄尔尼诺事件更为重要。但也有研究表明, PDO 是作用于整个太平洋的一种气候现象, 而本研究的茎柔鱼是栖息于东南太平洋的一种鱼类, 与 PDO 定义[北太平洋北纬 20°N 以北区域 SST 距平的经验正交函数的第一分量(余为, 2016)]的作用区域有所不同, 关联性较弱, 且为年代际的一种变动, 年度间变动较小, 因此, 对茎柔鱼的影响较厄尔尼诺事件弱(段丁毓等, 2018)。许骆良等(2015)通过构建广义线性模型和广义加性模型, 认为只有叶绿素浓度对茎柔鱼资源量有显著性影响, 而通常认为, 对渔场起到决定作用的水温因素则为非显著因子。汪金涛等(2014)基于神经网络模型认为, 海表面温度、叶绿素和海面高度这 3 个因子对茎柔鱼资源量都具有显著影响, 并构建了基于以上因子茎柔鱼资源丰度的预测模型。这可能是由于各研究所选取的环境因子的地理位置不同, 导致结果出现差异, 本研究中, 可能由于只选取了产卵场 Chl *a* 并采用平均的方式进行研究, 在一定程度上淡化了 Chl *a* 对茎柔鱼资源量的影响。

综上所述, 本研究建立的 5 种预测模型均能较好地预测东南太平洋茎柔鱼资源丰度, 模型 3 精度最高, 且验证结果较为准确, 选定为最终模型。同时, 本研究也存在一些不足, 如无法具体分析各因子之间的交互效应, 例如, PDO 的变化会导致 SST 的变化、相对贡献率, 没有考虑环境、气候因子的滞后效应等。在今后的研究中, 应更加精细和量化东南太平洋茎柔鱼整个生活史气候因子和环境因子, 并与其他模型进行综合比较, 选择全局最优的资源丰度预测模型。

参 考 文 献

Anatolio T, Carmen Y, Mariategui L, *et al*. Distribution and concentrations of Jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fisheries Research*, 2001, 54(1): 21–32

Anderson CIH, Rodhouse PG. Life cycles, oceanography and variability: Ommastrephid squid in variable oceanographic

- environments. *Fisheries Research*(Amsterdam), 2001, 54(1): 1–143
- Cao J, Chen XJ, Chen Y. Influence of surface oceanographic variability on abundance of the western winter-spring cohort of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* in the NW Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress*, 2009, 381(12): 119–127
- Chen XJ, Zhao XH. Preliminary study on the catch distribution of *Dosidicus gigas* and its relationship with sea surface temperature in the offshore waters of Peru. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2006, 15(1): 65–70 [陈新军, 赵小虎. 秘鲁外海茎柔鱼产量分布及其与表温关系的初步研究. *上海海洋大学学报*, 2006, 15(1): 65–70]
- Chen XJ. *Fishery resources and fisheries*. Beijing: China Ocean Press, 2004, 169–192 [陈新军. *渔业资源与渔场学*. 北京: 海洋出版社, 2004, 169–192]
- Chen XJ. *Grey system theory in fisheries science*. Beijing: China Agriculture Press, 2003, 1–32 [陈新军. *灰色系统理论在渔业科学中的应用*. 北京: 中国农业出版社, 2003, 1–32]
- Chen YY, Chen XJ. Influence of El Nino/La Nina on the abundance index of skipjack in the Western and Central Pacific Ocean. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(1): 113–120 [陈洋洋, 陈新军. 厄尔尼诺/拉尼娜现象对中西太平洋鲣资源丰度的影响. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(1): 113–120]
- Duan DY, Chen P, Chen XJ, *et al.* The construction of biomass forecasting model for the anchoveta (*Engraulis ringens*) by the grey system model. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(2): 284–290 [段丁毓, 陈芑, 陈新军, 等. 基于灰色系统的秘鲁鳀资源量预测模型的构建. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(2): 284–290]
- Fang Z, Chen YY, Chen XJ, *et al.* The grey predict model construction of abundance forecasting for skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the Western and Central Pacific Ocean based on different environmental factors. *Journal of Marine Sciences*, 2018(4): 60–67 [方舟, 陈洋洋, 陈新军, 等. 基于不同环境因子的中西太平洋鲣鱼资源丰度灰色预测模型构建. *海洋学研究*, 2018(4): 60–67]
- Gao X, Chen XJ, Xu W. Forecasting model of the abundance index of winter-spring cohort of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean based on grey system theory. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017, 39(6): 55–61 [高雪, 陈新军, 余为. 基于灰色系统的西北太平洋柔鱼冬春生群资源丰度预测模型. *海洋学报(中文版)*, 2017, 39(6): 55–61]
- Gong Y, Li YK, Chen L, *et al.* A comparative analysis of fatty acid profiles in muscle of *Dosidicus gigas* from different harvest locations in the Eastern Pacific Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 149–156 [贡艺, 李云凯, 陈玲, 等. 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 149–156]
- Guan WJ, Gao F, Chen XJ. Review of the applications of satellite remote sensing in the exploitation, management and protection of marine fisheries resources. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(3): 440–449 [官文江, 高峰, 陈新军. 卫星遥感在海洋渔业资源开发、管理与保护中的应用. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(3): 440–449]
- He SM. *Finance and economics dictionary*. Beijing: China Financial and Economic Publishing House, 1990 [何盛明. *财经大辞典*. 北京: 中国财政经济出版社, 1990]
- Ichii T, Mahapatra K, Watanabe T, *et al.* Occurrence of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* aggregations associated with the counter current ridge off the Costa Rica Dome during 1997 El Niño and 1999 La Niña. *Marine Ecology-Progress Series*, 2002, 231(1): 151–166
- Liu B, Zhou F, Chen X, *et al.* Spatial variations in beak structure to identify potentially geographic populations of *Dosidicus gigas* in the Eastern Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 2015, 164: 185–192
- Nigmatullin CM, Nesis KN, Arkhipkin AI. A review of the biology of the Jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 2001, 54(1): 9–19
- Rodhouse PG. Managing and forecasting squid fisheries in variable environments. *Fisheries Research*, 2001, 54(1): 3–8
- Taipe A, Yamashiro C, Mariategui L, *et al.* Distribution and concentrations of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fisheries Research* (Amsterdam), 2001, 54(1): 1–32
- Tang YC. *Statistical analysis with R*. Beijing: Higher Education Press, 2008, 260–264 [汤银才. *R语言与统计分析*. 北京: 高等教育出版社, 2008, 260–264]
- Wang JT, Chen XJ, Gao F, *et al.* Fish recruitment forecasting for *Dosidicus gigas* based on multi-environmental factors in the Southeastern Pacific. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1185–1191 [汪金涛, 陈新军, 高峰, 等. 基于环境因子的东南太平洋茎柔鱼资源补充量预报模型研究. *海洋与湖沼*, 2014, 45(6): 1185–1191]
- Wang JT, Chen XJ. Changes and prediction of the fishing ground gravity of skipjack (*Katsuwonus pelamis*) in Western-Central Pacific. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2013, 43(8): 48–52 [汪金涛, 陈新军. 中西太平洋鲣鱼渔场的重心变化及其预测模型建立. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(8): 48–52]
- Wang JT. *Fishery forecasting and stock assessment for commercial oceanic ommastrephid squid*. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2015 [汪金涛. *大洋性经济柔鱼类渔情预报与资源量评估研究*. 上海海洋大学博士学位论文, 2015]
- Wang YG, Chen XJ. *World oceanic economic soft fish resources and their fisheries*. Beijing: China Ocean Press, 2005, 240–264 [王尧耕, 陈新军. *世界大洋性经济柔鱼类资源及其渔业*. 北京: 海洋出版社, 2005, 240–264]
- Wei GN, Chen XJ, Li G. Interannual variation and forecasting of *Ommastrephes bartramii* migration gravity in the Northwest Pacific Ocean. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(4): 573–583 [魏广恩, 陈新军, 李纲. 西北太平洋柔鱼洄游重心年际变化及预测. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(4): 573–583]
- Wei L, Chen XJ, Lei L, *et al.* Comparative study on the forecasting models of squid fishing ground in the northwest Pacific Ocean based on BP artificial neural network. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(3): 450–457 [魏联,

- 陈新军, 雷林, 等. 西北太平洋柔鱼 BP 神经网络渔场预报模型比较研究. 上海海洋大学学报, 2017, 26(3): 450–457]
- Xu B. Spatial and temporal distribution of fishing ground for *Dosidicus gigas* and the relationship between recruitment and environment in the offshore waters of Peru North west Pacific Ocean. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [徐冰. 秘鲁外海茎柔鱼渔场时空分布及资源补充量与环境的关系. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Xu LL, Chen XJ, Wang JT. Inter-annual variation in abundance index of *Dosidicus gigas* off Peru during 2003 to 2012. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(2): 280–286 [许骆良, 陈新军, 汪金涛. 2003–2012 年秘鲁外海茎柔鱼资源丰度年间变化分析. 上海海洋大学学报, 2015, 24(2): 280–286]
- Yu W, Chen XJ. Analysis of environmental conditions and their influence on the abundance of neon flying squid in the Northwest Pacific Ocean. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(15): 5032–5039 [余为, 陈新军. 西北太平洋柔鱼栖息地环境因子分析及其对资源丰度的影响. 生态学报, 2015, 35(15): 5032–5039]
- Yu W. Response mechanism of winter-spring cohort of neon flying squid to the climatic and environmental variability in the Northwest Pacific Ocean. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2016 [余为. 西北太平洋柔鱼冬春生群对气候与环境变化的响应机制研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2016]
- Zhu WT, Chen XJ, Wang JT, et al. Predicting the abundance of Pacific saury based on grey system in the Northwest Pacific. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(6): 13–17 [朱文涛, 陈新军, 汪金涛, 等. 基于灰色系统的西北太平洋秋刀鱼资源丰度预测. 广东海洋大学学报, 2018, 38(6): 13–17]

(编辑 冯小花)

Prediction of Abundance Index of the Humboldt Squid (*Dosidicus gigas*) in the Southeast Pacific Ocean Based on a Grey System-Based Model

YAN Yongbin^{1,3}, CHEN Xinjun^{1,2}, WANG Jintao^{1,2①}, LEI Lin^{1,2}, CHENG Qiqun³

(1. College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries; Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education; Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306; 3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract The Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) is one of the most abundant fisheries resource in the Southeast Pacific Ocean. It has become an important component of China's offshore fisheries due to its high economic value. Accurate abundance index prediction is important to the rational development and utilization of *D. gigas*. In this study, the correlation analysis and grey system method were used to establish a model (GM) for predicting the abundance of squid in the southeastern Pacific based on fishery data as well as environmental and climatic factors, including Sea Surface Temperature (SST), Pacific Decadal Oscillation (PDO), Oceanic Nino Index (ONI), and Chlorophyll concentration *a* (Chl *a*). The results showed that the SST of the spawning ground in February, the Chl *a* of the spawning ground in March, the PDO in December, and the ONI in October had significant correlations with the abundance of squid. The GM (1, 4) model with SST, PDO, and ONI as independent variables had the highest accuracy (> 85%), which could be used to accurately predict the abundance of *D. gigas* in the Southeast Pacific.

Key words Southeast Pacific Ocean; *Dosidicus gigas*; Grey system; Abundance index

① Corresponding author: WANG Jintao, E-mail: jtwang@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190611001

http://www.yykxjz.cn/

李大命, 唐晟凯, 刘燕山, 谷先坤, 刘小维, 殷稼雯, 张彤晴, 潘建林. 江苏省 4 个太湖新银鱼种群遗传多样性和遗传结构分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 52–60

Li DM, Tang SK, Liu YS, Gu XK, Liu XW, Yin JW, Zhang TQ, Pan JL. Genetic diversity and population structure of four *Neosalanx taihuensis* populations in Jiangsu Province. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 52–60

江苏省 4 个太湖新银鱼种群遗传多样性和遗传结构分析*



李大命 唐晟凯 刘燕山 谷先坤 刘小维
殷稼雯 张彤晴^① 潘建林^①

(江苏省淡水水产研究所 江苏省内陆水域渔业资源重点实验室 南京 210017)

摘要 太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)是我国特有的银鱼种类, 主要分布在长江和淮河中下游及其附属湖泊, 近年来其资源量呈明显下降趋势。为了解太湖新银鱼遗传背景, 本研究采用线粒体细胞色素 b (Cytochrome b, *Cyt b*) 基因序列, 分析了江苏省太湖、高邮湖、洪泽湖和骆马湖 4 个太湖新银鱼野生群体共 144 尾样本的遗传多样性及遗传结构。结果显示, 太湖新银鱼 *Cyt b* 基因序列共发现 29 个变异位点, 定义 25 个单倍型; 平均单倍型多样性(H_d)为 0.682 ± 0.037 , 核苷酸多样性(π)为 0.00231 ± 0.00021 ; 4 个群体中, 高邮湖群体的遗传多样性最高(H_d : 0.609 ± 0.078 ; π : 0.00094 ± 0.00027), 太湖群体的遗传多样性最低(H_d : 0.343 ± 0.107 ; π : 0.00075 ± 0.00033)。分子方差分析(AMOVA)显示, 太湖新银鱼群体间遗传差异(71.53%)大于群体内遗传差异(28.47%), 遗传变异主要来自于群体间。遗传分化指数 F_{st} 值统计检验表明, 骆马湖群体与太湖、高邮湖和洪泽湖群体之间有显著性差异。分子系统树和单倍型网络进化图分析显示, 25 个单倍型形成 2 个明显的地理分支, 一支由太湖群体、高邮湖群体和洪泽湖群体组成, 另一支由骆马湖群体组成。中性检验和错配分布图分析表明, 太湖新银鱼历史上发生过群体扩张。整体来看, 太湖新银鱼野生种群遗传多样性较低, 应加强种质资源保护。建议将太湖、高邮湖群体和洪泽湖群体作为整体进行管理和保护, 骆马湖群体单独管理和保护。

关键词 太湖新银鱼; 细胞色素 b; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)05-0007-09

太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis* Chen, 1956)属于鲑形目(Salmoniformes)、银鱼科(Salangidae)的新银鱼属, 主要分布在黄河、淮河和长江中下游及其附属湖泊, 是我国特有的银鱼种类, 营养丰富, 经济价值较高(解玉浩等, 1997; 倪勇等, 2006)。太湖新银鱼为

一年生小型鱼类, 生长速度快、世代离散, 对环境变化比较敏感, 种群易于波动(王忠锁等, 2002)。近年来, 受围湖造田、过度捕捞、环境污染和生境破碎化等多种不利因素的影响, 我国的银鱼天然资源急剧衰减, 分化范围显著缩小, 个别物种渐危, 银鱼资源

* 江苏省水生生物资源重大专项(ZYHB16-3)和江苏省内陆省管渔业水域渔业资源监测(2018)共同资助 [This work was supported by Major Special Projects of Aquatic Biological Resources in Jiangsu Province (ZYHB16-3), and Fishery Resources Monitoring in Fishery Waters of Inland Provinces in Jiangsu Province (2018)]. 李大命, E-mail: ldm8212@126.com

① 通讯作者: 潘建林, 研究员, E-mail: jianlinpan2006@126.com; 张彤晴, 研究员, E-mail: zhtq3@126.com

收稿日期: 2019-06-11, 收修改稿日期: 2019-07-23

的可持续发展受到严重威胁(王忠锁等, 2002)。

遗传多样性是物种生存与进化的物质基础, 开展鱼类遗传多样性研究可以为种质资源保护和遗传育种提供重要参考(Ward, 2000)。鱼类线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 具有分子小、母系遗传、进化速率快等特点, 是鱼类分子系统学和群体遗传结构研究的理想分子标记(Xiao *et al*, 2000)。细胞色素 b (Cytochrome b, *Cyt b*) 基因是 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因之一, 其结构和功能最为清晰, 且其进化速度适中, 被广泛运用于鱼类遗传多样性和遗传结构研究(张东亚等, 2009; 李大命等, 2015; 蓝昭军等, 2016; 张争世等, 2017; 周华兴等, 2019)。

目前, 太湖新银鱼有关研究主要在营养(林伟信, 1992)、基础生物学(徐桂珍等, 1998)、种群生态(赵丽爽等, 2018)、生殖发育(杨战伟等, 2012)及移植引种(林炯等, 1998)等方面, 而在分子生物学方面的研究较少。张际峰等(2008)测定了大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)和太湖新银鱼线粒体 COII 及 tRNA 基因序列并分析了其亲缘关系。赵亮等(2010)研究了太湖新银鱼线粒体 D-loop 和 *Cyt b* 片段序列结构, 并比较了二者的进化速率。王维维等(2013)对太湖新银鱼 *Cyt b* 基因 PCR 扩增条件进行了优化研究。另外, 已有研究者利用多种分子标记技术研究太湖新银鱼遗传多样性, 比如同工酶(张颖等, 2005)、RAPD(夏德全等, 2007)、AFLP (Kim *et al*, 2007)及线粒体 *Cyt b* (Zhao *et al*, 2008; 罗宏伟等, 2009)和 COI(张迪等, 2012)等, 但对太湖新银鱼种群遗传结构和地理分布格局的研究尚显不足。本研究采集江苏省太湖、高邮湖、洪泽湖和骆马湖 4 个湖泊太湖新银鱼样本, 通过扩增和测定 *Cyt b* 基因序列, 分析太湖新银鱼遗传多样性和遗传结构, 以期管理、保护和开发利用太湖新银鱼种质资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018 年 8~12 月采集太湖、高邮湖、洪泽湖和骆马湖的太湖新银鱼野生群体, 其中, 太湖群体 32 尾, 高邮湖群体 40 尾, 洪泽湖群体 37 尾, 骆马湖群体 35 尾, 共 144 尾样本。从每尾样本剪取肌肉组织, 放入 1.5 ml 离心管中, 加入适量的无水乙醇保存, 带回实验室备用。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

采用 TaKaRa 公司的广谱性基因组 DNA 提取试

剂盒, 提取太湖新银鱼基因组 DNA, 将 DNA 溶于 TE 溶液中, 操作步骤参照试剂盒说明书。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整性, 用核酸蛋白定量仪检测其浓度。

扩增 *Cyt b* 序列的正向引物为 L14321 (5'-CCA GTGACTTGAAAAACCACCG-3'), 反向引物为 H15634 (5'-CTTAGCTTTGGGAGTTAAGGGT-3') (Zhang *et al*, 2007)。PCR 扩增体系为 50 μ l: Premix *Taq* 25 μ l, 上下游引物各 2 μ l (10 μ mol/L), DNA 模板 2 μ l (40 ng/ μ l), 用 ddH₂O 补足至 50 μ l。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环; 最后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 凝胶成像系统拍照。PCR 产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序, 测序采用与 PCR 反应相同的引物。

1.3 数据分析

采用 BioEdit 7.0 软件(Hall, 1999)和 ClustalX 1.81 软件(Thompson *et al*, 1997)对测序结果进行编辑和同源比对。使用 DnaSP 5.0 软件(Liorado *et al*, 2009)统计核苷酸变异位点、单倍型数目、单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(π)。

利用 MEGA 7.0 软件(Kumar *et al*, 2016)统计序列的碱基组成, 计算群体间的 Kimura 双参数模型(K2P)遗传距离, 并构建单倍型建邻接(Neighbor-Joining, NJ)进化树。同时采用 Network 4.6.1.0 软件(Bandelt *et al*, 1999)构建单倍型的简约中介(Reduced-Median, MJ)网络图, 用以检测单倍型之间的进化关系。

使用 Arlequin3.1 软件(Excoffier *et al*, 2010)计算两两群体间的遗传分化指数 F_{st} , 采用 AMOVA 分析检验群体遗传结构, 通过 1000 次重抽样来检验 F_{st} 值的显著性。通过 Tajima's D 检验(Hickerson *et al*, 2007)、Fu's F_s 检验(Fu, 1997)和核苷酸不配对分布(Mismatch distributions)分析来检验太湖新银鱼群体的历史动态, 以确定是否存在瓶颈效应或群体扩张。

2 结果与分析

2.1 *Cyt b* 基因序列变异

测序得到 144 尾太湖新银鱼的 *Cyt b* 基因全序列, 序列长度为 1141 bp。144 条序列中共检测到 29 个变异位点, 总变异率为 2.54%。其中, 单一信息位点有 14 个, 简约信息位点 15 个。变异均为转换或颠换, 转换与颠换的比值为 4.6, 无插入或缺失位点。4 个群体所有个体序列中的 A、C、T 和 G 组成比例为 21.1%、33.5%、28.0%和 17.4%, 其中, 碱基 G 的含

量明显低于其他3种碱基含量,表现出很强的碱基组成偏向性。

2.2 太湖新银鱼群体遗传多样性

基于 *Cyt b* 的太湖新银鱼遗传多样性统计结果见表1。144尾样本共定义了25个单倍型(H1~H25),高邮湖群体拥有最多的单倍型数(9个单倍型),骆马湖群体次之(7个单倍型),太湖和洪泽湖群体拥有的单倍型数相同(均有6个单倍型)。其中,单倍型H3分布于太湖、高邮湖和骆马湖群体,包含76个个体,是数量最多的单倍型。单倍型H7和H9由高邮湖和洪泽湖群体共享,分别包含2和14个个体。单倍型H4和H5为太湖群体特有,单倍型H1、H6、H12、H14、H21和H22为高邮湖群体特有,单倍型H2、H10和H13为洪泽湖群体特有,单倍型H16~H20和H24~H25为骆马湖群体特有。

4个群体的单倍型多样性(H_d)为 $0.343\pm 0.107\sim 0.609\pm 0.078$,核苷酸多样性(π)为 $0.00057\pm 0.00016\sim 0.00094\pm 0.00027$ 。其中,高邮湖群体的遗传多样性最丰富,太湖群体的遗传多样性最低,但均表现出较低的遗传多样性水平。整体来看,太湖新银鱼群体总的单倍型多样性为 0.682 ± 0.037 ,核苷酸多样性为 0.00231 ± 0.00021 。

2.3 太湖新银鱼群体遗传结构

采用 Mega 7.0 软件计算太湖新银鱼群体内和群体间的遗传距离,结果见表2。太湖、高邮湖和洪泽湖群体间的遗传距离均为0.001,与骆马湖群体间的遗传距离均为0.005。

太湖新银鱼群体分子方差分析结果见表3。结果显示,群体间分子变异占71.53%,群体内分子变异占28.47%,分子变异主要发生在群体间。群体间的

遗传分化指数 $F_{st}=0.71531$,且统计检验具有极显著性($P=0.0000$),说明群体间出现了显著的遗传分化。进一步比较两两群体间的遗传分化指数,结果见表2。太湖、高邮湖和洪泽湖群体间的遗传分化指数较小,且统计检验均不显著($P>0.05$),与骆马湖群体间的遗传分化指数较大,且统计检验均极显著($P<0.01$)。

2.4 太湖新银鱼分子系统发育

为更好地了解太湖新银鱼各种群之间的亲缘关系,以近缘物种大银鱼为外类群,采用邻接法对25个单倍型进行系统发育分析,构建分子系统发育树(图1)。从图1可以看出,4个太湖新银鱼群体具有明显的地理遗传结构,形成2个分支:单倍型H1~H14和H21~H23聚为一支,由太湖、高邮湖和洪泽湖群体的个体组成;单倍型H15~H20和H24~H25聚为一支,由骆马湖群体的个体组成。

采用 Network 构建的单倍型最小网络进化图显示(图2),整个进化图呈星状,单倍型H3位于网络结构图的中央。25个单倍型按其所处地理位置演化为两支,一支是由太湖、高邮湖和洪泽湖群体的单倍型组成,另一支由骆马湖群体独有的单倍型组成。网络图进一步支持了系统发育树的分析结果,4个湖泊太湖新银鱼群体形成2个进化单元,且2个单元间缺乏基因交流。

2.5 群体历史动态分析

对4个太湖新银鱼所有个体进行中性检验(表4)和歧点分布图分析(图3)。结果显示,中性检测 Fu's F_s 及 Tajima's D 的值均为负值,且检验统计结果均具有显著性差异($P<0.05$),同时,歧点分布图呈单峰形,表明4个太湖新银鱼野生群体在进化过程中经历过种群扩张。

表1 太湖新银鱼群体的遗传多样性
Tab.1 Genetic diversity parameters of four *N. taihuensis* populations

群体 Population	样本数 Size	变异位点数 Variable site	单倍型(个体数) Haplotype(number)	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 π
TH	32	9	H3(26), H4(1), H5(1), H8(1), H11(1), H23(2)	0.343 ± 0.107	0.00075 ± 0.00033
GY	40	13	H1(1), H3(24), H6(1), H7(1), H9(8), H12(2), H14(1), H21(1), H22(1)	0.609 ± 0.078	0.00094 ± 0.00027
HZ	37	7	H2(1), H3(26), H7(1), H9(6), H10(2), H13(1)	0.488 ± 0.091	0.00057 ± 0.00016
LM	35	11	H16(26), H17(1), H18(1), H19(1), H20(1), H24(1), H25(1)	0.449 ± 0.103	0.00092 ± 0.00030
整体 Total	144	29		0.682 ± 0.037	0.00231 ± 0.00021

注: TH: 太湖; GY: 高邮湖; HZ: 洪泽湖; LM: 骆马湖。下同

Note: TH: Tai Lake; GY: Gaoyou Lake; HZ: Hongze Lake; LM: Luoma Lake. The same as below

表 2 太湖新银鱼 *Cyt b* 群体间的遗传分化指数(F_{st})(对角线上方)和群体间的遗传距离(对角线下方)

Tab.2 The fixation index (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among populations of *N. taihuensis*

群体 Population	TH	GY	HZ	LM
TH	—	0.02720	0.04417	0.82820***
GY	0.001	—	-0.00409	0.81425***
HZ	0.001	0.001	—	0.84614***
LM	0.005	0.005	0.001	—

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

表 3 太湖新银鱼群体分子方差分析结果

Tab.3 Results of AMOVA analysis of *N. taihuensis* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分比 Percentage of variation(%)	F_{st}
群体间 Among populations	3	124.528	1.14290	71.53149	0.71531
群体内 Within populations	141	63.680	0.45486	28.46851	
总体 Total	144	188.208	1.59776	100.00	

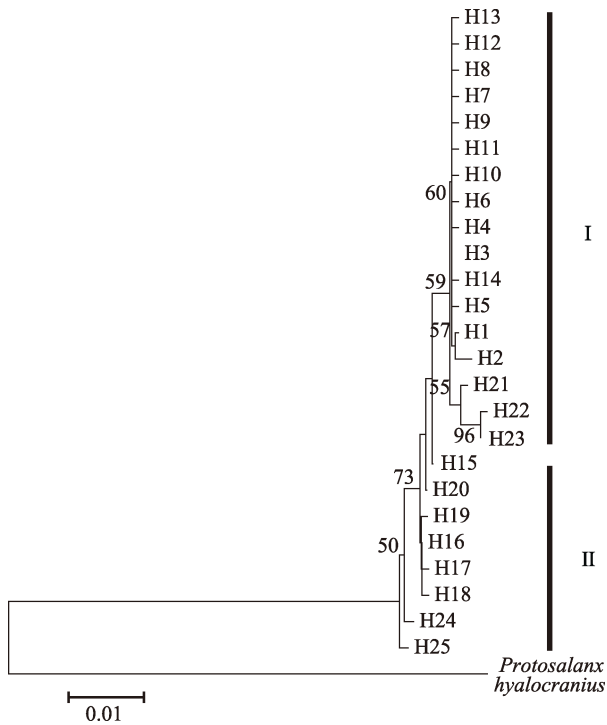


图 1 基于 *Cyt b* 基因构建的太湖新银鱼系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree for *N. taihuensis* based on mitochondrial *Cyt b* gene

表 4 太湖新银鱼群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 中性检验

Tab.4 Neutral test of Fu's F_s and Tajima's D of *N. taihuensis* populations

群体 Population	中性检验 Neutral test			
	Tajima's D	P	Fu's F_s	P
TH	-1.89141	0.00500	-2.04314	0.05800
GY	-2.02718	0.01400	-4.28205	0.00700
HZ	-1.71658	0.03300	-2.71311	0.01900
LM	-1.89633	0.01500	-3.45460	0.02600

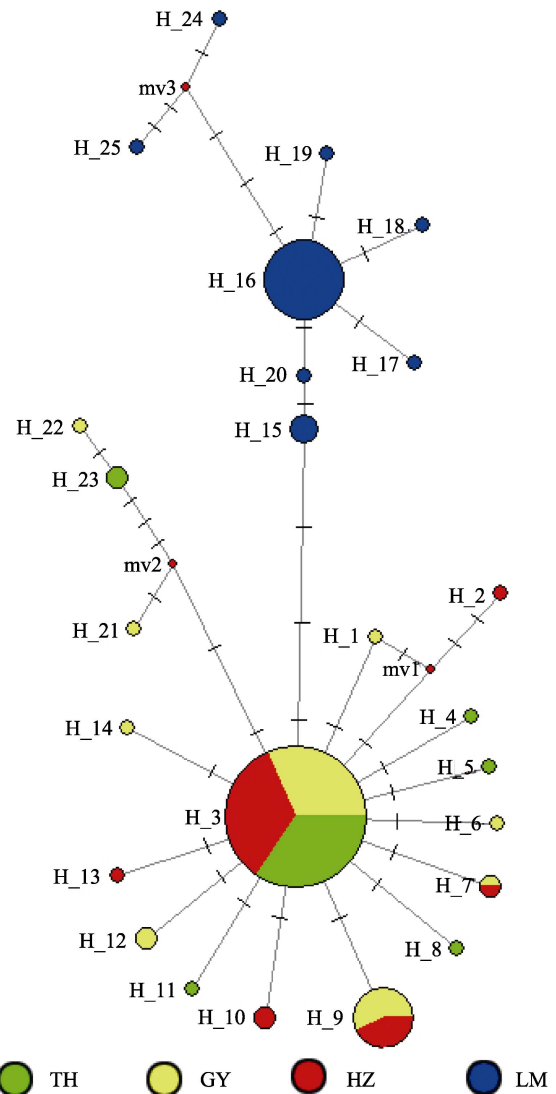


图 2 太湖新银鱼单倍型最小网络进化图

Fig.2 Haplotypes minimum spanning network for *N. taihuensis*

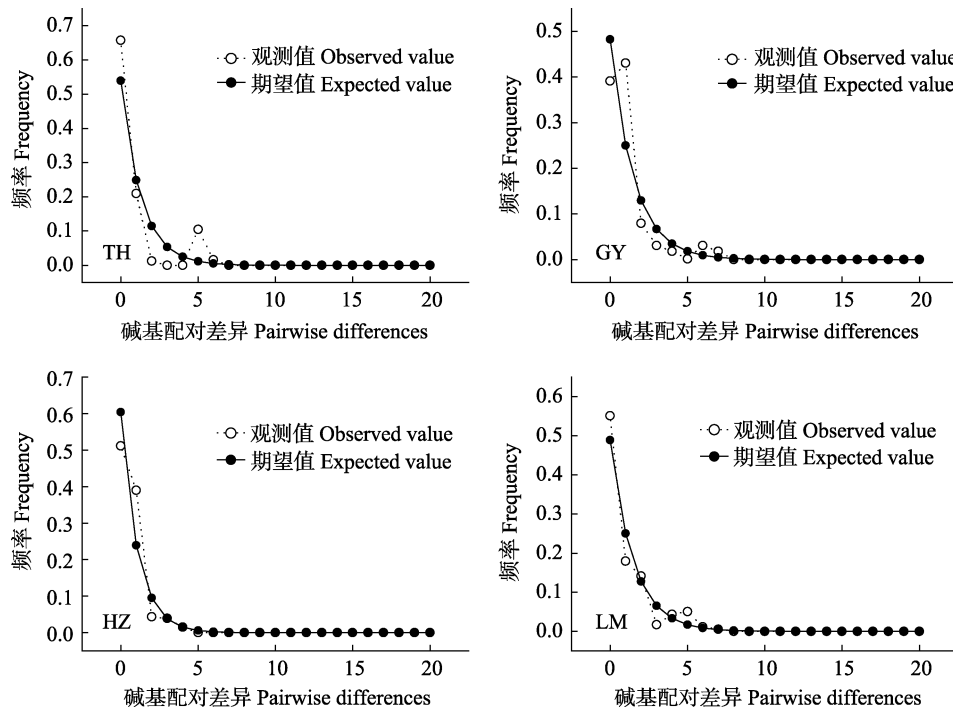


图3 太湖新银鱼歧点分布

Fig.3 Mismatch distributions of *N. taihuensis* populations

3 讨论

3.1 太湖新银鱼种群遗传多样性

遗传多样性是指生物种内和种间遗传变异的总和,是生物进化和物种分化的基础,也是评价种群资源状况的重要依据。一个物种的遗传多样性水平越高,其进化潜力及适应环境能力也越强。单倍型多样性和核苷酸多样性是评价物种遗传多样性的两个重要参数。按照 Grant 等(1998)提出的标准,单倍型多样性以 0.5 为临界值,核苷酸多样性以 0.005 为临界值,二者的值越大,群体的多样性程度越高。本研究中,4 个太湖新银鱼群体的单倍型多样性为 0.343±0.107~0.609±0.078,核苷酸多样为 0.00057±0.00016~0.00094±0.00027。除高邮湖群体外,其他 3 个群体的单倍型多样性均低于 0.5,且 4 个群体的核苷酸多样性均远小于 0.005,表明太湖新银鱼遗传多样性处于较低水平,这也反映了银鱼资源趋于枯竭的现状,导致银鱼有效种群数量减少,遗传多样性水平较低。近年来,受过度捕捞、环境污染、栖息地破坏等多种因素的影响,江苏省湖泊银鱼野生资源严重衰退,已无法形成渔汛,失去捕捞价值(倪勇等, 2006),与本实验室多年调查结果一致(数据未给出)。从整体来看,4 个群体总的单倍型多样性为 0.682±0.037,核苷酸多样性为 0.00231±0.00021,属于高单倍型多样性,低核苷酸多样性群体。已有文献报道,我国长江、淮河

和珠江水系太湖新银鱼群体总的遗传多样性(H_d : 0.713±0.022; π : 0.0022±0.0001),其中,太湖群体的单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.798±0.039 和 0.0028±0.0002,洪泽湖群体的单倍型和核苷酸多样性分别为 0.686±0.088 和 0.0021±0.0003)(Zhao *et al*, 2008)。比较发现,江苏省 4 个湖泊太湖新银鱼群体遗传多样性低于全国水平,且太湖和洪泽湖群体的遗传多样性下降明显,表明太湖新银鱼种质资源下降趋势尚无改变。另外,与其他银鱼种类遗传多样性相比,如三峡库区大银鱼(H_d : 0.804±0.032; π : 0.00146±0.00009)(罗宏伟等, 2009)、乔什新银鱼(*Neosalanx jordani*)(H_d : 0.590±0.047; π : 0.00088±0.00011)(赵亮等, 2010)、白肌银鱼(*Leucosoma chinensis*)(H_d : 0.888; π : 0.0990)(黄小彧等, 2012)、居氏银鱼(*Salanx curvieri*)(H_d : 0.967; π : 0.006)(司从利等, 2012)和黑龙江流域大银鱼(H_d : 0.827±0.038; π : 0.00202±0.00028)(Tang *et al*, 2008)等,江苏省 4 个湖泊太湖新银鱼遗传多样性明显低于大银鱼、白肌银鱼及居氏银鱼,仅高于乔氏新银鱼。因此,必须加强太湖新银鱼资源的保护力度,增加其种群数量,提高其遗传多样性水平,以避免太湖新银鱼种质资源的进一步衰退。

3.2 太湖新银鱼种群的历史动态

鱼类遗传多样性与其进化历史密切相关,可以利用单倍型多样性和核苷酸多样性来估计种群的进化

历史, 当 $H_d \geq 0.5$ 、 $\pi < 0.5\%$ 时, 是受瓶颈效应后种群数量的迅速扩张导致; 当 $H_d \geq 0.5$ 、 $\pi \geq 0.5\%$ 时, 表示种群稳定, 具有比较悠久的进化历史; 当 $H_d < 0.5$ 、 $\pi \geq 0.5\%$ 时, 种群经历了轻微的瓶颈效应, 几乎没有影响到核苷酸变异; 当 $H_d < 0.5$ 、 $\pi < 0.5\%$ 时, 表明种群近期经历了瓶颈效应(Grant *et al*, 1998)。本研究中, 高邮湖群体的单倍型多样性 > 0.5 , 而核苷酸多样性 $< 0.5\%$, 属于高单倍型多样性、低核苷酸多样性的进化模式, 与文献报道的我国珠江、淮河和长江流域太湖新银鱼遗传多样性模式一致(Zhao *et al*, 2008)。出现这种多样性模式, 可能是群体受到瓶颈效应后种群迅速扩张所导致的结果。在群体扩张过程中, 随着种群数量的急剧增加, 导致单倍型多样性增加, 而核苷酸的变异速率较低, 没有足够的时间来积累核苷酸变异, 因为核苷酸多样性的积累时间比单倍型多样性的积累时间要漫长得多(范启等, 2014; 蓝昭军等, 2016)。其他 3 个太湖新银鱼群体单倍型多样性和核苷酸多样性都较低, 表明群体最近经历过瓶颈效应或受奠基者效应的影响所致。

利用中性检验和核苷酸歧点分布推测种群经过的历史。若 Fu's F_s 和 Tajima's D 呈负值, 并且在统计学上有较显著的标准, 则说明序列中含有比中性进化模型更多的核苷酸位点变化, 可能预示着种群经历过扩张历史(Fu, 1997; Hickerson *et al*, 2007)。歧点分布曲线呈泊松状分布的单峰, 说明种群趋于发生了瓶颈效应或者种群扩张(Barbosa *et al*, 2013)。中性检测结果显示(表 4), 4 个太湖新银鱼群体的 Fu's F_s 和 Tajima's D 的值为负值, 且显著偏离中性检验; 同时, 歧点分布图均呈明显的单峰形(图 3), 表明 4 个太湖新银鱼野生群体发生过历史扩张。

3.3 太湖新银鱼种群遗传结构

研究群体遗传结构不仅可以用于评价物种群体的变异水平和不同地理群体之间的关系, 还可以确定群体中的进化显著单元和管理单元, 以及制定资源的保护和管理策略(O'Brien, 1994)。遗传分化系数(F_{st}) 是反映不同地理种群间遗传分化的重要指标。Wright(1990)认为, 若种群 F_{st} 为 0~0.05, 则表明其各种群间不存在分化; 若 F_{st} 为 0.05~0.15, 则表明其各种群间存在中度分化; 若 F_{st} 为 0.15~0.25, 则为高度分化。AMOVA 结果显示, 太湖新银鱼群体间变异占比为 71.53%, 群体内变异占比为 28.47%, 群体间变异是遗传变异的主要来源。4 个群体间的遗传分化指数及其统计结果表明, 太湖、高邮湖和洪泽湖群体间没有出现显著遗传分化, 但均与骆马湖群体存在高度

遗传分化, 这说明 4 个太湖新银鱼群体分为 2 个进化类群, 其中一个类群由太湖、高邮湖和洪泽湖群体组成, 另一个类群由骆马湖群体组成, 这与单倍型 NJ 进化树和最小网络进化图的分析结果相一致。从单倍型组成看, 太湖、高邮湖和洪泽湖群体拥有共享单倍型, 且该单倍型为占比最高的优势单倍型, 表明 3 个群体间存在广泛的基因交流; 而骆马湖群体则全部由独享单倍型个体组成, 与其他 3 个群体缺乏基因交流, 形成了明显的地理遗传结构。

一般来说, 鱼类的遗传分化格局与其分布的水系格局吻合: 流域之间存在明显的种群分化, 同一流域内的种群通常分化不明显或没有遗传分化(Perdices *et al*, 2005; Hashiguchi *et al*, 2006; Xia *et al*, 2006)。从地理分布来看, 太湖属于长江水系, 高邮湖、洪泽湖和骆马湖则属于淮河水系。本研究结果说明, 太湖新银鱼种群遗传分化格局与现有水系的分布格局明显不吻合, 这与太湖新银鱼和乔什新银鱼的研究结果类似(Zhao *et al*, 2008; 赵亮等, 2010)。因此, 太湖新银鱼群体遗传结构可能与其进化历史有密切关系(Zhao *et al*, 2008)。研究表明, 银鱼最早可能起源于第三纪中期, 地质史上的重大事件, 尤其是第四纪冰期和间冰期气候的交替变化, 导致银鱼栖息地数度隔离和连接, 从而对银鱼的进化分化过程造成了重大影响。在冰期和间冰期的交替变化过程中, 银鱼的生境不断扩展, 生境异质性不断提高, 逐渐分化、进化成现今的银鱼遗传格局(张广学, 1993; Zhao *et al*, 2008)。由单倍型最小进化网络图(图 2)可以看出, 单倍型 H3 是太湖、高邮湖和洪泽湖群体的祖先单倍型, 单倍型 H16 是骆马湖群体的祖先单倍型。随着最后一次冰期结束, 气候变暖, 海平面上升, 太湖新银鱼的分布区扩大, 种群开始扩张, 逐渐产生不同的周单倍型, 形成现今的遗传结构模式。

3.4 太湖新银鱼种质资源保护

太湖新银鱼是我国特有的银鱼种类, 属于典型的 r -对策者, 其种群易波动, 对生态环境要求高(王忠锁等, 2002)。本研究对江苏省 4 个湖泊太湖新银鱼野生群体遗传多样性进行研究, 结果表明, 4 个群体的遗传多样性处于较低水平, 应当采取措施, 加强太湖新银鱼各群体的种质资源保护力度。比如, 严格控制捕捞强度, 加强环境保护, 延长禁渔期等, 保证太湖新银鱼种群生殖繁衍和资源恢复。根据 4 个太湖新银鱼群体的遗传结构, 建议将太湖、高邮湖和洪泽湖群体作为一个整体进行管理和保护, 骆马湖群体单独进行管理和保护。本研究初步反映了太湖新银鱼的遗传背

景、遗传结构及遗传变异水平,后续可以通过利用多种分子标记技术如 SSR、SNP 等联合分析,更全面地为太湖新银鱼资源的保护和合理开发提供理论依据。

致谢: 感谢江苏省太湖渔业管理委员会办公室、江苏省高宝-邵伯湖渔业管理委员会办公室、江苏省洪泽湖渔业管理委员会办公室和江苏省骆马湖渔业管理委员会办公室对样品采集提供的帮助。

参 考 文 献

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl AA. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(1): 37–48
- Barbosa AM, Real R, Muñoz AR, *et al.* New measures for assessing model equilibrium and prediction mismatch in species distribution models. *Diversity and Distributions*, 2013, 19(10): 1333–1338
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10: 564–567
- Fan Q, He SP. The pattern of upper and middle Yangze drainages shapes the genetic structure and diversity of *Hemiculter leucisculus* revealed by mitochondrial DNA locus. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 627–635 [范启, 何舜平. 长江流域种群遗传多样性和遗传结构分析. 长江流域种群遗传多样性和遗传结构分析. 水生生物学报, 2014, 38(4): 627–635]
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925
- Grant WAS, Bowen BW. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415–426
- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95–98
- Hashiguchi Y, Kado T, Kimura S, *et al.* Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae), in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. *Zoological Science*, 2006, 23(4): 309–322
- Hickerson MJ, Meyer CP. Testing comparative phylogeographic models of marine vicariance and dispersal using a hierarchical Bayesian approach. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 8(3): 322–340
- Huang XY, Zhang Q, Si CL, *et al.* Genetic diversity analysis of *Leucosoma chinensis* based on mtDNA Cytb gene sequences. *Jiangsu Agricultural Science*, 2012, 40(4): 45–48 [黄小彧, 章群, 司从利, 等. 基于细胞色素 b 基因的白肌银鱼遗传多样性. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 45–48]
- Kim JK, Kai Y, Nakabo T. Genetic diversity of *Salanx ariakensis* (Salangidae) from Korea and Japan inferred from AFLP. *Ichthyological Research*, 2007, 54(4): 416–419
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, *et al.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874
- Lan SJ, Li Q, Shu H, *et al.* Genetic diversity and structure of *Spiinibarbus holiandi* based on nucleotide sequences of mtDNA cytochrome b gene. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(6): 1158–1165 [蓝昭军, 李强, 舒琥, 等. 基于线粒体细胞色素 b 基因的光倒刺鲃遗传多样性与遗传结构研究. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1158–1165]
- Li DM, Zhang TQ, Tang SK, *et al.* Genetic polymorphism of mitochondrial DNA cytochrome b (*cytb*) sequences of *Protosalanx chinensis* in Lake Taihu. *Jiangsu Journal of Agricultural of Sciences*, 2015, 31(4): 840–845 [李大命, 张彤晴, 唐晟凯, 等. 太湖大银鱼(*Protosalanx chinensis*)细胞色素 b 基因序列多态性分析. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 840–845]
- Lin J, Xu RW, Wu ZX, *et al.* On removal of food and distribution of *Neosalanx taihuensis* Chen in Qiandao Lake. *Journal of Zhejiang College of Fisheries*, 1998, 17(1): 59–62 [林炯, 徐如卫, 吴振兴, 等. 千岛湖中太湖新银鱼的移驯及其饵料与分布特性的初步研究. 浙江水产学院学报, 1998, 17(1): 59–62]
- Lin WX. Amino acid contents of tissues of *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodontis*. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(1): 71–74 [林信伟. 太湖新银鱼和寡齿新银鱼组织内氨基酸的含量. 水产学报, 1992, 16(1): 71–74]
- Liorado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452
- Luo HW, Duan XB, Wang K, *et al.* Genetic polymorphism analysis of mitochondrial DNA cytochrome b sequences of three species of salangids in the Three Gorges Reservoir. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(6): 16–21 [罗宏伟, 段辛斌, 王珂, 等. 三峡库区 3 种银鱼线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列多态性分析. 淡水渔业, 2009, 39(6): 16–21]
- Ni Y, Wu HL. *Fishes of Jiangsu Province*. Beijing: China Agriculture Press, 2006, 32–38 [倪勇, 伍汉霖. 江苏鱼类志. 北京: 中国农业出版社, 2006, 32–38]
- O'Brien SJ. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(13): 5748–5755
- Perdices A, Sayanda D, Coelho MM. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 37(3): 920–927
- Si CL, Zhang Q, Huang XY, *et al.* Genetic diversity of *Salanx curvieri* in south China inferred from mtDNA cytb

- sequences. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1): 1–6 [司从利, 章群, 黄小或, 等. 基于细胞色素 b 基因序列分析的华南居氏银鱼遗传多样性研究. *海洋渔业*, 2012, 34(1): 1–6]
- Tang FJ, Li DM, Liu W, *et al.* Evolutionary tendency of clearhead icefish *Protosalanx hyalocranius* inferring mitochondrial DNA variation analyses in Amur (Heilongjiang) River catchment, China. *International Journal of Agriculture and Biological*, 2008, 20(10): 2329–2334
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882
- Wang WW, Zhao L, Wei XS. Optimization of PCR amplification conditions of mitochondrial Cytb gene of *Neosalanx taihuensis*. *Journal of Suzhou University*, 2013, 28(1): 71–73 [王维维, 赵亮, 位晓三. 太湖新银鱼线粒体 Cytb 基因 PCR 扩增条件的优化. *宿州学院学报*, 2013, 28(1): 71–73]
- Wang ZS, Fu CZ, Lei GC. Biodiversity of Chinese icefishes (Salangidae) and their conserving strategies. *Biodiversity Science*, 2002, 10(4): 416–424 [王忠锁, 傅萃长, 雷光春. 中国银鱼的多样性及其保护对策. *生物多样性*, 2002, 10(4): 416–424]
- Ward RD. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 2000, 420(1): 191–201
- Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Bulletin of Mathematical Biology*, 1990, 52(1-2): 241–295
- Xia DQ, Cao Y, Wu TT. Study on lineages of *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodont* in Taihu Lake with RAPD technique. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(1): 12–15 [夏德全, 曹莹, 吴婷婷. 用 RAPD 方法分析太湖大银鱼、太湖新银鱼和寡齿的亲缘关系. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 12–15]
- Xia YZ, Chen YY, Sheng Y. Phylogeographic structure of lenok (*Brachymystax lenok* Pallas) (Salmoninae, Salmonidae) populations in water systems of eastern China, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Studies*, 2006, 45(2): 190–200
- Xiao WH, Zhang YP. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384–391
- Xie YH, Xie H. Classification, distribution, and population ecology of Salangidae fishes. *Chinese Journal of Fisheries*, 1997, 10(2): 11–19 [解玉浩, 解涵. 银鱼科鱼类的分类分布和种群生态. *水产学杂志*, 1997, 10(2): 11–19]
- Xu GZ, Hu B, Bao CH, *et al.* The experiment in biological habit of Salangid in Dongpu Reservoir and its multiplication. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 1998(4): 383–385 [徐桂珍, 胡波, 鲍传和, 等. 董铺水库太湖新银鱼生物学及其增殖试验. *安徽农业科学*, 1998(4): 383–385]
- Yang ZW, Li ZJ, Liu JS, *et al.* A comparative study on reproductive characteristics of different spawning stocks of the icefish (*Neosalanx taihuensis*) in the Danjiangkou Reservoir. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 58–62 [杨战伟, 李钟杰, 刘家寿, 等. 丹江口水库太湖新银鱼不同繁殖群体的繁殖特征比较. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 58–62]
- Zhang D, Lei GC, Gong C, *et al.* Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial COI sequences. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(2): 299–306 [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 COI 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性. *湖泊科学*, 2012, 24(2): 299–306]
- Zhang DY, Wang CQ, Liu SP, *et al.* Population genetic structure analysis of endangered species *Placocheilus cryptonemus* in the Nujiang River based on Cyt b sequences of mtDNA. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(4): 477–486 [张东亚, 汪登强, 刘绍平, 等. 怒江濒危鱼类缺须盆唇鱼基于线粒体 Cytb 序列的群体遗传结构分析. *中国水产科学*, 2009, 16(4): 477–486]
- Zhang GX. Scientific treatise on systematic and evolutionary zoology (Vol 2). Beijing: China Science and Technology Press, 1993, 65–67 [张广学. 系统进化动物学论文集(第二集). 北京: 中国科学技术出版社, 1993, 65–67]
- Zhang J, Li M, Xu MQ, *et al.* Molecular phylogeny of icefish Salangidae based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with comments on estuarine fish evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2007, 91(2): 325–340
- Zhang JF, Hao PY, Nie LW, *et al.* Studies on the analysis of sequences of COII and its connected tRNA genes of mitochondrial genome from 2 species of salangidae and their phylogenetic relationship. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(3): 424–428 [张际峰, 郝培应, 聂刘旺, 等. 2 种银鱼线粒体 COII 及侧翼 tRNA 基因的测定分析及其亲缘关系研究. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(3): 424–428]
- Zhang Y, Dong S, Wang Q, *et al.* The isozyme genetic structures in large icefish (*Protosalanx hyalocranius*) and Taihu Lake icefish (*Neosalanx taihuensis*). *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(2): 111–115 [张颖, 董仕, 王茜, 等. 大银鱼和太湖新银鱼同工酶遗传组成的研究. *大连水产学院学报*, 2005, 20(2): 111–115]
- Zhang ZS, Hu JB, Ye XY, *et al.* Genetic diversity of the pregnant's schizothoracin (*Schizothorax prenati*) based on partial mtDNA cytb sequences. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 609–616 [张争世, 胡冰洁, 叶祥益, 等. 基于 mtDNA Cyt b 序列分析齐口裂腹鱼群体遗传多样性. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 609–616]
- Zhao L, Xie BG, Liu ZJ, *et al.* Molecular structure and DNA substitution rate of the mitochondrial control region and cytochrome b in Taihu salangid, *Neosalanx taihuensis*. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 27–38 [赵亮, 谢本贵, 刘志瑾, 等. 太湖新银鱼线粒体 D-loop 和 Cyt b 片段序列结构与进化速率比较. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 27–38]

- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Complex population genetic and demographic history of the *Salangid*, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome b sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(5): 201
- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Neosalanx jordani* based on cytochrome b sequences. *Biodiversity Science*, 2010, 18(3): 251–26 [赵亮, 张洁, 刘志瑾, 等. 乔氏新银鱼基于细胞色素 *b* 序列的种群遗传结构和种群历史. 生物多样性, 2010, 18(3): 251–261]
- Zhao LS, Cheng F, Zhang L, *et al.* Growth, mortality and evaluation of resource utilization for two salangidae, *Protosalanx hyalocranius* and *Neosalanx taihuensis* in Hongze Lake. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2018, 42(2): 240–249 [赵丽爽, 程飞, 张磊, 等. 洪泽湖大银鱼和太湖新银鱼的生长、死亡参数及资源利用状况. 水生生物学报, 2018, 42(2): 240–249]
- Zhou HX, Hu YT, Duan GQ, *et al.* Population genetic analyses of *Acrossocheilus wenchowensis* in Xin'an Basin based on the mitochondrial DNA cytochrome b gene. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 43–50 [周华兴, 胡玉婷, 段国庆, 等. 基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的新安江流域温州光唇鱼群体遗传研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 43–50]

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity and Population Structure of Four *Neosalanx taihuensis* Populations in Jiangsu Province

LI Daming, TANG Shengkai, LIU Yanshan, GU Xiankun, LIU Xiaowei, YIN Jiawen, ZHANG Tongqing^①, PAN Jianlin^①

(Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Key Laboratory of Fisheries Resources in Inland Water of Jiangsu Province, Nanjing 210017)

Abstract *Neosalanx taihuensis* is an icefish endemic to China and mainly distributed in the middle and lower reaches of the Yangtze and Huaihe rivers and affiliated lakes. In recent years, the natural resources of this species have declined markedly. To assess the genetic diversity and genetic structure of wild populations of *N. taihuensis*, we amplified and sequenced mitochondrial *cyt b* gene sequences from 144 individuals from four lakes [Tai Lake (TH), Gaoyou Lake (GY), Hongze Lake (HZ) and Luoma Lake (LM)] in Jiangsu Province. The results detected 29 polymorphic nucleotide sites and 25 haplotypes among the *cyt b* sequences of the 144 individuals. Haplotype diversity was 0.682 ± 0.037 , and nucleotide diversity was 0.00231 ± 0.00021 . The GY population showed the highest genetic diversity among the four populations and the TH population the lowest. Analysis of molecular variance showed that 71.53% of the molecular variation was among populations and 28.47% was within populations, with the molecular variation originating mainly from interpopulation differences. A pairwise fixation index (F_{st}) revealed significant differences between the LM population and the TH, GY, and HZ populations, and no significant differences among the TH, GY, and HZ populations. A phylogenetic tree and a minimum spanning network showed that the 25 haplotypes form two distinct geographical clades: one consisting of the TH, GY, and HZ populations, and the other consisting of the LM population. The results of a neutrality test showed that the values of Tajima's D and Fu's F_s were negative, and had significant differences. The mismatch distribution was unimodal, which indicated that the four *N. taihuensis* populations had experienced population expansion. As the genetic diversity of the *N. taihuensis* populations is low, measures to protect its wild resources are warranted. The TH, GY, and HZ populations should be protected and managed as a whole population and the LM population as a distinct population.

Key words *Neosalanx taihuensis*; *Cyt b*; Genetic diversity; Genetic structure

① Corresponding author: PAN Jianlin, E-mail: jianlinpan2006@126.com; ZHANG Tongqing, E-mail: zhtq3@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190515002

http://www.yykxjz.cn/

姜燕, 徐永江, 于超勇, 柳学周, 王滨, 郑炜强, 官曙光, 史宝, 陈佳, 柯巧珍. 大黄鱼消化道菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 61–72

Jiang Y, Xu YJ, Yu CY, Liu XZ, Wang B, Zheng WQ, Guan SG, Shi B, Chen J, Ke QZ. Analysis of microbiota structure, digestive enzyme and nonspecific immune enzyme activity in the gastrointestinal tract of large yellow croaker. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 61–72

大黄鱼消化道菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力分析*



姜 燕^{1,2} 徐永江² 于超勇³ 柳学周^{1,2①} 王 滨²
郑炜强¹ 官曙光³ 史 宝² 陈 佳¹ 柯巧珍¹

(1. 大黄鱼育种国家重点实验室 宁德市富发水产有限公司 宁德 352103; 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 青岛 266071;
3. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104)

摘要 为研究大黄鱼(*Larimichthys crocea*)消化道的菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力特征,本研究采用高通量测序技术系统分析大黄鱼胃、幽门盲囊和肠道中菌群组成及分布,并对比研究工厂化养殖和网箱养殖模式下的消化道菌群;同时,结合生化分析方法解析2种模式下消化道消化酶和非特异性免疫酶活力特征。结果显示,2种养殖模式下,菌群多样性随消化道延伸呈下降趋势;乳杆菌科(Lactobacillaceae(f))、*Fructobacillus*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)等代表的菌属为共有优势菌群。其中,拟杆菌属(*Bacteroides*)和 *Anaerostipes* 等的丰度随消化道延伸呈下降趋势,而乳杆菌科、E01_9C_26_marine_group(o)所代表的菌属及黄杆菌属等则相反;普氏菌属(*Prevotella_9*)、乳杆菌科代表的菌属为2种模式养殖大黄鱼的主要差异菌属。工厂化养殖条件下,幽门盲囊和肠道中的菌群组成及其参与营养和免疫相关代谢通路的基因数目差异不显著($P>0.05$),但与胃部的菌群组成和相关代谢通路基因数目存在明显差异;而网箱养殖大黄鱼胃部与幽门盲囊和肠道的菌群结构及相关代谢通路基因数目差异相对较小。2种养殖模式下的大黄鱼消化道菌群与饲料菌群相近。另外,胃和幽门盲囊也具有非特异性免疫酶活性,说明,整个消化道还具有一定的化学免疫屏障作用。本研究结果将为大黄鱼健康养殖提供基础参考,并为消化道菌群生理功能探讨提供理论依据。

关键词 大黄鱼; 消化道; 菌群; 消化酶; 非特异性免疫酶; 养殖模式

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)05-0008-12

* 中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项资金项目(2019GH15)、大黄鱼育种国家重点实验室开放课题基金(LYC2017RS01)、现代农业产业技术体系专项(CARS-47)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项(20603022018021)、中央引导地方科技发展专项(2017L3019)和福建省科技平台建设项目(2018N2005)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019GH15), Open Research Fund Project of State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding (LYC2017RS01), China Agriculture Research System (CARS-47), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022018021), the Local Science and Technology Development Project Guide by Central Government (2017L3019), and Science and Technology Platform Construction of Fujian Province (2018N2005)]. 姜 燕, E-mail: jiangyan@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2019-05-15, 收修改稿日期: 2019-07-11

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国的重要经济鱼种之一,其产业链为我国带来了巨大的经济效益。据统计,2017年,我国大黄鱼产量为177640 t,是2016年的1.11倍,仅福建省产量高达150542 t,占全国大黄鱼总产量的84.75%(农业农村部渔业渔政管理局等,2018)。可见,福建省是我国大黄鱼重要的养殖产地。但是,随着养殖规模的不断壮大,养殖密度胁迫、养殖用水和饲料质量等各种问题不断涌现,导致大黄鱼养殖病害频发,包括弧菌病、细菌性肠炎病、刺激隐核虫病等在内的细菌性疾病、寄生虫病等病害种类呈现上升趋势,成为限制产业健康持续发展的一大“瓶颈”(杜明洋等,2017)。由于细菌具有种类多、繁殖快、传播途径多样化等特点,因此,养殖过程中仍以细菌性疾病为主。

随着人们对健康、环保意识的不断增强,在对细菌性疾病的治疗方面,疫苗、益生菌等生物防治措施备受关注(Nayak, 2010; Cai *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016)。这些生物产品仍以微生物为主,而消化道内居住着数以万亿计的微生物,其携带的基因数量远超宿主基因组的上百倍,并且可通过结构变化调整自身功能基因在某一代谢通路中的富集,从而在营养、免疫等多方面参与并影响宿主的生理活动(Shabat *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Dwivedi *et al.*, 2017)。同时,消化道菌群的动态平衡是维持消化道健康的一个重要保障,也是菌群协同宿主进行各种生理功能的必要前提。因此,对消化道菌群组成信息、分布特征进行系统分析是后续开展“土著”益生菌筛选、结构有效调控及其机理等相关研究的重要基础。

本研究以工厂化和网箱模式养殖大黄鱼为研究对象,针对其胃、幽门盲囊和肠道中的菌群分布特征、组成信息及其参与营养和免疫相关代谢功能的基因信息进行对比分析,明确消化道菌群结构特征;结合环境菌群信息,解析消化道菌群与环境的关系,以期为大黄鱼养殖产业中消化道菌群的健康调控及病害的有效防控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼样本采集与处理

2018年3月23日,在水温为13℃~16℃的条件下,对宁德市富发水产有限公司养殖的来源于同批苗种的1龄大黄鱼进行实验用鱼样本的采集。其中,工厂化养殖大黄鱼体重为(96.13±38.23) g、体长为(20.75±2.98) cm,养殖密度为60尾/m³;网箱养殖大黄鱼体重为(110.21±31.77) g、体长为(21.08±2.98) cm,

养殖密度为1.5尾/m³。

消化道样本:2种养殖模式分别作为2个实验组,每组分别随机挑选6尾大黄鱼作为实验用鱼,饥饿处理12 h后,采用MS-222(Fluka,美国)麻醉处理。无菌环境下,采用75%酒精擦拭体表,解剖,提取消化道,分离胃、幽门盲囊和肠道组织,去除内容物,采用预冷的灭菌生理盐水冲洗各组织,分装、液氮保存,用于微生物多样性、消化酶和免疫酶活性分析。

水环境样本:分别采集工厂化养殖模式的进水口水样和网箱水样,每种模式采集3次作为3个平行样本,每次通过采水器收集3 L水,采用0.22 μm的滤膜进行真空抽滤,滤膜分装后置于液氮中保存,用于微生物多样性分析。

饲料样本:2种模式养殖大黄鱼均为1龄鱼,投喂的配合饲料完全相同。因此,分别称取3份0.1 g的配合饲料作为3个平行样本,于液氮中保存,用于微生物多样性分析。

1.2 样本微生物总DNA提取与高通量测序

将液氮中保存的样本取出,冰上自然解冻,随机选取3条鱼的消化道作为平行样本,每个消化道组织均匀剪取一部分用于DNA提取,剩余部分用于酶活检测。采用QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN,德国)试剂盒提取组织样本和饲料样本微生物总DNA;采用OMEGA Soil DNA Kit(Omega Bio-Tek,美国)试剂盒提取处理水样所得滤膜的微生物总DNA。共27个生物样本用于微生物总DNA的提取,具体信息见表1。将通过各试剂盒提取的微生物总DNA进行PCR扩增,扩增序列为16s rDNA V3~V4高变区的序列,选取引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,构建文库,通过Illumina MiSeq PE300平台进行高通量测序。

表1 高通量测序生物样本信息
Tab.1 The information of biology samples used for high throughput sequencing

分组 Group	胃 Stomach	幽门盲囊 Pyloric caecum	肠道 Gut	饲料 Feed	水 Water
工厂化模式 Industrialized pattern	✓	✓	✓	✓	✓
网箱模式 Net cage pattern	✓	✓	✓		✓

1.3 消化道样本酶活力检测

将消化道各组织样本分别称重,按1:9(w/v)比例加入适量预冷匀浆液,冰浴条件下采用T 10 Basic S25 (IKA, 德国)组织匀浆机匀浆,4℃ 5000 r/min离心30 min,取上清液,作为粗酶提取液,分别按照南京建成的消化酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)和非特异性免疫酶(酸性磷酸酶ACP、碱性磷酸酶AKP、超氧化物歧化酶SOD、溶菌酶LZM)检测试剂盒说明书测定酶活力。

1.4 数据处理

通过高通量测序获得原始的下机数据,运用Trimmomatic (v 0.35)软件对双端序列去杂、Flash (v 1.2.11)软件拼接(overlap的范围为10~200 bp)、Uchime (v 4.2)去嵌合体序列等一系列处理得到有效序列。采用Vsearch(v 2.4.2)根据序列的相似性,将相似度 $\geq 97\%$ 的序列被归为1个可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU),并选取每个OTU的代表性序列。用RDP Classifier (v 2.2)与Silva数据库(v 123)对OTUs代表序列进行物种注释,保留置信区间 >0.7 的注释结果。采用tax4fun(0.3.1)对微生物组基因参与的KEGG通路进行比对分析。

采用单因素方差分析(One-way ANOVA)对数据进行统计分析,利用Duncan's 检验对同一养殖模式下大黄鱼不同消化道组织间的差异性进行多重比较,采用T-test 检验对不同养殖模式下大黄鱼相同消化道组织进行差异性分析,显著性水平为 $P<0.05$ 。所有数值均采用平均值 \pm 标准误(Means \pm SE)表示。

2 结果

本研究共采集27个生物样本,经高通量测序及对测序数据的一系列处理,共获得916483条Effective tags,经归类操作得到2829个OTUs。

2.1 大黄鱼消化道菌群结构特征

工厂化养殖条件下,大黄鱼消化道中幽门盲囊和肠道菌群chao 1指数(314.44、364.34)和香农指数(6.48、6.23)差异不显著($P>0.05$),但二者均显著低于胃中菌群的多样性指数($P<0.05$)(表2)。说明,菌群多样性伴随大黄鱼消化道的延伸整体呈现下降趋势。

网箱模式下,菌群多样性指数同样随消化道的延伸整体呈现下降趋势。但幽门盲囊和肠道菌群chao 1指数(465.79、327.02)均显著低于胃中菌群的chao 1指数(744.64)($P<0.05$),而香农指数在消化道各部位间

则差异不显著($P>0.05$)(表2)。

表2 2种养殖模式大黄鱼消化道菌群多样性
Tab.2 The gastrointestinal microbiota diversity of large yellow croaker cultured in different patterns

样品 Samples	指数 Indices	
	chao 1	香农指数 Shannon indices
I1YS	823.97 \pm 45.33 ^a	7.32 \pm 0.06 ^a
I1YP	314.44 \pm 43.92 ^b	6.48 \pm 0.27 ^b
I1YG	364.34 \pm 40.73 ^b	6.23 \pm 0.03 ^b
C1YS	744.64 \pm 72.44 ^a	7.18 \pm 0.28
C1YP	465.79 \pm 61.92 ^b	5.36 \pm 1.38
C1YG	327.02 \pm 27.29 ^b	6.28 \pm 0.31

注:不同的上标小写字母表示同一养殖模式下消化道不同部位菌群多样性差异显著($n=3$, $P<0.05$)。I1YS、I1YP和I1YG分别表示工厂化模式养殖大黄鱼胃、幽门盲囊和肠道样品;C1YS、C1YP和C1YG分别表示网箱模式养殖大黄鱼胃、幽门盲囊和肠道样品。下同

Notes: Values with different lowercases differ significantly in the same aquaculture pattern for each index ($n=3$, $P<0.05$). I1YS, I1YP and I1YG represent samples from stomach, pyloric caecum and gut of large yellow croaker cultured in industrialized pattern, while C1YS, C1YP and C1YG represent those of large yellow croaker cultured in net cage. The same as below

由表2可以看出,2种养殖模式下大黄鱼消化道同一部位间的菌群chao 1和香农指数差异均不显著($P>0.05$)。

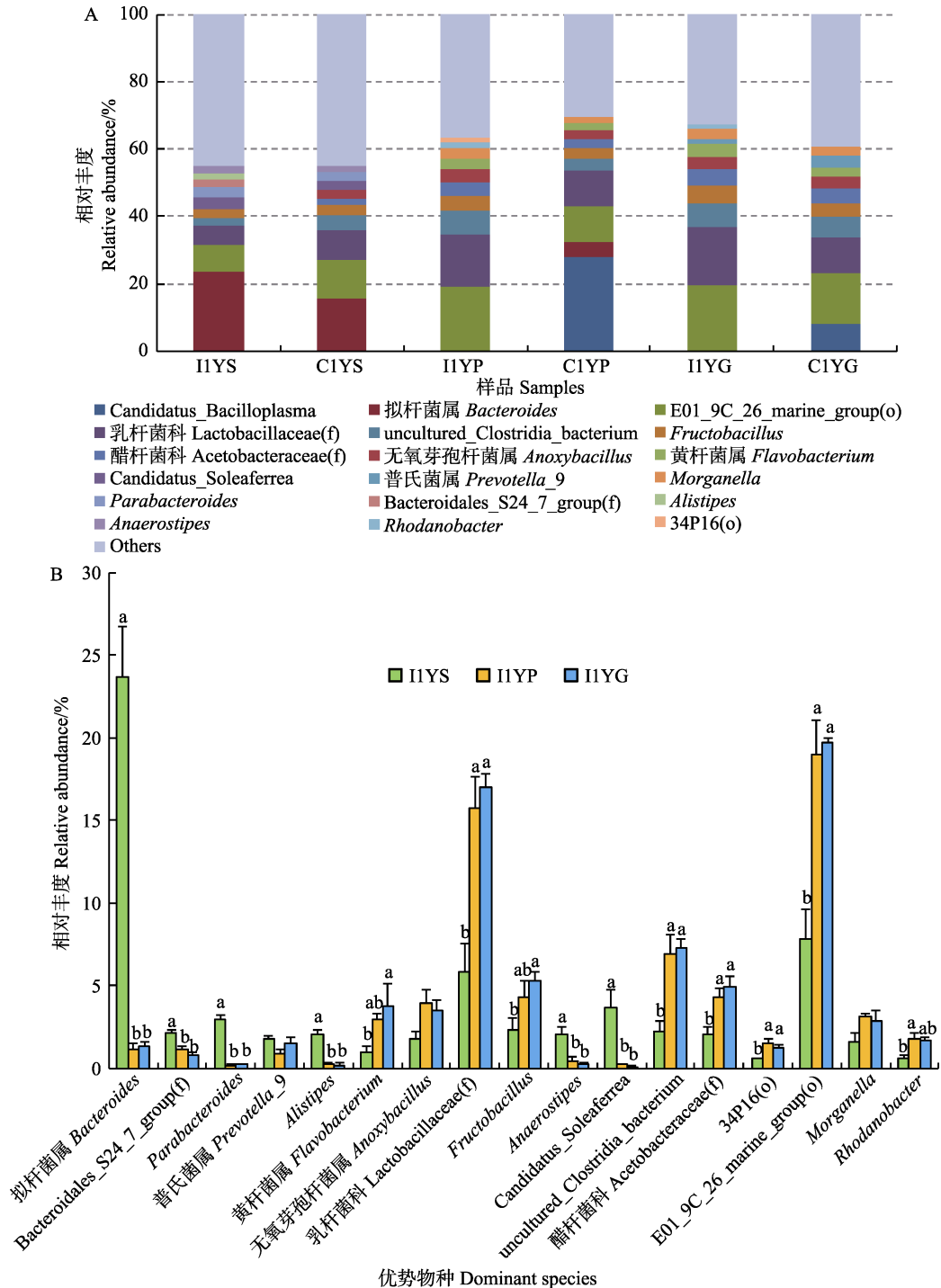
图1A为样本中相对丰度排列前十的优势菌属。工厂化养殖条件下,大黄鱼胃中拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度最高(平均为23.70%),而在幽门盲囊和肠道中的丰度显著下降(1.16%~1.32%) ($P<0.05$); *Bacteroidales_S24_7_group*(f)、*Parabacteroides*、*Alistipes*、*Anaerostipes*、*Candidatus_Soleaferrea*所代表的菌属在胃中的丰度均显著高于其他组织中的丰度($P<0.05$)(图1B)。而乳杆菌科(*Lactobacillaceae*(f))代表的菌属在幽门盲囊和肠道中为优势菌属,其相对丰度显著高于在胃中的丰度($P<0.05$);幽门盲囊和肠道中黄杆菌属(*Flavobacterium*)、*Fructobacillus*、醋杆菌科(*Acetobacteraceae*(f))、E01_9C_26_marine_group(o)等菌属的丰度均显著高于在胃中的丰度($P<0.05$)。可见,工厂化养殖条件下,大黄鱼幽门盲囊和肠道中的菌群结构较为相近,与胃部的存在显著差异。

网箱养殖大黄鱼胃部的最优势菌属依然是拟杆菌属(平均丰度为15.68%),但与工厂化养殖大黄鱼相比,其消化道不同部位间优势菌属差异较小(图1A和

图 1C)。其中,优势菌属中拟杆菌属、*Parabacteroides* 的相对丰度从胃到肠道逐渐降低,在胃部的丰度显著高于在肠道中的丰度($P<0.05$);醋杆菌科代表的菌属则呈相反趋势,肠道中的丰度显著高于胃和幽门盲囊中的丰度($P<0.05$)(图 1C)。乳杆菌科、无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、E01_9C_26_marine_group(o)等优势菌属在消化道不同部位间的丰度接近。

乳杆菌科、*Fructobacillus*、黄杆菌属、E01_9C_26_marine_group(o)、拟杆菌属、*Parabacteroides* 和

Anaerostipes 等所代表的菌属为 2 种模式养殖大黄鱼消化道共有的优势菌群。其中,拟杆菌属、*Parabacteroides* 和 *Anaerostipes* 等所代表的菌属丰度从胃到肠道呈下降趋势,而乳杆菌科、黄杆菌属等代表的菌属则呈相反趋势(图 1A、图 1B 和图 1C)。由图 1D 可以看出,不同模式养殖大黄鱼消化道同一部位间均存在差异显著的菌属($P<0.05$)。其中,优势菌群中的普氏菌属(*Prevotella_9*)、乳杆菌科代表的菌属分别在胃和肠道中差异显著($P<0.05$)。



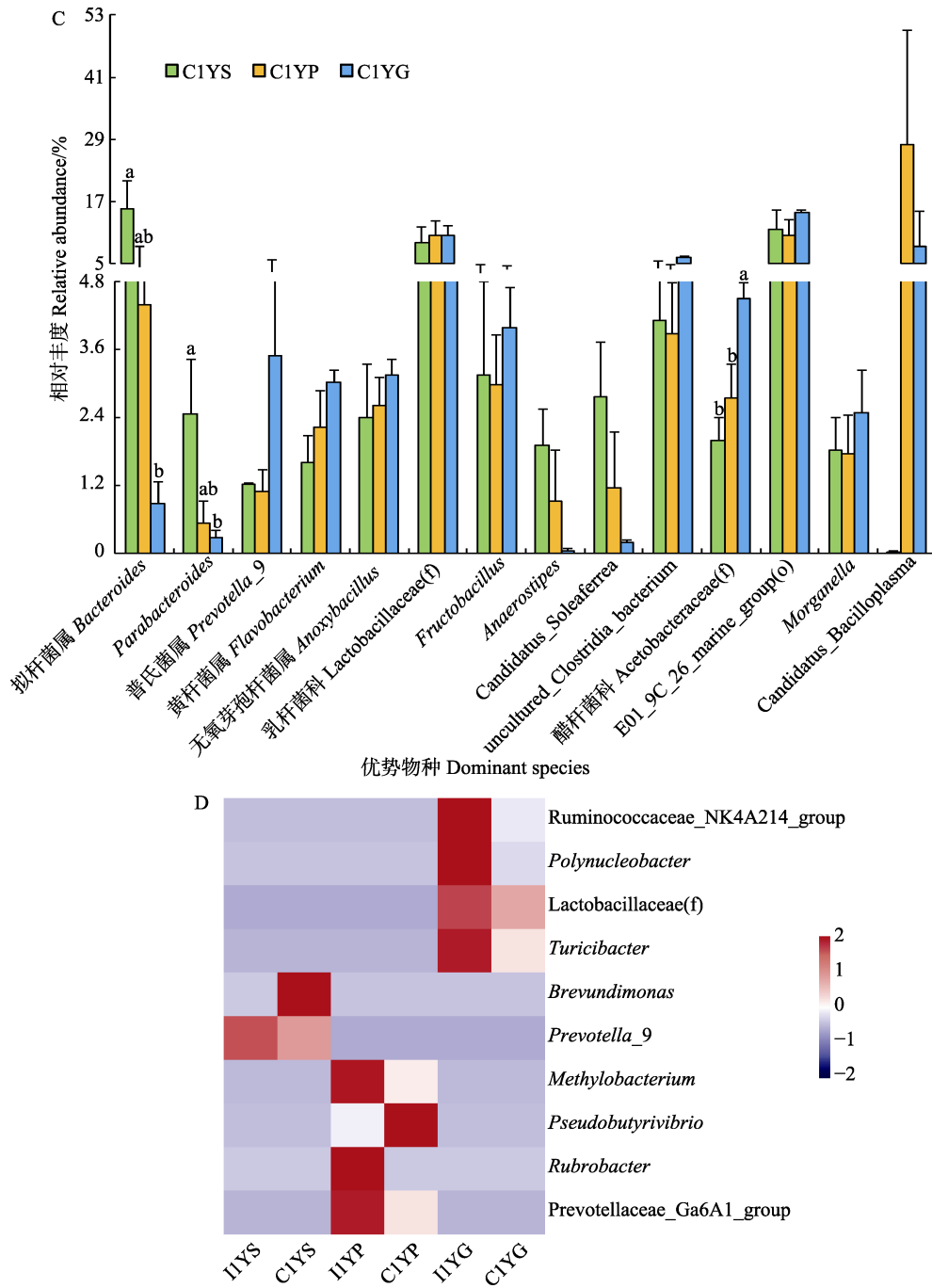


图 1 大黄鱼消化道菌群属水平结构特征(n=3, P<0.05)
 Fig.1 The structural characteristics of microbiota in the gastrointestinal tract of large yellow croaker at the genus level (n=3, P<0.05)

A: 2 种养殖模式下大黄鱼消化道各部位优势菌属组成; B、C: 分别为工厂化和网箱模式下大黄鱼消化道各部位优势菌属的丰度特征; D: 不同养殖模式下大黄鱼同一消化道组织差异菌属
 I1YS、I1YP 和 I1YG 分别表示工厂化模式养殖大黄鱼胃、幽门盲囊和肠道;
 C1YS、C1YP 和 C1YG 分别表示网箱模式养殖大黄鱼胃、幽门盲囊和肠道。下同

A: The composition of dominant microbiota in gastrointestinal tract for large yellow croaker cultured by two patterns;
 B and C: The abundances characteristics of dominant microbiota in different gastrointestinal tract tissues of large yellow croaker cultured in industrialized pattern and net cage, respectively; D: The significantly different genera of the same gastrointestinal tract tissue of large yellow croaker cultured in two different aquaculture patterns
 I1YS, I1YP and I1YG represent stomach, pyloric caecum and gut of large yellow croaker cultured in industrialized pattern, while C1YS, C1YP and C1YG represent those of large yellow croaker cultured in net cage. The same as below

2.2 大黄鱼消化道菌群功能特征

通过 KEGG 分析, 在二级水平下, 对菌群参与

的与营养、免疫功能相关的环境信息处理、新陈代谢、器官系统代谢通路的基因数目进行统计分析(表 3)。

表 3 2 种模式养殖大黄鱼消化道各部位菌群参与各代谢通路的基因丰度
Tab.3 Microbiota gene abundances participating in metabolic pathways in different gastrointestinal tract parts of large yellow croaker cultured in two patterns

代谢通路 Metabolic pathways	样品 Samples					
	胃 Stomach		幽门盲囊 Pyloric caecum		肠 Gut	
	工厂化模式 Industrialized pattern ($\times 10^4$)	网箱模式 Net cage pattern ($\times 10^4$)	工厂化模式 Industrialized pattern ($\times 10^4$)	网箱模式 Net cage pattern ($\times 10^4$)	工厂化模式 Industrialized pattern ($\times 10^4$)	网箱模式 Net cage pattern ($\times 10^4$)
膜转运 Membrane transport	384.48±11.50 ^b	417.59±39.9	512.48±28.64 ^a	338.64±96.69	540.94±4.55 ^a	432.96±40.16
信号转导 Signal transduction	60.01±3.36 ^b	66.17±8.16	87.90±4.41 ^a	55.65±15.39	88.67±1.28 ^a	71.69±6.53
信号分子与交互 Signaling molecules and interaction	5.41±0.11 ^b	5.36±0.20	5.98±0.20 ^a	4.12±1.23	5.89±0.08 ^{ab}	4.91±0.37
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	278.34±5.90 ^b	281.14±13.93	315.37±10.19 ^a	215.30±64.01	315.69±3.10 ^a	265.67±22.30
其他次级代谢产物生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	27.52±0.91	26.25±1.13	27.26±1.22	18.93±5.83	26.45±0.32	22.75±2.12
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	329.06±7.79 ^b	333.83±17.62	371.26±14.60 ^a	254.20±75.48	377.77±3.58 ^a	311.09±27.06
能量代谢 Energy metabolism	165.35±4.46	164.52±7.01	176.46±6.07	122.65±37.20	176.19±1.11	148.76±11.58
酶家族 Enzyme families	63.85±1.31 ^b	65.23±3.71	74.02±2.99 ^a	50.38±14.90	74.62±0.63 ^a	62.09±5.11
多糖生物合成与代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	76.24±1.31	75.05±3.92	83.54±4.33	55.86±16.41	82.89±1.43	69.45±5.56
脂类代谢 Lipid metabolism	90.67±2.13 ^b	93.33±6.42	112.07±3.48 ^a	74.88±21.67	111.54±0.72 ^a	91.58±7.47
辅酶因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	122.94±2.65 ^b	123.75±5.87	136.36±4.75 ^a	93.91±27.95	137.01±0.98 ^a	115.39±8.95
其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids	50.17±1.57 ^b	52.40±4.24	63.63±2.47 ^a	42.15±12.00	64.38±0.81 ^a	52.63±4.23
萜类和聚酮类代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	49.18±0.91 ^b	50.14±2.87	58.17±1.76 ^a	39.47±11.53	58.29±0.47 ^a	48.52±3.73
核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	108.45±2.71 ^b	108.67±4.37	116.02±3.51 ^{ab}	81.52±24.84	117.72±0.72 ^a	100.13±8.53
外源性物质生物降解与代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism	61.05±3.37 ^b	66.01±7.26	88.13±2.12 ^a	57.58±16.18	89.46±0.62 ^a	71.43±5.36
循环系统 Circulatory system	0.26±0.05 ^b	0.28±0.06	0.58±0.07 ^{a*}	0.33±0.11 [*]	0.50±0.04 ^a	0.43±0.04
消化系统 Digestive system	1.50±0.04	1.48±0.09	1.63±0.12	1.09±0.30	1.65±0.08	1.43±0.12
内分泌系统 Endocrine system	8.06±0.35 ^a	7.47±0.44	7.39±0.37 ^{ab}	5.23±1.67	6.92±0.10 ^a	6.35±0.73
环境适应 Environmental adaptation	4.08±0.13 ^b	4.10±0.16	4.48±0.13 ^a	3.10±0.94	4.43±0.04 ^{ab}	3.87±0.42
排泄系统 Excretory system	0.75±0.03 ^b	0.75±0.04	0.86±2.02 ^a	0.56±0.16	0.84±0.01 ^a	0.71±0.09
免疫系统 Immune system	2.28±0.12	2.19±0.10	2.08±0.12	1.52±0.49	2.13±0.03	1.89±0.19
神经系统 Nervous system	2.66±0.19	2.42±0.20	2.08±0.05	1.59±0.55	2.07±0.01	1.83±0.16

注: *表示不同养殖模式下大黄鱼消化道同一组织间菌群参与代谢通路的基因丰度差异显著($n=3, P<0.05$), 不同上标小写字母表示同一养殖模式大黄鱼消化道各部位间菌群参与代谢通路的基因丰度差异显著($n=3, P<0.05$)

Notes: * represents the significant difference between 2 different aquaculture patterns for microbiota gene abundances participating in metabolic pathways of the same large yellow croaker gastrointestinal tract tissue ($n=3, P<0.05$). Values with different lowercase represent the significant difference among different gastrointestinal tract tissues of large yellow croaker that cultured in the same pattern for microbiota gene abundances participating in metabolic pathways ($n=3, P<0.05$)

综合对比发现, 消化道中参与膜转运的菌群基因丰度最高(3386400~5409400), 其次为碳水化合物代谢(2542000~3712600)、氨基酸代谢(2153000~3156900)等。工厂化模式下, 大黄鱼肠道和幽门盲囊中菌群参与膜转运、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢等基因数目均高于胃部, 仅在神经系统、免疫系统和内分泌系统功能方面呈相反趋势。幽门盲囊和肠道的菌群参与的相关代谢通路的基因丰度差异不显著($P>0.05$), 但是二者与胃部的相关基因丰度存在显著差异($P<0.05$)。网箱养殖大黄鱼消化道菌群参与膜转运、氨基酸代谢、碳水化合物代谢和能量代谢等基因数目与其他功能相比依然较多, 但在消化道各部位间的差异均不显著($P>0.05$)。在 2 种养殖模式的对比中发现, 工厂化养殖大黄鱼幽门盲囊中菌群参与循环系统的基因丰度为 5800, 显著高于网箱模式大黄鱼的

相关基因丰度(3300)($P<0.05$), 其他差异均不显著($P>0.05$)。

2.3 大黄鱼消化道菌群与环境菌群的相关性

PCA 分析中, 每一个点代表了 1 个样本中菌群的组成信息, 点与点之间的距离越近表示 2 样本间菌群结构较为相近。幽门盲囊与肠道样本相距较近; 与环境水样本相比, 消化道样本与饵料样本相距较近(图 2A)。说明, 工厂化养殖大黄鱼消化道中幽门盲囊和肠道的菌群组成相似, 均与胃部的菌群组成存在较大差异; 同时, 3 个部位的菌群组成与饲料中的相关性较大。以各平行样本间的共有菌群为基础, 图 2C 显示了工厂化模式下大黄鱼消化道与环境菌群共有及特有菌属情况, 胃与幽门盲囊共有菌属 55 个, 占胃中菌属总量的 28.95%; 而肠道与幽门盲囊共有菌

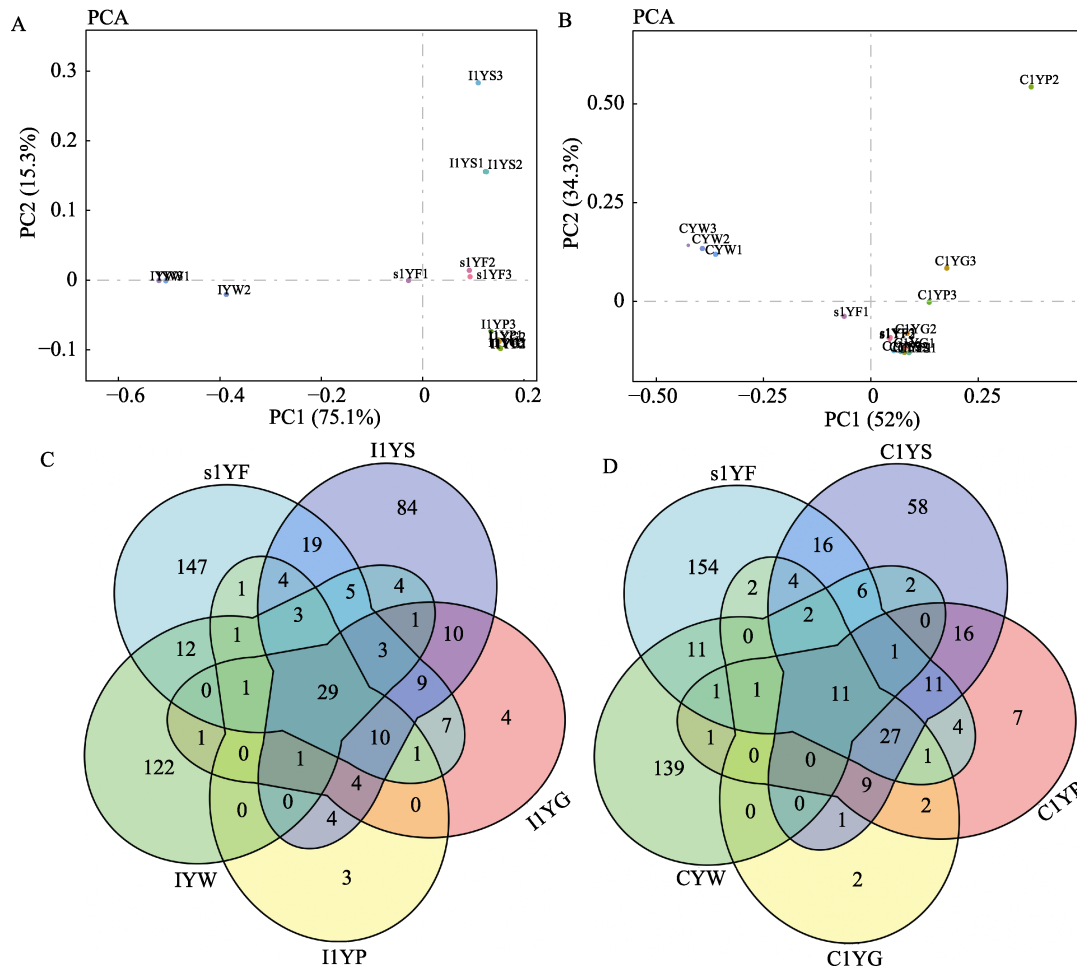


图 2 大黄鱼消化道菌群与环境菌群的相似性

Fig.2 The similarity of microbiota between the gastrointestinal tract and environment

A、B 分别代表工厂化和网箱模式下的菌群 PCA 分析; C、D 分别代表工厂化和网箱模式下不同样本间菌群共有分析
A and B represent the principal components analysis (PCA) of gastrointestinal tract microbiota in large yellow croaker cultured by industrialized pattern and net cage, respectively; C and D represent the analysis of shared microbiota among different samples from large yellow croaker cultured by industrialized pattern and net cage, respectively

属为46个,占肠道菌属总量的56.79%;饲料与消化道共有的菌属数目占饲料总数的42.06%,高于与水样的共有菌属比例(33.88%)。

网箱养殖模式下,大黄鱼胃、幽门盲囊、肠道间的菌群组成均相近,并且三者与饲料菌群组成相近(图2B)。与工厂化养殖情况相似,胃和幽门盲囊共有菌属75个,占胃中菌属总量的45.73%;肠道与幽门盲囊的共有菌属51个,占肠道菌属总量的82.26%;与环境菌群相关性分析中,消化道与饲料的共有菌属比例(38.89%)仍然高于消化道与水的共有菌属比例(21.02%)(图2D)。说明,在大黄鱼消化道中,幽门盲囊与肠道的菌群组成相近,消化道菌群整体与饲料菌群组成相近。

2.4 大黄鱼消化道消化酶和非特异性免疫酶活力特征

工厂化模式养殖大黄鱼消化道中,除胰蛋白酶外,其他消化酶活力均高于网箱养殖大黄鱼,工厂化养殖大黄鱼幽门盲囊的胃蛋白酶(24.78 U/mg prot)和淀粉酶(0.16 U/mg prot)活力均显著高于网箱养殖大黄鱼(15.24和0.07 U/mg prot)($P<0.05$)(表4)。同时,工厂化养殖大黄鱼幽门盲囊和肠道中的淀粉酶活力(0.16和0.14 U/mg prot)显著高于胃中淀粉酶活力(0.08 U/mg prot)($P<0.05$)。

整体上,工厂化养殖大黄鱼消化道中的包括

ACP、AKP、SOD和LZM在内的非特异性免疫酶活力高于网箱养殖大黄鱼;除肠道中LZM外,不同养殖模式下相同消化道组织及同一养殖模式不同消化道组织的SOD和LZM活力均差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 大黄鱼消化道菌群特征分析

水产动物易受环境条件的影响造成自身的不稳定,从而影响消化道微生物群。王程程等(2014)对同一养殖海区的1龄大黄鱼的肠道菌群进行分析,发现肠壁中拟杆菌属优势度最高。本研究中,拟杆菌属为大黄鱼胃中的优势细菌,而在肠道中其丰度仅为0.88%~1.32%,这可能是取样时间不同造成的环境条件差异引起的,当然也有来自鱼体自身的差异。在同一取样时间,对来源于同一养殖场繁育的0龄大黄鱼消化道菌群特征进行研究,发光杆菌属(*Photobacterium*)、弧菌属(*Vibrios*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等为2种模式养殖大黄鱼消化道的共有优势菌群,而假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)和*Escherichia Shigella*为主要差异菌属(姜燕等,2019)。然而,本文中对1龄大黄鱼消化道菌群的研究却发现,乳杆菌科、*Fructobacillus*和黄杆菌属等所代表的菌属为2种模式养殖大黄鱼消化道共有的优势菌群,其中,拟杆菌属、

表4 不同模式养殖大黄鱼消化道各部位消化酶和非特异性免疫酶活力
Tab.4 The activity of digestive and nonspecific immunity enzyme of the gastrointestinal tract of large yellow croaker cultured in different patterns

指标 Indices	样品 Sample					
	I1YS	I1YP	I1YG	C1YS	C1YP	C1YG
胃蛋白酶 Pepsase (U/mg prot)	53.27±8.09	24.78±4.04*	—	27.38±11.13	15.24±2.36*	—
胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	—	183.89±2.76	189.68±45.57	—	659.81±184.88	481.99±255.75
淀粉酶 Amylase (U/mg prot)	0.08±0.02 ^b	0.16±0.01 ^{a*}	0.14±0.00 ^a	0.10±0.03	0.07±0.01 [*]	0.10±0.02
脂肪酶 Lipase (U/g prot)	5.90±0.66	4.22±0.80	4.43±0.17	4.91±0.83	4.00±1.17	3.53±0.44
酸性磷酸酶 Acid phosphatase (king unit/g prot)	270.84±21.29	230.09±40.01	290.60±64.84	304.50±46.15	217.98±38.70	198.14±36.50
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (king unit/g prot)	220.55±30.53	519.08±99.97	480.62±134.29	265.93±84.35	191.70±28.10	327.03±140.67
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (U/mg prot)	1083.45±4.80 ^{a*}	861.77±6.03 ^{b*}	839.31±11.03 ^{b*}	925.32±21.00 ^{b*}	1028.13±17.42 ^{a*}	716.68±9.04 ^{a*}
溶菌酶 Lysozyme (U/mg prot)	73.93±7.02 ^{a*}	21.44±0.95 ^{b*}	25.84±1.11 ^b	6.53±1.13 ^{b*}	71.59±10.05 ^{a*}	20.70±4.02 ^b

注: *表示大黄鱼消化道同一组织不同养殖模式间酶活力差异显著($n=3, P<0.05$),不同上标小写字母表示同一养殖模式大黄鱼消化道各部位间酶活力差异显著($n=3, P<0.05$)

Notes: * represents the significant difference between different aquaculture patterns for enzyme activity of the same gastrointestinal tract tissue of large yellow croaker ($n=3, P<0.05$). Values with different lowercase represent the significant difference among different gastrointestinal tract tissues of large yellow croaker for enzyme activity that cultured in the same pattern ($n=3, P<0.05$)

黄杆菌属和普氏菌属_9为0龄和1龄大黄鱼消化道共存的优势菌属; 2种模式的大黄鱼消化道差异菌属则不存在共有情况。这也反映出鱼体的生理阶段、生存环境等均可对消化道菌群结构特征形成一定的影响(Banerjee *et al*, 2017; Jiang *et al*, 2019a; Kelly, 2010; Shabat *et al*, 2016; Sullam *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2016)。同时也说明, 鱼体自身及其生存环境对其消化道菌群存在影响, 但一些主要菌群依然定植于消化道。Jiang等(2019a、b)在对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)早期生长阶段消化道菌群结构特征和演替的研究中发现, 从1日龄仔鱼开始, 经过生物饵料(轮虫、卤虫)期, 至颗粒饵料稳定期, 同样存在一些共有菌属始终以优势菌群的地位定植于消化道中。可见, 每种鱼都有几个优势菌属始终定植于消化道。

不同养殖模式对鱼类消化道菌群结构特征具有一定影响。在池塘与工厂化养殖模式的对比中发现, 池塘养殖牙鲆肠道菌群多样性高于工厂化养殖牙鲆, 且优势菌属中的芽孢杆菌属和弧菌属的丰度在2种养殖模式下差异显著(李存玉等, 2015)。Wang等(2017)研究发现, 网箱和养殖池养殖的罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道菌群存在一定差异。本研究中, 详细对比各优势菌属分别在2种模式养殖大黄鱼消化道不同部位间的显著性差异, 而且还针对工厂化和网箱养殖模式下大黄鱼消化道每一个部位间的差异菌属进行对比分析, 发现幽门盲囊和肠道的菌属组成相似, 二者与胃的菌属差异较大, 并且工厂化条件下的差异相对明显。同时, 普氏菌属、乳杆菌科代表的菌属为2种模式养殖大黄鱼的主要差异菌属。推测, 这可能与养殖鱼类自身特性及其养殖环境有关。同时, 水和饵料是水产养殖过程中必不可少的两大外部要素, 对养殖动物或消化道的菌群结构具有一定的影响(De Schryver *et al*, 2010; Bakke *et al*, 2013; Li *et al*, 2017; 刘增新等, 2017; 何娇娇等, 2018; Jiang *et al*, 2018)。本研究发现, 与养殖水体相比, 养殖大黄鱼消化道菌群结构与饲料菌群结构更相近, 而2种养殖模式的大黄鱼采用同种饲料投喂, 且2种养殖模式大黄鱼的消化道菌群结构存在一定的差异, 这可能与养殖模式不同造成的环境差异相关。

3.2 大黄鱼消化道菌群功能分析

消化道是营养代谢的主要场所, 而菌群对宿主营养相关功能方面发挥着重要作用(Cantarel *et al*, 2009; Flint *et al*, 2012; Ray *et al*, 2012; Semova *et al*, 2012)。在反刍动物的研究中显示, 消化道菌群在能量代谢方

面能够协同宿主更好地适应生存环境(Shabat *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2016)。本研究中, 结合2种模式下大黄鱼消化道各部位菌群结构特征分析, 发现菌群功能与结构呈正相关关系。工厂化条件下, 大黄鱼胃部菌群功能与幽门盲囊和肠道菌群功能差异显著, 而网箱条件下该差异减弱, 并且二级水平下2种模式间的菌群功能差异不显著。推测, 这可能与工厂化条件下养殖密度较高有关。在与营养相关的代谢功能中, 与其他代谢通路的基因丰度相比, 消化道各部位菌群参与碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜转运、能量代谢等的基因数目相对较高, 说明, 菌群主要参与了大黄鱼对营养消化、吸收和转运的过程。这与不同模式养殖0龄大黄鱼的消化道菌群功能研究结果相似(姜燕等, 2019)。

另外, 消化道菌群能够通过产物抑制等竞争性作用阻止外源微生物的入侵, 有效提高宿主的免疫功能(Tagg *et al*, 1976; Noonpakdee *et al*, 2003; Qian *et al*, 2007; Chen *et al*, 2010)。本研究中, 大黄鱼消化道菌群中参与免疫相关功能的基因数目与其他功能的基因数相比较少, 并且不同部位间差异不显著, 这可能与实验鱼处于健康状态、菌群基因主要富集在与营养相关的代谢通路中相关。

3.3 大黄鱼消化道消化酶和非特异性免疫酶活力分析

摄入体内的食物消化主要依赖于消化腺和消化器官分泌的消化酶, 而消化酶活力受生存环境、pH、鱼体生理阶段、鱼种类、食性和营养水平等多种因素的影响(赵志刚等, 2017; 王常安等, 2017; 杨娅等, 2014; 周景祥等, 2001)。而消化酶活力的大小则代表消化能力的强弱。研究指出, 有胃鱼类特别是肉食性鱼类, 摄入体内的蛋白主要在胃中进行消化(周景祥等, 2001)。肠道中的蛋白酶主要来源于肠粘膜、肝脏、幽门垂等分泌的胰蛋白酶(王海英, 2004)。鱼类的各消化器官均存在淀粉酶, 而幽门盲囊中一般不存在脂肪酶(李瑾等, 2001)。而相关报道指出, 大菱鲆、亚东鲑(*Salmo trutta fario*)等的幽门盲囊具有相对较高的脂肪酶活力(王海英, 2004; 王常安等, 2017)。本研究中, 通过对比也发现, 蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶存在于消化道的各部位。出现这种现象可能与鱼的食性、生存环境等相关。研究还发现, 除胰蛋白酶外, 工厂化养殖的大黄鱼消化道各消化酶活力均高于网箱养殖大黄鱼, 可能与工厂化条件下养殖密度较高及定植于消化道内壁的菌群结构相关。

本研究发现, 消化道中的胃和幽门盲囊均具有相对较高的ACP、AKP、SOD和LZM活力, 说明, 大黄

鱼的整个消化道不仅具有微生物免疫屏障作用,而且还具有一定的化学免疫屏障作用。相关报道指出,摄食和生存环境因子等均可在一定程度上影响鱼类的免疫酶活力(Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2012; 卓丽欣等, 2018)。相对于工厂化模式,网箱养殖密度相对较低,养殖环境相对开放,这些因素综合导致工厂化养殖大黄鱼提高自身的非特异性免疫酶活力来适应生存环境。因此,本研究中,鱼类整个消化道都存在ACP和SOD等非特异性免疫酶,工厂化养殖条件下,鱼的非特异性免疫酶活力高于网箱养殖大黄鱼,推测与养殖密度和养殖模式相关。王孝杉等(2018)对放养密度基本一致的循环水和网箱模式养殖黄姑鱼的生长、免疫、血清生化等指标进行对比分析,发现循环水系统对黄姑鱼的胁迫大于网箱系统。然而,密度胁迫可能会导致养殖鱼类体内免疫酶活性的降低,并影响鱼类的生长(薛宝贵等, 2013; Barcellos *et al.*, 2004)。

4 结论

通过对比分析,明确了大黄鱼消化道共有的优势菌群为乳杆菌科、*Fructobacillus*、黄杆菌属、E01_9C_26_marine_group(o)、拟杆菌属、*Parabacteroides* 和 *Anaerostipes* 等所代表的菌属。工厂化模式养殖大黄鱼消化道各组织间菌群结构与功能存在一定差异,2种模式养殖大黄鱼消化道菌群与饲料菌群更相近。同时发现,大黄鱼整个消化道均具有一定的非特异性免疫酶活性,不同分组间的消化酶和免疫酶活力存在一定差异。

参 考 文 献

- Bakke I, Skjermo J, Vo TA, *et al.* Live feed is not a major determinant of the microbiota associated with cod larvae (*Gadus morhua*). *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(4): 537–548
- Banerjee G, Ray AK. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 2017, 72(1): 1–11
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM, *et al.* Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: Cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 2004, 232(1): 383–394
- Cai SH, Lu YS, Jian JC, *et al.* Protection against *Vibrio alginolyticus* in crimson snapper *Lutjanus erythropterus* immunized with a DNA vaccine containing the *OmpW* gene. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 106(1): 39–47
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233–D238
- Chen JG, Yang JF, Xiong J, *et al.* The innate immune response in *Lateolabrax japonicus* induced by lipopolysaccharide from *Glaciecola polaris* strain ARK149 (LMG21854). *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(10): 1504–1511
- De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, *et al.* Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86: 1535–1541
- Du MY, Ye SG, Liu J, *et al.* Research advances on antagonistic microbes and application in aquatic animal pathogens: A review. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(6): 753–758 [杜明洋, 叶仕根, 刘娟, 等. 水产动物病原拮抗微生物及其应用研究进展. 大连海洋大学学报, 2017, 32(6): 753–758]
- Dwivedi M, Ansarullah, Radichev I, *et al.* Alteration of immune-mechanisms by human microbiota and development and prevention of human diseases. *Journal of Immunology Research*, 2017, ID 6985256
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2018, 18–26 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018, 18–26]
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, *et al.* Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 289–306
- He JJ, Wang P, Feng J, *et al.* Effects of replacing fish meal with corn gluten meal on growth, intestinal histology, and intestinal microbiota of large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 361–372 [何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 玉米蛋白粉对大黄鱼生长、肠道组织结构及肠道菌群的影响. 中国水产科学, 2018, 25(2): 361–372]
- Jiang Y, Liu Z, Liu X, *et al.* Structural characteristics and succession of intestinal microbiota for *Paralichthys olivaceus* during the early life stage. *Aquaculture Research*, 2019a, 50: 529–540
- Jiang Y, Wang Y, Zhang Z, *et al.* Responses of microbial community structure in turbot (*Scophthalmus maximus*) larval intestine to the regulation of probiotic introduced through live feed. *PLoS ONE*, 2019b, 14(5): e0216590
- Jiang Y, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Analysis of the structure and function for gastrointestinal microbiota of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) juveniles cultured in indoor tank and cage. *Feed Industry*, 2019, 40(6): 35–43 [姜燕, 徐永江, 柳学周, 等. 工厂化和网箱养殖大黄鱼幼鱼消化道微生物群落结构与功能分析. 饲料工业, 2019, 40(6): 35–43]
- Jiang Y, Zhang Z, Wang Y, *et al.* Effects of probiotic on microfloral structure of live feed used in larval breeding of turbot *Scophthalmus maximus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(3): 1002–1012
- Kelly P. Nutrition, intestinal defence and the microbiome. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69(2): 261–268

- Li CY, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond- and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 245–255 [李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析. *水产学报*, 2015, 39(2): 245–255]
- Li J, He RG, Wang XD. Comparative studies on digestive enzymatic activities of the four alimentary organs in *Acipenser sinensis*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2001, 28(3): 99–102 [李瑾, 何瑞国, 王学东. 中华鲟消化酶活性分布的研究. *水产科技情报*, 2001, 28(3): 99–102]
- Li J, Ma SY, Woo NYS. Vaccination of Silver Sea Bream (*Sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: Protective evaluation of different vaccinating modalities. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(1): E40
- Li Y, Yang P, Zhang Y, *et al.* Effects of dietary glycinin on the growth performance, digestion, intestinal morphology and bacterial community of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 2017, 479: 125–133
- Liu Z, Gao X, Yu J, *et al.* Effects of different salinities on growth performance, survival, digestive enzyme activity, immune response, and muscle fatty acid composition in juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish Physiology Biochemistry*, 2017, 43(3): 761–773
- Liu ZX, Liu XZ, Shi B, *et al.* Composition of intestinal bacterial community of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during early life stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 111–119 [刘增新, 柳学周, 史宝, 等. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 仔稚鱼肠道菌群结构比较分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 111–119]
- Nayak SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2–14
- Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, *et al.* Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nam*, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81(2): 137–145
- Qian G, Xu Z. Effect of polysaccharide extracted from *Glaciecola polaris* on the protection of mouse macrophages from oxidative injury. *Bioresource Technology*, 2007, 98(1): 202–206
- Ray AK, Ghosh K, Ringø E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(5): 465–492
- Semova I, Carten JD, Stombaugh J, *et al.* Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host and Microbe*, 2012, 12(3): 277–288
- Shabat SK, Sasson G, Doron-faigenboim A, *et al.* Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal*, 2016, 10(12): 2958–2972
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, *et al.* Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Molecular Ecology*, 2012, 21(13): 3363–3378
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 1976, 40(3): 722–756
- Wang CA, Hu G, Sun P, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance, digestive enzyme activities and serum indices of *Salmo trutta fario* broodstock. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(2): 1–12 [王常安, 户国, 孙鹏, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对亚东鲑亲鱼生长性能、消化酶活性和血清指标的影响. *动物营养学报*, 2017, 29(2): 1–12]
- Wang CC, Yan QP, Huang WQ, *et al.* Study on intestinal bacteria of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) in Sansha Bay, Fujian Province. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2014, 19(1): 1–6 [王程程, 鄢庆枇, 黄伟卿, 等. 福建三沙湾养殖大黄鱼肠道菌群研究. *集美大学学报(自然科学版)*, 2014, 19(1): 1–6]
- Wang HY. Digestive enzyme in turbot *Scophthalmus maximus* L. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2004, 29–46 [王海英. 大菱鲆主要消化酶—蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2004, 29–46]
- Wang M, Liu G, Lu M, *et al.* Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 2017, 48(6): 3163–3173
- Wang XS, Zhang CJ, Peng SM, *et al.* Difference in growth, immunity and serum biochemical parameters of *Nibea albiflora* between closed recirculating aquaculture and offshore cage culture system. *Marine Fisheries*, 2018, 40(2): 207–216 [王孝杉, 张晨捷, 彭士明, 等. 循环水和网箱两种养殖模式下黄姑鱼生长、免疫及血清生化的差异. *海洋渔业*, 2018, 40(2): 207–216]
- Xue BG, Lou B, Xu DD, *et al.* Impact of density stress on growth, metabolism and non-specific immune functions of juvenile *Nibea albiflora*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 45–51 [薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 45–51]
- Yang H, Xing XP, Huang Q, *et al.* Effects of temperature and pH on activities of digestive enzymes in *Perca flavescens*. *Journal of Northwest A and F University (Nat. Sci. Ed.)*, 2014, 42(10): 1–6 [杨姘, 邢秀苹, 黄权, 等. 温度和pH对黄金鲈消化酶活力的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(10): 1–6]
- Zhang Y, Feng S, Chen J, *et al.* Stimulatory effects of chitinase on growth and immune defense of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 844–854
- Zhang Z, Xu D, Wang L, *et al.* Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals. *Current Biology*, 2016, 26(14): 1873–1879
- Zhao ZG, Li JN, Xu QY, *et al.* Effects of different ration levels in temperature fluctuation on digestive enzyme, metabolic enzyme and antioxidase activities of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(1): 127–133 [赵志刚, 李晋南, 徐奇友,

- 等. 变温条件下不同投喂水平对施氏鲟幼鱼消化酶、代谢酶和抗氧化酶活性的影响. 动物营养学报, 2017, 29(1): 127–133]
- Zhou JX, Chen Y, Huang Q, *et al.* On activity of digestive ferment of fish and its change affected by the circumstances. Journal of Beihua University (National Science), 2001, 2(1): 70–73, 83 [周景祥, 陈勇, 黄权, 等. 鱼类消化酶的活性及环境条件的影响. 北华大学学报(自然科学版), 2001, 2(1): 70–73, 83]
- Zhuo LX, Zhao HX, Huang YH, *et al.* Influence of oxidized fish oil on the intestinal health of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and the use of arginine as an intervention measure. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 100–111 [卓丽欣, 赵红霞, 黄燕华, 等. 氧化鱼油对黄颡鱼幼鱼肠道健康的影响及精氨酸的干预作用. 水产学报, 2018, 42(1): 100–111]
- (编辑 马璀艳)

Analysis of Microbiota Structure, Digestive Enzyme and Nonspecific Immune Enzyme Activity in the Gastrointestinal Tract of Large Yellow Croaker

JIANG Yan^{1,2}, XU Yongjiang², YU Chaoyong³, LIU Xuezhou^{1,2①}, WANG Bin²,
ZHENG Weiqiang¹, GUAN Shuguang³, SHI Bao², CHEN Jia¹, KE Qiaozhen¹

(1. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde Fufa Fisheries Co. Ltd., Ningde 352103;

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), Qingdao 266071;

3. Marine Biology Institute of Shandong Provincial, Qingdao 266104)

Abstract The aim of this project was to investigate the characteristics of the microbiota structure and the activity of digestive and nonspecific immune enzymes in the gastrointestinal tract of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). We systematically analyzed the composition and distribution of microbiota in the stomach, pyloric caecum, and gut of large yellow croaker using high-throughput sequencing. Moreover, we conducted comparative analysis of the gastrointestinal tract microbiota in large yellow croakers cultured via the industrialized or net cage culture pattern. Under these two aquaculture patterns, we analyzed the activity of digestive and nonspecific immune enzymes in the gastrointestinal tract through biochemical methods. The microbiota diversity in the gastrointestinal tract declined under both aquaculture patterns. The genera including Lactobacillaceae(f), *Fructobacillus* and *Flavobacterium*, and etc, were the shared and dominant microbiota. The abundances of *Bacteroides* and *Anaerostipes* declined from the beginning of the gastrointestinal tract to the end, while those of *Flavobacterium* and genera represented by Lactobacillaceae (f) and the E01_9C_26_marine_group increased under both aquaculture patterns. Genera belonging to *Prevotella_9* and Lactobacillaceae(f) were the main different species between these two aquaculture patterns. Under the industrialized pattern, the composition of microbiota and number of genes involved in metabolic pathways associated with nutrition and immunity were not significantly different between the pyloric caecum and gut ($P>0.05$), while these values obviously different from those in the stomach. In contrast, under net cage culture, differences between the stomach and pyloric caecum or gut decreased. The microbiota composition of the gastrointestinal tract of large yellow croakers cultured with these two patterns was similar to that of the feed. Additionally, the stomach and pyloric caecum exhibited nonspecific immune enzyme activities, indicating that the entire gastrointestinal tract functions as a chemical immune barrier. These results can serve as a basis for healthy large yellow croaker cultures and provide a theoretical foundation for studying the physiological functions of the gastrointestinal tract microbiota.

Key words Large yellow croaker; Gastrointestinal tract; Microbiota; Digestive enzymes; Nonspecific immune enzymes; Culture mode

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190703002

http://www.yykxjz.cn/

陆键萍, 姚琳, 信红梅, 曲梦, 江艳华, 李凤铃, 郭莹莹, 王联珠, 许加超. 线粒体 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 73–81

Lu JP, Yao L, Xin HM, Qu M, Jiang YH, Li FL, Guo YY, Wang LZ, Xu JC. Applicability analysis of mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA genes in identification of six tuna species. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 73–81

线粒体 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析*



陆键萍^{1,2} 姚琳² 信红梅^{2,3} 曲梦² 江艳华²
李凤铃² 郭莹莹² 王联珠^{2①} 许加超^{1①}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266000; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品
质量安全检测与评价重点实验室 青岛 266071; 3. 大连工业大学 大连 116000)

摘要 探讨细胞色素氧化酶亚基 I 基因(*CO I*)、细胞色素 b 基因(*Cyt b*)及 16S rRNA 基因对主要渔获区的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、马苏金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)、大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)、长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)和正鲣(*Katsuwonus pelamis*) 6 种重要的生食金枪鱼及其易混品种的物种鉴定和进化分析的适用性。采用 3 对通用引物对 6 种金枪鱼共 63 个样品的 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 3 种序列片段进行 PCR 扩增、测序,并运用 DnaSP 5.10、Mega 7.0 等软件进行了 DNA 序列分析、遗传差异分析和进化树分析。结果显示, 16S rRNA 较为保守,不能很好区分 6 种金枪鱼,且不能对同一物种不同地理群体进行聚类分析;*Cyt b* 和 *CO I* 配合使用能很好区分 6 种金枪鱼,且存在一定同一物种地理群体聚类的趋势。建议 *CO I* 与 *Cyt b* 基因联合用于上述 6 种金枪鱼的分子鉴别研究。本研究为生食金枪鱼及其制品的物种鉴定及金枪鱼产业的健康发展提供了技术支撑。

关键词 金枪鱼; 分子鉴定; *CO I*; *Cyt b*; 16S rRNA

中图分类号 TS254.7; S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)05-0009-09

金枪鱼是栖息在大洋上层的大型鱼类,具有高度洄游的特性,在世界渔业中占有重要的地位(戴小杰等, 2007)。从渔业利用角度讲,金枪鱼一般指经济价值较大的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、马苏金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)、大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)、长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)和正鲣(*Katsuwonus pelamis*)等(徐坤华等, 2014),其中,蓝鳍、马苏、黄鳍和大目金枪鱼等主

要用于生鱼片的加工,长鳍金枪鱼和正鲣等小型金枪鱼主要作为金枪鱼罐头和日本“木鱼”(Katsuobushi)原料(方健民等, 2006)。不同品种金枪鱼价格差异很大,尤其是其去头去皮的销售方式,导致金枪鱼市场上标签错乱和以次充好的问题尤为严重,损害了消费者利益,破坏了正常的经营秩序;由于市售金枪鱼及其制品均缺少主要的形态学鉴定特征,因此,金枪鱼及其制品的分子鉴定方法成为国内外的研究热点。

* 国家重点研发计划(2016YFF0201805)资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Plan of China (2016YFF0201805)]. 陆键萍, E-mail: lujianping2014@foxmail.com

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn; 许加超, 教授, E-mail: xujia@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-07-03, 收修修改稿日期: 2019-07-26

DNA 条形码是物种分子鉴定研究中的重要方法,美国 FDA(Food and Drug Administration)也将其作为食品标签认证的方法(王敏等, 2015; Karim *et al.*, 2016), 弥补了传统形态学鉴定方法的不足。Barrett 等(2005)最早提出 DNA 条形码的定义, 且最先以细胞色素氧化酶亚基 I 基因(CO I)为研究对象。CO I 基因具有足够的遗传变异信息, 广泛用于鱼类的鉴定和分类(Hanner *et al.*, 2011; Khedkar *et al.*, 2014)。随着基因条形码技术的发展, 除了 CO I 基因序列作为标准条形码外, 作为重要条形码的细胞色素 b 基因(*Cyt b*)、16S rRNA 和线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 II 基因(CO II)等, 近年也越来越多地被应用于物种鉴定和遗传多样性分析(Chapela *et al.*, 2005; 崔文涛等, 2013)。*Cyt b* 能在同一物种内表现出稳定的遗传性, 却在不同物种间具有明显的遗传差异, 因此, 被用于物种种属鉴定(Becker *et al.*, 2015); 线粒体 16S rRNA 既含有高度保守的序列区域, 又有中度保守和高度变化的序列区域, 已成为广泛应用于水生动物群体遗传多样性和系统进化分析研究的分子标记(孙超等, 2014; 陈文炳等, 2017)。

本研究以主要生食金枪鱼及其易混品种(蓝鳍、马苏、黄鳍、大目、长鳍金枪鱼和正鲣)为研究对象, 利用 CO I、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因对其进行 DNA 条形码研究、遗传差异分析和进化树分析, 探讨 3 种基因在金枪鱼分子鉴定研究中的适用性, 为生食金枪鱼的物种鉴定及金枪鱼产业的健康发展提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 长鳍金枪鱼(组编号: CQ, 下同)、黄鳍金枪鱼(HQ)、蓝鳍金枪鱼(LQ)、马苏金枪鱼(MS)、大目金枪鱼(DM)、正鲣(JY)肌肉组织共 63 份, 每份均来自于捕捞地点、外形特征明确的金枪鱼个体, 如表 1 所示, 由本实验室收集保存。

表 1 样品信息及编号
Tab.1 Sample information and number

样品 Samples	组号 Group No.	捕捞地点 Sampling location	样品号 Sample No.	样品数 Sample quantity
长鳍金枪鱼 <i>Thunnus alalunga</i>	CQ	南太平洋 Southern Pacific Ocean	chq	5
		北太平洋 Northern Pacific Ocean	cm	5
大目金枪鱼 <i>Thunnus obesus</i>	DM	大西洋 Atlantic Ocean	dd	4
		太平洋 Pacific Ocean	dt	4
		印度洋 India Ocean	dy	4
黄鳍金枪鱼 <i>Thunnus albacares</i>	HQ	太平洋 Pacific Ocean	hu	4
		大西洋 Atlantic Ocean	hud	3
		印度洋 India Ocean	huy	4
蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	LQ	大西洋 Atlantic Ocean	lq	10
马苏金枪鱼 <i>Thunnus maccoyii</i>	MS	太平洋 Pacific Ocean	ms	5
		印度洋 India Ocean	my	5
鲣鱼 <i>Katsuwonus pelamis</i>	JY	印度洋 India Ocean	jy	10

1.1.2 试剂与仪器 TIANGEN 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒、2×*Taq* PCR Master Mix 和 DL2000 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司; 其他试剂为国产分析纯; 引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; PCR 仪为 T1 常规 PCR 仪(德国 Whatman Biomerra 公司), 凝胶成像分析系统 Infinity 3000(法国 Vilber Lourmat 公司), 核酸蛋白测定仪 NanoPhotometer Pearl(德国 Implen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 取 30 mg 鱼肉, 剪碎后置于离心管中, 按照试剂盒说明书提取 DNA, 用核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度, -20℃ 保存。本实验选取引物见表 2, PCR 反应体系见表 3。

表 2 引物信息
Tab.2 Information of primers

引物 Primer	序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 Reference
CO I FiF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	52	Ward 等(2009)
CO I FiR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA		
<i>Cyt b</i> -1	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	53	Marko 等(2004)
<i>Cyt b</i> -2	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA		
16S-AR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	52	Inoue 等(2001)
16S-BR	CCGGTCTGAACCTCAGATCACG		

表 3 PCR 扩增体系

Tab.3 PCR amplification system

试剂 Reagent	浓度 Concentration	加样量 Sampling volume (μl)
PCR master mix	2 \times	25
上游引物 Forward primer	10.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0
下游引物 Reverse primer	10.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0
模板 Template	约 100 ng/ μl	1.0
去离子水 ddH ₂ O	—	22.0

PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 或 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察并记录实验结果; PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.2.2 序列比对与建树分析 测序结果经人工校对后去除引物区, 在 NCBI 网站上通过 BLAST 分析将测序结果与 GenBank 中参考序列比对分析, 其中, *CO I* 基因采用 BOLD(Barcode of Life Data System 生命条形码数据系统 www.boldsystems.org) 进行分析; 通过 DnaSP 5.10 软件计算其二者序列的单倍型数

(*h*)、单倍型多样性指数(*H_d*)、平均核苷酸差异数(*k*)、核苷酸多样性指数(π)等遗传多样性参数。运用 Mega 7.0 软件, 统计序列碱基组成, 计算序列保守位点(C-conserved sites)、简约信息位点(PI-parsimony-informative sites)和变异位点(V-variable sites), 并采用邻接法(Neighbor joining, NJ)法, 自展检验 1000 次, 采用 Kimura 2-parameter 模型, 以牛(*Bos grunniens*, GenBank: KM233416)线粒体 DNA(mtDNA, 包含 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因)作为外类群, 同时在 NCBI 网站选取 6 种金枪鱼 mtDNA(*T. alalunga* GenBank: AB101291; *T. albacares* GenBank: JN086153; *T. maccoyii* GenBank: KF925362; *T. obesus* GenBank: GU256525; *T. thynnus* GenBank: KF906720; *K. pelamis* GenBank: KM605252) 作为标准基因, 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

长鳍金枪鱼等 63 个实验样本均扩增出单一的片段, 未发现其片段长度多态性, 测序得到片段大小分别为 *CO I* 652 bp、*Cyt b* 307 bp、16S rRNA 576 bp(图 1), 与预期一致。

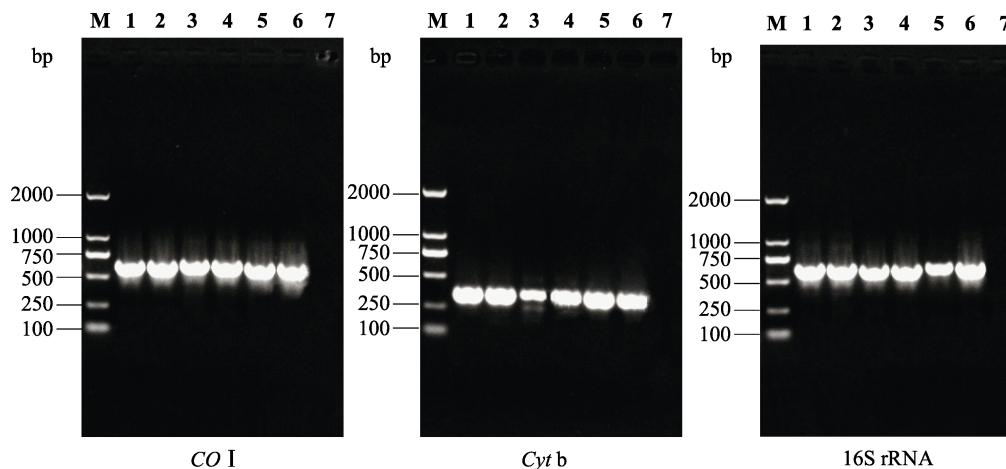


图 1 部分样品 3 种基因 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis map of three gene PCR products

M: DNA marker; 1: 长鳍金枪鱼; 2: 蓝鳍金枪鱼; 3: 大目金枪鱼;

4: 黄鳍金枪鱼; 5: 马苏金枪鱼; 6: 鲣鱼; 7: 空白对照

M: DNA marker; 1: *T. alalunga*; 2: *T. thynnus*; 3: *T. obesus*; 4: *T. albacares*; 5: *T. maccoyii*; 6: *K. pelamis*; 7: Blank control

2.2 基因序列

3 种基因扩增产物序列经 GenBank 数据库比对, 确定位于 mtDNA 16S rRNA、*CO I*、*Cyt b* 区域, BLAST 结果和 BOLD 比对结果与各样本来源鱼的形态学鉴定结果一致。

经人工校正去除上下游引物, 得到 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因片段中 T、C、A 和 G 平均含量(表 4), 其中, 16S rRNA 基因中 A+T 平均含量为 52.7%, 稍高于 G+C 平均含量(47.3%), 且 6 种金枪鱼的 GC 含量差异不大; 其中, *CO I* 基因中 A+T 平均含量为 53.0%, 稍高于 G+C 平均含量(47.0%), 且 6 种金枪鱼的 GC 含量差异

表4 6种金枪鱼 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因碱基组成
Tab.4 Base composition of CO I, Cyt b and 16S rRNA genes in six tuna species

组编号 Group number	16S rRNA 碱基含量 16S rRNA base content (%)				CO I 碱基含量 CO I base content (%)				Cyt b 碱基含量 Cyt b base content (%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
CQ	22.9	24.3	29.7	23.1	28.8	28.2	24.1	18.8	30.0	31.6	21.5	16.9
DM	22.7	24.5	29.9	22.9	28.6	28.4	24.1	19.0	29.7	31.2	22.4	16.7
HQ	22.7	24.5	29.9	22.9	28.7	28.4	24.1	18.9	29.2	32.0	21.8	16.9
JY	23.4	24.5	29.3	22.7	30.6	27.3	23.3	18.7	29.5	31.7	22.8	16.0
LQ	22.7	24.5	30.0	22.7	28.7	28.4	24.1	18.9	30.0	31.3	21.8	16.9
MS	22.7	24.5	30.0	22.7	28.7	28.4	24.0	18.9	30.0	31.3	22.4	16.4
平均 Average	22.9	24.5	29.8	22.9	29.0	28.2	23.9	18.9	29.7	31.5	22.1	16.6

不大; 其中, Cyt b 基因 A+T 平均含量为 51.9%, 稍高于 G+C 平均含量(48.1%), 且 6 种金枪鱼相互间的 GC 含量差异也不大。3 种基因的 GC 含量在 47.0%~48.1% 之间, 其中, Cyt b 基因 GC 含量最高(48.1%)。

各项遗传多样性参数统计如表 5 所示。基于 16S rRNA 序列的金枪鱼各物种变异位点(V)为 12, 变异率仅为 2.08%, 远小于 CO I (11.35%)、Cyt b(15.96%)。16S rRNA 序列转换/颠换比(R)为 1.49, 也小于 CO I (2.50)和 Cyt b(2.48)。从平均核苷酸差异数(k)和核苷酸多样性指数(π)来看, 16S rRNA 是 3 种基因中最小的, 而保守位点所占比率为 97.92%, 是 3 种基因中

最保守的, 说明了该核苷酸变异程度较低, 表明了遗传物质的稳定性。

基于 Cyt b 序列的金枪鱼各物种的变异位点(V)为 49, 小于 CO I (71), 但其变异率为 15.96%, 高于 CO I 变异率(11.35%)。Cyt b 序列的单倍型多样性指数(H_d)低于 CO I, 平均核苷酸差异数(k)低于 CO I, 而核苷酸多样性指数(π)却是 3 种基因片段中最高的, 说明较之 16S rRNA 和 CO I 序列, Cyt b 序列核苷酸变异程度最高, 遗传多样性较高, 分化程度要比其余二者高, 但其遗传多样性没有 CO I 序列高, CO I 序列遗传资源较丰富。

表5 3种基因片段的遗传多样性参数
Tab.5 Genetic diversity parameters of three gene fragments

基因 Gene	序列长度 Sequence length	遗传多样性参数 Genetic diversity parameters							
		C	PI	V	R	h	H_d	k	π
16S rRNA	576	564	12	12	1.49	4	0.653±0.054	3.074	0.00534±0.00138
CO I	652	578	71	74	2.50	21	0.941±0.016	17.020	0.02610±0.00637
Cyt b	307	258	47	49	2.48	15	0.902±0.024	11.621	0.03785±0.00834

注: C: 保守位点; PI: 简约信息位点; V: 变异位点; R: 转换/颠换比; h: 单倍型数; H_d : 单倍型多样性指数; k: 平均核苷酸差异数; π : 核苷酸多样性指数

Note: C: Conserved sites; PI: Parsimony-informative sites; V: Variable sites; R: Transitions/transversions ratio; h: Number of haplotypes; H_d : Haplotype diversity; k: Average number of nucleoside difference; π : Nucleotide diversity

2.3 系统进化树

2.3.1 16S rRNA 基于 16S rRNA 基因构建的 NJ 系统进化树见图 2。图 2 显示, 6 种金枪鱼分为 4 大支, 黄鳍金枪鱼(HQ)与大目金枪鱼(DM)聚为一支。蓝鳍金枪鱼(LQ)与马苏金枪鱼(MS)聚为一支, 其中 3 条标准序列 *T. albacares* (JN086153), *T. thynnus* (KF906720)和 *T. obesus* (GU256525)聚为一小支, 与 *T. maccoyii* (KF925362)共同在这一大支下。长鳍金枪鱼(CQ)和 *T. alalunga* (AB101291)的遗传差异与上述 4 种金枪鱼较大, 单独聚为一支。鲣鱼(JY)和 *K. pelamis* (KM605252)单独归为一支, 且和上述 5 种金枪鱼

属遗传距离最远, 亲缘关系也最远。这一结果表明, 16S rRNA 基因只能单独区分出长鳍金枪鱼和鲣鱼, 不能很好区分黄鳍、大目、蓝鳍与马苏金枪鱼, 而且不能对同一物种不同地理群体进行聚类分析。16S rRNA 基因序列相对较为保守, 6 种金枪鱼的遗传距离较为接近, 遗传差异较小。

2.3.2 CO I 基于 CO I 基因构建的 NJ 系统进化树见图 3。图 3 显示, 6 种金枪鱼分为 6 大支, 大西洋大目(dd)、太平洋大目(dt)和印度洋大目(dy)以及 *T. obesus* (GU256525)归为一支, 虽然可以看出有地理群体聚类的趋势(dd-21、dd-25 和 dd-27 聚为一小支等), 但也存在混杂不同地理群体大目金枪鱼的问题

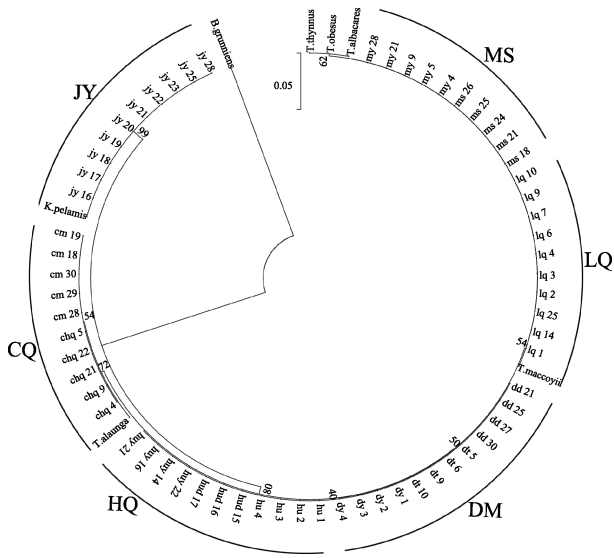


图 2 6 种金枪鱼基于 16S rRNA 基因的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rRNA in six species of tuna gene

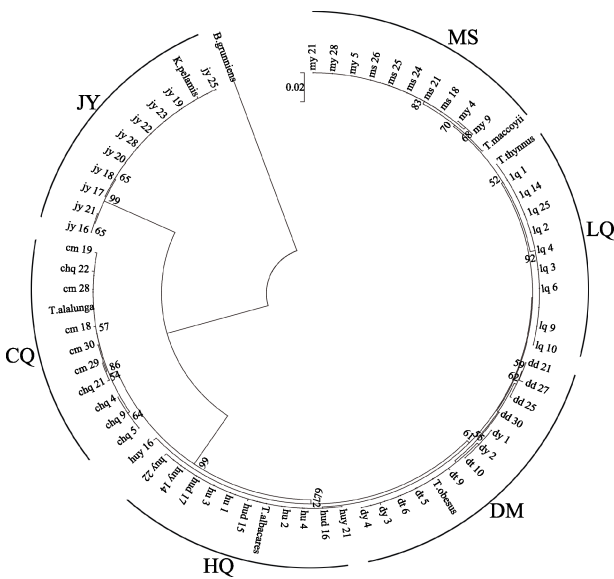


图 3 6 种金枪鱼基于 *CO I* 基因的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *CO I* gene in six species of tuna

(dy 和 dt 相互参杂, dd-30 与它们在同一分支下)。虽然蓝鳍金枪鱼(LQ)和 *T. thynnus* (KF906720)与马苏金枪鱼(MS)遗传距离较为接近,但明显单独成为一支。印度洋马苏(my)和养殖马苏(ms)以及 *T. maccoyii* (KF925362)归为马苏金枪鱼(MS)一大支,但无法从进化树当中明显看出二者因地理位置导致的遗传差异。除了 huy-16 的其他印度洋黄鳍(huy)、大西洋黄鳍(hud)和太平洋黄鳍(hu)以及 *T. albacares*(JN086153)归为黄鳍金枪鱼(HU)一大支,三者同样无法从进化树当中看出明显的因地理位置导致的遗传差异。huy-16 进化分支地位与 HQ、DM、MS 和 LQ 四者并列,这一个体

单独成一支。南太平洋长鳍(chq)和美国长鳍(cm)以及 *T.alalunga* (AB101291)归为长鳍金枪鱼(CQ)一大支,同样无法从进化树明显看出二者因地理位置导致的遗传差异。鲣鱼(JY)和 *K.pelamis* (KM605252)单独归为一大支,且和上述 5 种金枪鱼遗传距离最远,亲缘关系也最远。结果表明, *CO I* 基因能较好区别 6 种金枪鱼,其进化速率与 16S rRNA 基因相比较快,遗传信息较为丰富。

2.3.3 *Cyt b* 基于 *Cyt b* 基因构建的 NJ 系统进化树见图 4,其建树结果与 *CO I* 建树结果大体一致。不同的是,样品 huy-16 在 *Cyt b* 建树结果中归为黄鳍金枪鱼(HU)一大支,且 *Cyt b* 基因建树结果存在一定程度的地理群体聚类的趋势(dd-21、dd-25 和 dd-27 聚为一小支等),但总体而言,无法从进化树中明显看出同种金枪鱼因地理位置导致的遗传差异。结果表明,相比于 16S rRNA 和 *CO I* 基因, *Cyt b* 基因对于 6 种金枪鱼的区分最为准确,基因分化程度较高,区分度较好。

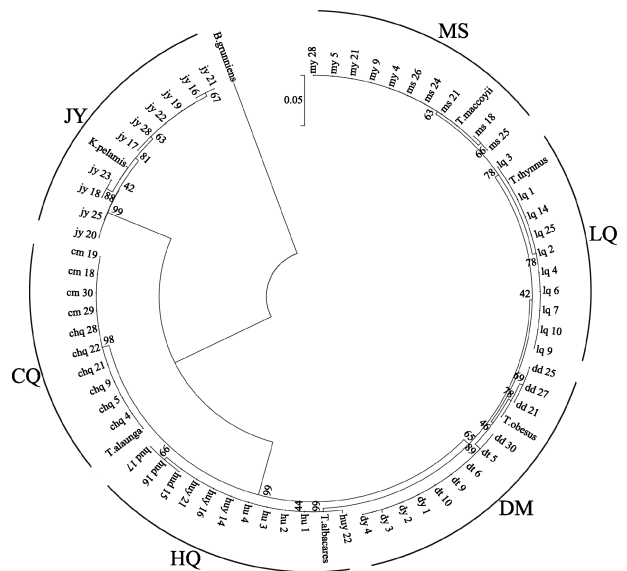


图 4 6 种金枪鱼基于 *Cyt b* 基因的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Cyt b* gene in six species of tuna

3 讨论

随着现代分子生物技术的快速发展,物种鉴定的研究方法已从形态学、生理生化水平发展到分子水平,鉴定的依据从形状、大小、颜色和解剖特征等方面,发展到 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子层面(蒋守富等, 2014; 柳淑芳等, 2016)。基于 DNA 开发的多种分子鉴定方法,已广泛应用于金枪鱼及其易混物种的鉴定中。Liu 等(2016)采用实时荧光 PCR 技术成

功鉴定了马苏、大目、黄鳍、长鳍和正鲣等金枪鱼；Lin 等(2008)建立了多重 PCR 方法，用来区分鲣(*Euthynnus pelamis*)、圆舵鲣(*Auxis rochei*)、扁舵鲣(*Auxis thazard*)、东方狐鲣(*Sarda orientalis*)和鲐(*Euthynnus affinis*)等 5 种小型金枪鱼；Abdullah 等(2016)运用单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)方法将圆舵鲣从金枪鱼属中鉴定出来。近年来，微卫星(Simple sequence repeats, SSRs)分子标记技术越来越多地应用于物种的鉴定和遗传多样性研究，邱凡等(2008)运用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA 标记)和微卫星技术对比分析了太平洋蓝鳍金枪鱼野生群体的遗传多样性，发现微卫星与 RAPD 相比能更好更完善地揭示群体的遗传多样性；Riccioni 等(2010)采用微卫星技术分析了大西洋蓝鳍金枪鱼从 20 世纪初到 2007 年的遗传差异，发现大西洋蓝鳍金枪鱼在空间和时间上保留了高水平的遗传多样性，为蓝鳍金枪鱼的鉴定研究奠定基础。上述技术手段能对特定范围内的金枪鱼进行鉴定，但也在不同程度上存在操作繁琐、鉴定时间长、成本较高等不足。

DNA 条形码是分子鉴定研究中的主要方法，具有很多优点：基本不受样品组织形态的影响；不受样品生命周期的限制；通过基因测序鉴定，准确性高；操作简便，成本低；效率高，可快速鉴定大量样本；可帮助无专业分类学知识的人获得物种信息(律迎春等, 2011)。理想的标准 DNA 条形码片段并不局限于 CO I 基因序列，能有效鉴定物种的 DNA 片段都可以应用。此外，多基因遗传信息的组合使用，能获得更理想的物种系统进化分析结果(Aoyama *et al*, 2001)。针对金枪鱼采用多基因片段组合使用的鉴定方法已成为目前的关注重点，Neils 等(2015)利用 CO I 和 ITS1(内转录间隔 1 区)基因成功识别了地中海的 3 个产卵区的蓝鳍金枪鱼幼体；Lowenstein 等(2009)采用多条 CO I 基因引物鉴定 68 种金枪鱼寿司样本，其中的 22 个样本商品标签与实际物种信息不符，显示了多基因组合使用的思路在金枪鱼物种分子鉴定领域中的广泛应用。邻接法、最大似然法(Maximum likelihood, ML)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)是目前构建系统进化树的主要方法。其中，NJ 法是基于最小进化原理常用的一种算法，具有重建的树相对准确、假设少、计算速度快等优点。故 NJ 法适用于进化距离不大，信息位点少的短序列，广泛用于鲐鱼、鲣鱼和银鱼等遗传进化分析。

本研究以主要渔获海域的 6 种金枪鱼及其易混种为研究对象，采用 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因

序列作为 DNA 条形码进行进化分析，探讨多基因条形码在金枪鱼鉴定研究中的适用性。从实验数据来看，16S rRNA 基因序列变异率仅为 2.08%，远小于 CO I (11.35%)、Cyt b (15.96%)，且其他遗传多样性参数也是 3 种序列中最小的；从建树结果来看，16S rRNA 基因并不能完全区分出 6 种金枪鱼，只能鉴定出长鳍金枪鱼和鲣鱼，不能区分黄鳍和大目金枪鱼，也不能区分蓝鳍与马苏金枪鱼，更不能获得同一物种因地理位置导致的遗传差异。结果表明，CO I 和 Cyt b 基因的进化速率较 16S rRNA 基因快，16S rRNA 则相对保守，这在狭鳕(*Theragra chalcogramma*)、太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)等 4 种鳕鱼的遗传分析上也有类似结果(毕潇潇等, 2009)。

单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数是衡量一个物种群体多样性的非常重要的指标(Vrijenhoek, 1994)。单倍型多样性指数是群体变异程度的重要指标，单倍型多样性高的群体说明其遗传多样性高，遗传资源丰富；而核苷酸多样性指数小，说明核苷酸变异程度较低，表明了遗传物质的稳定性。Cyt b 序列的单倍型多样性指数(H_d)和平均核苷酸差异数(k)均低于 CO I，而核苷酸多样性指数(π)却高于 CO I，说明金枪鱼中 Cyt b 基因较 CO I 基因序列变异速率快，这与鲷属(*Pampus*)鱼类、波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)和大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)中的规律相似(孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014; 李大命等, 2017)。相比之下，CO I 基因序列进化速率较慢，且比 Cyt b 拥有更多系统发育信息，更适合解析亲缘关系密切的分类类群(莫帮辉等, 2008)。相比而言，Cyt b 进化速度适中，可以用于分析物种种内，甚至种属科间的进化遗传信息，有较强的适用性(辛翠娜等, 2009)。从建树结果来看，针对 huy-16 样本，Cyt b 序列建树结果将 huy-16 归为黄鳍金枪鱼(HQ)这一大支；而 CO I 序列建树结果显示，该样本单独归为一支，独立于黄鳍、马苏、蓝鳍和大目金枪鱼之外，无法成功鉴定该样品。关于样品 huy-16，16S rRNA 和 Cyt b 序列建树结果都显示为黄鳍金枪鱼，而该样本来源经形态学鉴定，确属黄鳍金枪鱼，而从 CO I 序列建树结果并未得出这一结论，所以从该角度来看，Cyt b 序列建树结果要比 CO I 序列建树结果要准确。CO I、Cyt b 和 16S rRNA 3 种基因都无法从进化树中看出同种金枪鱼因地理位置导致的遗传差异，无法进行同一物种不同地理群体的聚类分析，但 CO I 与 Cyt b 在一定程度上体现了地理聚类趋势，可作为群体遗传进化研究的辅助参考。

目前，国内外研究多采用 CO I 基因作为鱼类分

子鉴定及进化分析的目标基因, 也有学者认为, 如果仅以一种基因作为参考序列, 有可能导致鉴定结果发生偏差, 因此, 建议同时使用多种基因进行研究(Page *et al*, 2010; Krück *et al*, 2013), 这一观点已在石斑鱼和河鲀中得到证实(陈双雅等, 2012; 李楠等, 2018)。本研究结果进一步表明, 对金枪鱼这种大洋性鱼类, 不宜单独使用单一基因作为鉴定依据, 建议 *CO I* 序列与 *Cyt b* 序列联合用于金枪鱼及其制品的物种鉴定研究。

参 考 文 献

- Abdullah A, Rehbein H. The differentiation of tuna (family: Scombridae) products through the PCR-based analysis of the Cytochrome b gene and parvalbumin introns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(2): 456–464
- Aoyama J, Nishida M, Tsukamoto K. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, *Genus anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(3): 450–459
- Barrett RDH, Hebert PDN. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 2005, 83(3): 481–491
- Becker RA, Sales NG, Santos GM, *et al*. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. *Journal of Fish Biology*, 2015, 87(1): 159–168
- Bi XX, Gao TX, Xiao YS, *et al*. Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, *CO I* and *Cyt b* gene fragments in four species of Gadidae fish. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(3): 46–52 [毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳕鱼线粒体 16S rRNA、*CO I* 和 *Cyt b* 基因片段序列的比较研究. 南方水产, 2009, 5(3): 46–52]
- Chapela MJ, Sotelo CG, Calo-Mata P, *et al*. Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Food Sciences*, 2002, 67(5): 1672–1676
- Chen SY, Wang JH, Chen WL, *et al*. Application of 16S rRNA gene and *CO I* gene sequence analysis in species identification of grouper. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 124–130 [陈双雅, 王嘉鹤, 陈伟玲, 等. 16S rRNA 基因和 *CO I* 基因序列分析在石斑鱼物种鉴定中的应用. 生物技术通报, 2012(10): 124–130]
- Chen WB, Yan TY, Peng J, *et al*. Identification of *Anguilla rostrata*, *Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica* using DNA barcoding based on 16S rRNA gene. *Food Science*, 2017, 38(4): 283–289 [陈文炳, 缪婷玉, 彭娟, 等. 基于 16S rRNA 基因 DNA 条形码鉴定美洲鳗、欧洲鳗、日本鳗. 食品科学, 2017, 38(4): 283–289]
- Cui WT, Liu LQ, Li HM, *et al*. Phylogenetic study of Octopodinae in the China Seas based on *CO II* partial sequences. *Progress in Fishery Science*, 2013, 34(3): 21–28 [崔文涛, 刘立芹, 李红梅, 等. 基于 *CO II* 基因序列的中国近海 12 种蛸亚科动物的分子系统进化研究. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 21–28]
- Dai XJ, Xu LX. The primary color map of the world tuna fishery catch species. Beijing: Ocean Press, 2007 [戴小杰, 许柳雄. 世界金枪鱼渔业渔获物种原色图鉴. 北京: 海洋出版社, 2007]
- Fang JM, Huang FX, Zheng ZX, *et al*. Nutritional value and processing of tuna. *Fisheries Science and Technology*, 2006(2): 8–13 [方健民, 黄富雄, 郑钟新, 等. 金枪鱼的营养价值和加工利用. 水产科技, 2006(2): 8–13]
- Hanner R, Becker S, Ivanova NV, *et al*. FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*, 2011, 22(S1): 106–122
- Hu J, Hou XY, Yin SW, *et al*. Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the South China Sea revealed by *CO I* and *Cytb* gene analyses. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008–1016 [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA *CO I* 和 *Cytb* 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1008–1016]
- Inoue J, Miya M, Tsukamoto K, *et al*. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: Resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(2): 275–285
- Jiang SF, Zhang XP, He YY. Application progress on rapid detection technology of parasites in food. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(1): 95–100 [蒋守富, 张小萍, 何艳燕. 食品寄生虫快速检测技术的应用进展. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 95–100]
- Karim A, Iqbal A, Akhtar R, *et al*. Barcoding of fresh water fishes from Pakistan. *DNA Sequence*, 2016, 27(4): 2685–2688
- Khedkar GD, Jamdade R, Naik S, *et al*. DNA barcodes for the fishes of the Narmada, one of India's longest rivers. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101460
- Li DM, Li K, Zhang TQ, *et al*. Genetic polymorphism analysis of *Cyt b* and *CO I* gene sequences of *Protosalanx hyalocranium* in the Hongze Lake. *Progress in Fishery Science*, 2017, 38(6): 25–31 [李大命, 李康, 张彤晴, 等. 洪泽湖大银鱼 (*Protosalanx hyalocranium*) *Cyt b* 和 *CO I* 基因序列多态性分析. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 25–31]
- Li N, Wang JH, Han CH, *et al*. Application of *CO I* and *Cyt b* gene in species identification of pufferfish. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(1): 6–11 [李楠, 王佳慧, 韩春卉, 等. *CO I* 及 *Cyt b* 基因对河鲀鱼种鉴定的适用性研究. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 6–11]
- Lin WF, Hwang DF. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito. *Food Control*, 2008,

- 19(9): 879–885
- Liu S, Xu K, Wu Z, *et al.* Identification of five highly priced tuna species by quantitative real-time polymerase chain reaction. *DNA Sequence*, 2016, 27(5): 1–10
- Liu SF, Li XR, Du TF, *et al.* DNA barcoding and electronic microarray for common fish species in Shandong coastal waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 777–790 [柳淑芳, 李献儒, 杜腾飞, 等. 山东近海习见鱼类 DNA 条形码及其电子芯片分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 777–790]
- Lowenstein JH, Amato G, Kolokotronis SO. The real maccoyii: Identifying tuna sushi with DNA barcodes – Contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7866
- Lü YC, Zuo T, Tang QJ, *et al.* Construction and application of DNA barcoding in sea cucumber Holothurians. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 782–789 [律迎春, 左涛, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 782–789]
- Marko PB, Lee SC, Rice AM. Fisheries: Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 2004, 430(6997): 309–310
- Mo BH, Qu L, Han S, *et al.* DNA barcoding identification I. Research progress and applied perspective of DNA barcoding. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(2): 303–306 [莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景. *四川动物*, 2008, 27(2): 303–306]
- Neils PG, Haritz A, Francisco A, *et al.* Molecular identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, Scombridae) larvae and development of a DNA character-based identification key for Mediterranean scombrids. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130407
- Krück NC, Tibbetts IR, Ward RD, *et al.* Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). *Fisheries Research*, 2013, 143: 39–46
- Qiu F, Su YQ, Fu MN, *et al.* Primary research of genetic diversity of the natural stock of Pacific bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2008(4): 585–590 [邱凡, 苏永全, 傅蒙娜, 等. 太平洋蓝鳍金枪鱼野生群体遗传多样性的初步研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008(4): 585–590]
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, *et al.* Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2100–2107
- Sun C, Liu ZH, Yang AG, *et al.* Genetic analysis of mitochondrial *CO I* and 16S rRNA gene fragments in four *Potamocorbula* species. *Progress in Fishery Science*, 2014, 35(1): 82–90 [孙超, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 4 种河蓝蛤线粒体 *CO I* 和 16S rRNA 基因序列的种间遗传分析. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 82–90]
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Population genetic structure of three *Pampus* species from East China Sea inferred by *CO I* and *Cyt b* sequences. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 398–404 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 利用 *CO I* 和 *Cyt b* 序列探讨东海区 3 种鲳属鱼类的种群遗传结构. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 398–404]
- Page TJ, Hughes JM. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(9): 2093–2122
- Vrijenhoek RC. Genetic diversity and fitness in small populations. *Conservation Genetics*, 1994, 68: 37–53
- Wang M, Liu W, Huang H, *et al.* Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding. *Food Science*, 2015, 36(20): 247–251 [王敏, 刘荻, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用. *食品科学*, 2015, 36(20): 247–251]
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 329–356
- Xin CN, Peng JJ, Wang Y, *et al.* Application of *Cyt b* gene as a molecular marker in species identification. *Chinese Journal of Wildlife*, 2009, 30(4): 217–221 [辛翠娜, 彭建军, 王莹, 等. *Cyt b* 分子标记技术在物种鉴定中的应用. *野生动物杂志*, 2009, 30(4): 217–221]
- Xu KH, Zhao QL, Liao MT, *et al.* Research of relationship between texture and sensory evaluation of tuna. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(12): 190–197 [徐坤华, 赵巧灵, 廖明涛, 等. 金枪鱼质构特性与感官评价相关性研究. *中国食品学报*, 2014, 14(12): 190–197]

(编辑 冯小花)

Applicability Analysis of Mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA Genes in Identification of Six Tuna Species

LU Jianping^{1,2}, YAO Lin², XIN Hongmei^{2,3}, QU Meng², JIANG Yanhua²,
LI Fengling², GUO Yingying², WANG Lianzhu^{2①}, XU Jiachao^{1①}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000;

2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

3. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116000)

Abstract Tuna is rich in nutrients and one of three major fish recommended by the International Nutrition Society. Large tuna such as *Thunnus albacares*, *T. maccoyii*, *T. obesus*, and *T. thynnus* are used as top-grade aquatic products, mainly in the form of sushi or other fresh fish products. Small tuna such as *T. alalunga* and *Katsuwonus pelamis* are mainly used in canned tuna and processed katsuobushi. The price of different species of tuna varies greatly, especially because selling tuna without the head or skin can lead to mislabeling and substandard products, which harms the interests of consumers and undermines market functions. This study was aimed at the identification *T. albacares*, *T. maccoyii*, *T. obesus*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, and *K. pelamis*. Using tuna DNA as a template, three pairs of universal primers were used to amplify and sequence the DNA fragments of three genes (16S rRNA, *Cyt b*, and *CO I*) from six species of tuna. The sequencing results were manually corrected to remove the primer regions, which were compared with reference sequences in GenBank by BLAST analysis on the National Center for Biotechnology Information website. The *CO I* gene was analyzed by the Barcode of Life Data System (www.boldsystems.org). As a result, DNA sequences of 16S rRNA (576 bp), *Cyt b* (652 bp) and *CO I* (307 bp) were obtained from 63 samples of six species of tuna. Genetic diversity parameters such as Number of Haplotypes (*h*), Haplotype diversity (*H_d*), Average number of nucleoside difference (*k*), and Nucleotide diversity (π) were calculated by DnaSP 5.10 software. C-conserved sites, PI-parsimony-informative sites, and V-variable sites were calculated using Mega 7.0 software, which performed 1000 bootstrap tests with neighbor joining. The Kimura 2-parameter model was used to construct a phylogenetic evolutionary tree. The experimental results showed that 16S rRNA was relatively conservative and could not distinguish among the six tuna species. *Cyt b* and *CO I* could be used to identify the species. However, it is possible that *CO I* and *Cyt b* sequences can be used together as a DNA barcode for tuna research. A multi-gene DNA-barcode species-identification method that provides technical support for the identification of tuna and its fish products would be of great significance in promoting the accurate identification and healthy development of aquatic products.

Key words Tuna; Molecular identification; *CO I*; *Cyt b*; 16S rRNA

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn; XU Jiachao, E-mail: xujia@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190509001

http://www.yykxjz.cn/

于鹏, 叶海斌, 单洪伟, 马甦, 王腾. 凡纳滨对虾养殖体系中群体感应淬灭菌的筛选、安全性评估及发酵条件优化. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 82-91

Yu P, Ye HB, Shan HW, Ma S, Wang T. Screening, safety evaluation and fermentation conditions optimization of quorum quenching bacteria from *Litopenaeus vannamei* culture system. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 82-91

凡纳滨对虾养殖体系中群体感应淬灭菌的筛选、 安全性评估及发酵条件优化*



于 鹏^{1,2} 叶海斌² 单洪伟^{1①} 马 甦¹ 王 腾¹

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003;

2. 山东省海水养殖病害防治重点实验室 山东省海洋生物研究院 青岛 266104)

摘要 从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖体系中筛选得到具有群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)活性的潜在功能菌,并对菌株进行 16S rDNA 鉴定、安全性评估及发酵条件优化。采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) A136 液体 X-gal 法进行活性菌株筛选,发现 2 株细菌(BDZ5 和 W1B)的发酵液对信号分子己酰基高丝氨酸内酯(C₆-HSL)具有显著的降解作用,但经沸水浴处理后均丧失降解活性。经 16S rDNA 基因序列分析,菌株 BDZ5 和 W1B 分别被鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和科贝特氏菌属(*Cobetia*)。安全性评估结果显示,菌株 BDZ5 和 W1B 均无溶血性,且对多数抗生素具有敏感性,注射 2 株活性菌未提高凡纳滨对虾死亡率,且对凡纳滨对虾血清免疫酶活性无显著影响。单因素条件优化结果显示,在起始 pH 为 7.0、盐度为 20、0.0005%的 MnCl₂ 条件下培养 48 h 后,菌株 BDZ5 达到最大生长量;在起始 pH 为 6.0、盐度为 40、0.05%的 CaCl₂ 条件下培养 48 h,菌株 W1B 达到最大生长量。2 株菌的最适信号分子 C₆-HSL 降解条件与其生长条件有所不同,在起始 pH 为 7.5、盐度为 30、0.0005%的 MnCl₂ 条件下培养 48 h,2 株活性菌对信号分子 C₆-HSL 的降解率达到最大值。研究表明,菌株 BDZ5 和 W1B 可作为益生菌应用于水产养殖,为基于 QQ 角度防治对虾细菌性病害提供优良菌种。

关键词 凡纳滨对虾;细菌性病害防治;群体感应淬灭菌株;安全性;条件优化

中图分类号 S968.22 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0010-10

随着凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖业的不断发展,急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) (Soto-Rodriguez *et al*, 2015)、发光病(Luminous Bacterial Disease) (Lavilla-Pitogo *et al*, 1990)、红体病(Red Body Disease) (Cao *et al*, 2014)等细菌性病害频发,给对虾

养殖业造成了严重的经济损失,阻碍了其进一步健康发展。使用抗菌药物是控制细菌性病害的主要方法,但会造成病原菌耐药性的产生,并对生态环境及人类健康有危害(Elmahdi *et al*, 2016)。因此,亟待探索新的环境友好型的对虾细菌性病害防治手段。

群体感应(Quorum sensing, QS)是广泛存在于细

* 山东省自然科学基金项目(ZR2018BC051)和山东省海水养殖病害防治重点实验室开放课题(KF201903)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018BC051), and the Open Fund of Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture(KF201903)]. 于 鹏, E-mail: yupeng5151@stu.ouc.edu.cn

① 通讯作者:单洪伟, E-mail: shanhongwei@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-05-09, 收修改稿日期: 2019-07-02

菌之间的一种特殊的通讯手段,细菌可以通过向环境中释放特定的信号分子,如不同碳链长度的N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)、自诱导肽(Autoinducing peptides, AIPs)和自诱导物-2(Autoinducer-2, AI-2)等,并通过感知信号分子浓度的变化调控特定基因的表达(Whiteley *et al*, 2017)。对虾养殖过程中常见的病原菌包括哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、坎贝氏弧菌(*V. campbellii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)等(Austin *et al*, 2006; Haldar *et al*, 2011; Joshi *et al*, 2014)。Ng等(2009)研究表明,多数病原菌的毒力因子表达及致病性的产生与其QS系统具有密切联系。抑制病原菌的QS系统,即群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)(Grandclément *et al*, 2015)可以在不杀死病原菌的前提下减轻其致病性(王岩等, 2017)。Tinh等(2007)曾从凡纳滨对虾体内筛选得到3株QQ菌,并发现该3株菌能对哈维氏弧菌产生的信号分子起到降解作用,进而调控其代谢活动。Vinoj等(2014)研究发现,具有QQ功能的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)能有效减少由副溶血弧菌引起的印度明对虾(*Fenneropenaeus indicus*)死亡率。这些研究均表明,基于QQ角度防治水产动物细菌性病害问题的可行性及巨大潜力。

本研究以根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) A136株为报告菌,在实验室已筛选得到的菌株基础上,进一步采用Tang等(2013)所构建的A136液体X-gal法,从凡纳滨对虾体内及养殖环境中筛选到具有QQ功能的活性菌株,探讨了活性菌株的安全性,并通过单因素实验探究了不同培养条件对活性菌株生长及其对己酰基高丝氨酸内酯(C₆-HSL)降解率的影响,为基于QQ角度防治对虾细菌性病害提供优良菌种和基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 群体感应淬灭菌株的筛选

从健康凡纳滨对虾体内及养殖环境中分离出纯菌株后,以根癌农杆菌A136株为报告菌,参照并改进Tang等(2013)所构建的A136液体X-gal法进行QQ菌的筛选。A136于培养基(蛋白胨10g、酵母粉5g、NaCl 10g、H₂O 1000ml、pH 7.0;灭菌后加入终浓度为50 μg/ml的壮观霉素和终浓度为4.5 μg/ml的四环素)中活化24h后,调节OD₆₀₀=0.5,并按1%接种量接种于新的A136培养基中,加入终浓度为250 μg/ml的5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)共同培养24h。待测菌株在LB液体培养基(蛋白胨10g、酵母

粉5g、NaCl 30g、H₂O 1000ml、pH 7.2~7.4)中活化24h后稀释至OD_{600 nm}=0.5,然后,按2%接种量接种于新的LB液体培养基中培养24h。取178 μl培养好的待测菌发酵液与2 μl 5 mmol/L的信号分子C₆-HSL(Cayman Chemical公司,美国)及20 μl哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPEs)缓冲液(1 mol/L, pH 6.7)混合,制成孵育体系,并于30℃条件下孵育。阳性对照(Positive control, PC)组的孵育体系中,以178 μl无菌LB液体培养基代替待测菌发酵液,阴性对照(Negative control, NC)组中无信号分子C₆-HSL。孵育24h后,离心(9570×g, 10 min)取上清液10 μl,与190 μl培养好的A136菌液混合加入96孔板中培养12h。测定混合体系的OD_{630 nm}和OD_{490 nm},根据公式:

$$\beta\text{-gal} = \frac{0.653 \times \text{OD}_{490 \text{ nm}} - \text{OD}_{630 \text{ nm}}}{0.267 \times \text{OD}_{630 \text{ nm}} - \text{OD}_{490 \text{ nm}}}$$

计算β-gal活性,活性越高表明混合体系中信号分子C₆-HSL的含量越高,即待测菌株的QQ活性越弱。同时,通过检测活性菌株AHL降解活性的耐热性,初步判断活性菌株是否存在AHL降解酶。将筛选出的活性菌株在LB液体培养基中培养24h后,沸水浴处理5 min,再采用A136液体X-gal法检测其C₆-HSL降解活性是否丧失。

1.2 菌株16S rDNA鉴定

测定活性菌株的基因16S rDNA序列,并于NCBI进行基因序列同源性比较分析,利用MEGA 5.0软件邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树。目标菌株的16S rDNA序列由生工生物工程(上海)股份有限公司提取并测定。

1.3 活性菌株的体外安全性评估

1.3.1 溶血性 采用滤纸片法(王晓琳等, 2016)检测活性菌株的溶血性,血琼脂平板培养基购自贝瑞特生物技术(郑州)有限责任公司。将无菌滤纸片置于血琼脂培养基上方,将培养好的活性菌株发酵液稀释至OD_{600 nm}=1.0后,取10 μl加在滤纸片上,每个功能菌重复3次,30℃条件下培养24h,观察血琼脂培养基上是否有溶血圈产生。

1.3.2 药敏性 采用抗菌药物药敏纸片琼脂扩散法(K-B法)(王岚等, 2017)进行活性菌株药敏性实验,药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。将活性菌株接入LB液体培养基中培养24h后,取100 μl OD_{600 nm}=1.0的发酵液均匀涂布于LB固体培养基上,并将药敏纸片贴于上方,每种药敏纸片重复3次。在30℃条件下,培养24h后,观察是否出现抑菌圈并用游标卡尺测量

抑菌圈直径。参照CLSI标准-2011的标准判断菌株对各抗生素的敏感性。

1.4 活性菌株的体内安全性评估

1.4.1 实验对虾与菌株 实验凡纳滨对虾购自山东乳山某对虾养殖场,平均体长为(5.7±0.4) cm,平均体重为(1.9±0.9) g,体色正常,游泳活泼,暂养7 d后进行实验。

从上述实验中筛选得到的菌株 BDZ5 和 W1B 作为实验材料,以实验室前期保存的副溶血弧菌为 PC 组。将各菌株于 LB 液体培养基中培养 24 h,然后离心(1531×g, 10 min),弃上清液,并用无菌生理盐水稀释至浓度为 1×10^6 和 1×10^4 CFU/ml 的菌悬液。

1.4.2 实验设计 采用肌肉注射的方法进行体内安全性评估,注射部位为凡纳滨对虾第Ⅳ、Ⅴ腹节之间,注射剂量为 50 μl/尾。实验共分为 7 组,阴性对照组(NC 组)注射等剂量的无菌生理盐水; L-BDZ5、L-W1B 和 L-PC 组为低浓度(Low, L-)菌液组,分别注射浓度为 1×10^4 CFU/ml 的 BDZ5、W1B 和副溶血弧菌菌悬液; H-BDZ5、H-W1B 和 H-PC 组为高浓度(High, H-)菌液组,即分别注射浓度为 1×10^6 CFU/ml 的相应菌悬液。每组设置 3 个重复,每个重复放 15 只虾。实验持续 96 h,实验期间,不投喂,不换水,连续充氧。

1.4.3 样本采集与指标测定 实验期间,定期观察、记录凡纳滨对虾的死亡情况并计算累积死亡率。在实验的第 96 小时采集各实验组对虾的血清,用于免疫指标的测定。免疫指标包括超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)、溶菌酶(LZM)活力和抗菌酶活力(U_a)。其中, SOD、NOS 和 LZM 活力采用南京建成生物科技有限公司试剂盒测定; U_a 的测定参照 Xu 等(2013)的方法,将哈维氏弧菌用磷酸钾盐缓冲溶液(1 mol/L, pH=6.4)稀释成 $OD_{570\text{nm}}=0.4$ 的菌悬液,在试管(冰水浴条件下)中加入 3 ml 哈维氏弧菌菌悬液和 50 μl 血清,混匀后立即测定其 $OD_{570\text{nm}}$ 值 A_1 ,再将试管于 37℃ 条件下水浴 30 min,立即取出并测定其 $OD_{570\text{nm}}$ 值 A_2 ,根据公式: $U_a=[(A_1-A_2)/A_2]^{1/2}$ 计算 U_a 。

1.5 活性菌株发酵条件优化

以 LB 液体培养基为基础培养基,采用分光光度计法探究不同发酵条件对菌株生长的影响,采用 1.1 中的 A136 液体 X-gal 法探究不同发酵条件对菌株降解信号分子 C_6 -HSL 能力的影响。

培养时间:保持其他条件一致,设置 12、24、36、48 和 60 h 共 5 个发酵时间,在 28℃、180 r/min

条件下,培养以探究功能菌的最适培养时间。

起始 pH:设置 5.0、6.0、7.0、7.5 和 8.0 共 5 个起始 pH,其他条件一致,在 28℃、180 r/min 条件下培养 48 h,以确定最适起始 pH。

盐度:向培养基中添加 NaCl,设置 0、10、20、30 和 40 共 5 个盐度,在其他发酵条件及发酵时间一致的情况下,探究最适发酵盐度。

金属离子:参照叶云峰等(2011)的方法,根据菌株对 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 利用情况的差异,按 0.5% 的量加入 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,按 0.05% 的量加入 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $CaCl_2$,按 0.0005% 的量加入 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MnCl_2$,保持其他发酵条件及发酵时间一致,确定最适发酵金属离子。

1.6 数据统计与分析

实验数据均采用平均值±标准差(Mean±SD),运用 SPSS 22.0 软件进行数据统计与分析。分析之前测试数据的正态性(Shapiro-wilk test)和方差齐性(Levene's test),若数据不具有方差齐性,则对数据进行 lg 转化并进一步测试。采用 Tukey 多重比较检验对符合正态分布和方差齐性的数据进行单因素方差(One-way ANOVA)分析。对于不符合正态分布及 lg 转化后仍不具有方差齐性的数据,采用非参数检验并通过 Kruskal-Wallis 测试进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 表示各组数据差异显著。

2 结果与分析

2.1 群体感应淬灭活性菌株的筛选

经 A136 液体 X-gal 法筛选发现,2 株细菌(BDZ5 和 W1B)的菌液对信号分子 C_6 -HSL 具有显著的降解作用($P < 0.05$)(图 1),且经沸水处理后,2 株 QQ 活性菌株均丧失了 C_6 -HSL 降解活性。

2.2 活性菌株 16S rDNA 鉴定结果

菌株 BDZ5 和 W1B 的系统发育树见图 2。从图 2 可以看出, BDZ5 被鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*),且与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)具有最高的相似度(100%), W1B 被鉴定为科贝特氏菌属(*Cobetia*),且与海科贝特氏菌(*C. marina*)亲缘关系最近(98%)。

2.3 体外安全性评估结果

从图 3 可以看出,菌株 BDZ5 和菌株 W1B 在血平板上无明显的溶血现象,表明菌株 BDZ5 和 W1B 在该实验条件下不产生溶血毒素。药物敏感性实验结果显示(表 1),菌株 BDZ5 对头孢氨苄(Cephalexin)、头

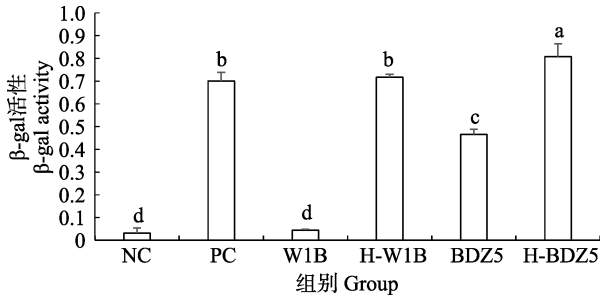


图 1 2 株活性菌株菌液的标准化 β-半乳糖苷酶(β-gal)活性
Fig.1 The normalized β-galactosidase (β-gal) activity of two bacteria

H-: 沸水浴后的菌液; PC: 阳性对照组; NC: 阴性对照组。不同字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)
H-: The bacteria after boiling water bath; PC: Positive control; NC: Negative control. Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

孢唑林(Cefamezin)、头孢拉定(Cefradine)等 13 种抗生素高度敏感; 对苯唑西林(Oxacillin)中度敏感; 菌株 W1B 对羧苄西林(Carbenicillin)、头孢他啶(Ceftazidime)、头孢曲松(Ceftriaxone)等 8 种抗生素高度敏感; 对氨苄西林(Ampicillin)、哌拉西林(Piperacillin)、头孢氨苄(Cephalexin)等 8 种抗生素中度敏感。

2.4 感染细菌后各组凡纳滨对虾累积死亡率

注射感染 96 h 后, L-BDZ5、H-BDZ5、L-W1B 和 H-W1B 组凡纳滨对虾累积死亡率均低于 NC 组, 且 H-W1B 组最低(图 4), 但与 NC 组相比无显著差异($P > 0.05$)。L-PC 和 H-PC 组累积死亡率均高于 NC 组, 且 H-PC 组最高, 与 NC 组之间相比无显著差异($P > 0.05$)。此外, H-PC 组的凡纳滨对虾累积死亡率显著高于 H-W1B 组($P < 0.05$)。

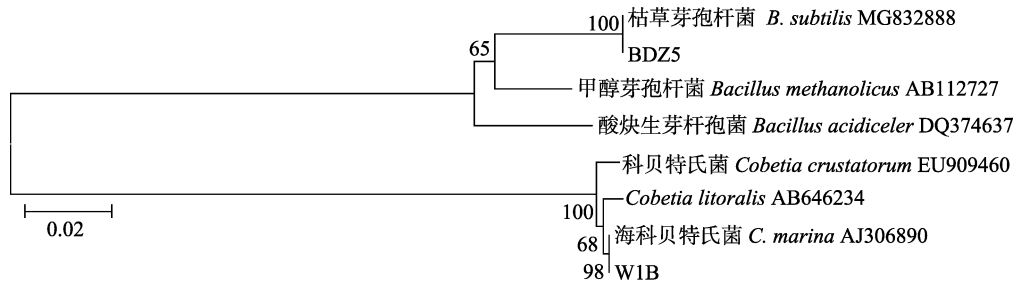


图 2 菌株 BDZ5 和 W1B 基于 Neighbor-Joining 方法的 16S rDNA 基因序列系统发育树(比例尺代表遗传距离)
Fig.2 Phylogenetic tree of strains BDZ5 and W1B based on concatenated sequences of 16S rDNA genes using Neighbor-Joining method (The scale represents the genetic distance)

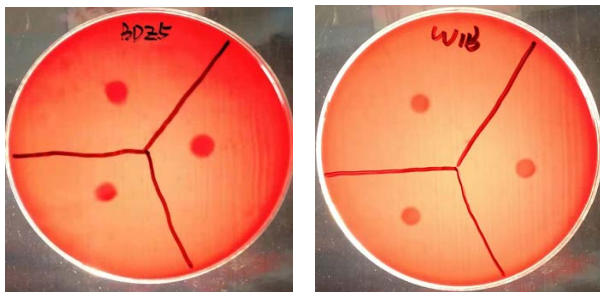


图 3 菌株 BDZ5 和 W1B 溶血性实验
Fig.3 The hemolytic test of strains BDZ5 and W1B

2.5 感染细菌后各组对虾血清免疫酶活性

注射 1×10^4 CFU/ml 的 BDZ5 菌悬液使凡纳滨对虾血清中 SOD 活性显著提高($P < 0.05$)(图 5A), 其余各组与 NC 组相比无显著差异($P > 0.05$); 注射不同浓度的 BDZ5 和 W1B 菌悬液对凡纳滨对虾血清中的 NOS 活性无显著影响($P > 0.05$)(图 5B), 但观察到 H-PC 组凡纳滨对虾血清中 NOS 活性显著高于 NC 组($P < 0.05$);

各组凡纳滨对虾血清中 LZM 活性与 NC 组相比均无显著差异($P > 0.05$)(图 5C), 但 H-W1B 组的 LZM 活性显著高于 H-PC 组($P < 0.05$); 注射不同浓度的 BDZ5 和 W1B 菌悬液对凡纳滨对虾血清中的抗菌酶活性无显著影响($P > 0.05$)(图 5D), 但注射 1×10^6 CFU/ml 的副溶血弧菌菌悬液使凡纳滨对虾血清中抗菌酶活性显著降低($P < 0.05$)。

2.6 培养条件优化结果

随着培养时间的延长, 菌株 BDZ5 和 W1B 的生长及信号分子 C_6 -HSL 降解率均逐渐提高(图 6A、图 7A), 48 h 时达到最高, 继续延长培养时间, 菌株 BDZ5 和 W1B 的生长及信号分子 C_6 -HSL 降解率呈下降趋势。起始 pH 为 7.0 时, 最有利于菌株 BDZ5 生长(图 6B); 起始 pH 为 7.5 时, 菌株 BDZ5 的信号分子 C_6 -HSL 降解率达到最高。起始 pH 为 6 时, 菌株 W1B 生长最好(图 7B); 起始 pH 为 7.5 时, 菌株 W1B 对信号分子 C_6 -HSL 的降解率最高。菌株 BDZ5 的生长随盐度

表1 菌株BDZ5和W1B药敏性实验结果
Tab.1 The antibiotic susceptibility test result of strains BDZ5 and W1B

抗生素 Antibiotics	纸片含药量 Drug content Piece	BDZ5 株抑菌 圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	判定结果 Judgement result	W1B 株抑菌 圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	判定结果 Judgement result
青霉素 G 纸片 Penicillin (P)	10 U	9.46	R	11.41	R
苯唑西林 Oxacillin	1	12.83	I	0	R
氨苄西林 Ampicillin (AM)	10	9.49	R	14.32	I
羧苄西林 Carbenicillin	100	11.95	R	23.29	S
哌拉西林 Piperacillin	100	12.17	R	14.21	I
头孢氨苄 Cephalexin	30	32.09	S	18.63	I
头孢唑啉 Cefamezin (CZ)	30	37.72	S	17.68	I
头孢拉定 Cefradine (RAD)	30	34.60	S	17.78	I
头孢呋辛 Cefuroxime	30	28.76	S	17.29	I
头孢他啶 Ceftazidime (CAZ)	30	26.69	S	27.64	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	31.34	S	22.20	S
头孢哌酮 Cefoperazone (CFP)	75	27.99	S	17.26	I
麦迪霉素 Midecamycinum	30	33.83	S	23.17	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	25.34	S	23.74	S
氧氟沙星 Ofloxacin (OFX)	5	28.78	S	26.97	S
环丙沙星 Ciprofloxacin (CIP)	5	33.65	S	30.73	S
万古霉素 Vancomycin	30	20.34	S	0	R
多粘菌素 B Polymyxin B (PB)	300 IU	0	R	11.08	R
复方新诺明 Compound Sulfamethoxazole	23.75/1.25	24.85	S	16.81	R
呋喃唑酮(痢特灵) Furazolidone	100	10.89	R	14.95	I

注：R：耐药；I：中度敏感；S：敏感

Note: R: Resistance; I: Moderate sensitivity; S: Sensitive

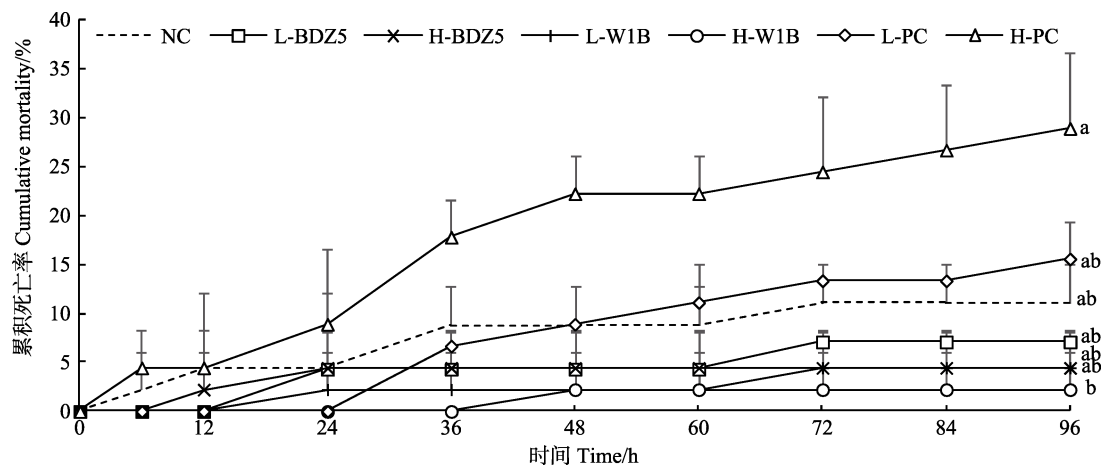


图4 感染细菌后各组对虾累积死亡率

Fig.4 Cumulative mortality of shrimp in each group after infection of bacteria

PC: 阳性对照组; NC: 阴性对照组。96 h 时不同字母表示各组间差异显著 ($P < 0.05$)

PC: Positive control; NC: Negative control. Different letters at 96 h indicate significant difference between the groups ($P < 0.05$)

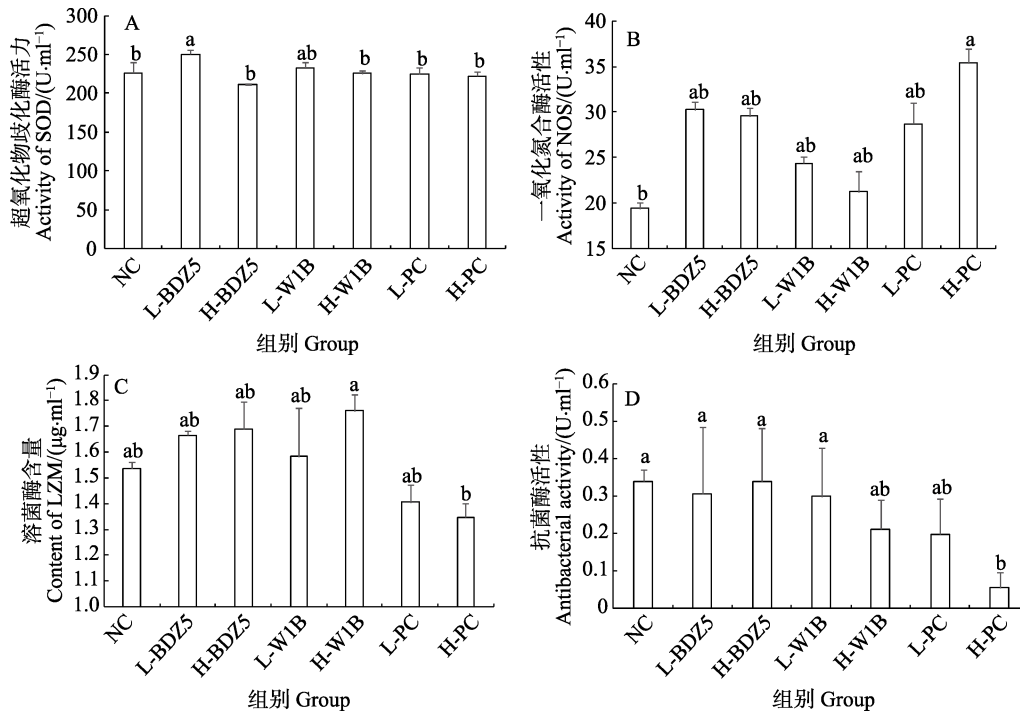


图 5 感染细菌后各组对虾血清超氧化物歧化酶(A), 一氧化氮合酶(B), 溶菌酶(C)和抗菌酶(D)活性
Fig.5 Activities of shrimp serum superoxide dismutase (A), nitric oxide synthase (B), lysozyme (C) and antibacterial (D) in each group after infection of bacteria

PC: 阳性对照组; NC: 阴性对照组。不同字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)

PC: Positive control; NC: Negative control. Different letters indicate significant difference between the groups ($P < 0.05$)

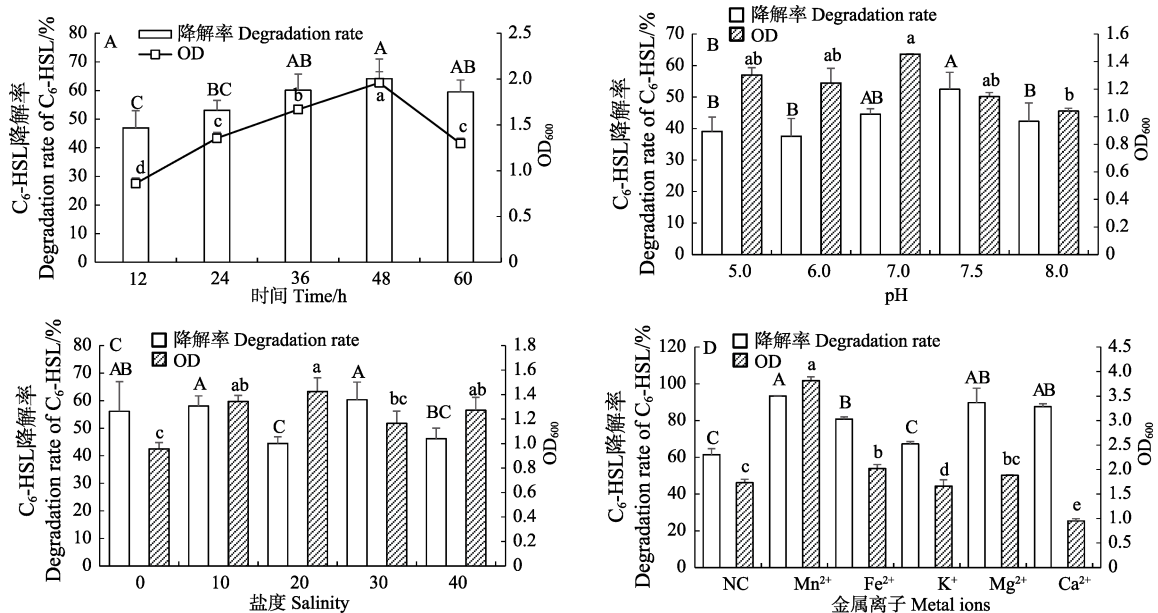


图 6 不同培养时间(A)、pH(B)、盐度(C)和金属离子(D)对菌株 BDZ5 的 C₆-HSL 降解率及生长的影响
Fig.6 Effects of different culture time (A), pH (B), salinity (C) and metal ions (D) on the degradation rate of C₆-HSL and the growth of strain BDZ5

NC: 阴性对照组。不同大写字母表示菌株对信号分子 C₆-HSL 降解率具有显著差异($P < 0.05$),

不同小写字母表示菌株的生长具有显著差异($P < 0.05$), 下同

NC: Negative control. Different uppercase letters indicate that the C₆-HSL degradation rate of the strains with different metal ions were significantly different ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate that the growth of the strains with different metal ions were significantly different ($P < 0.05$), the same as below

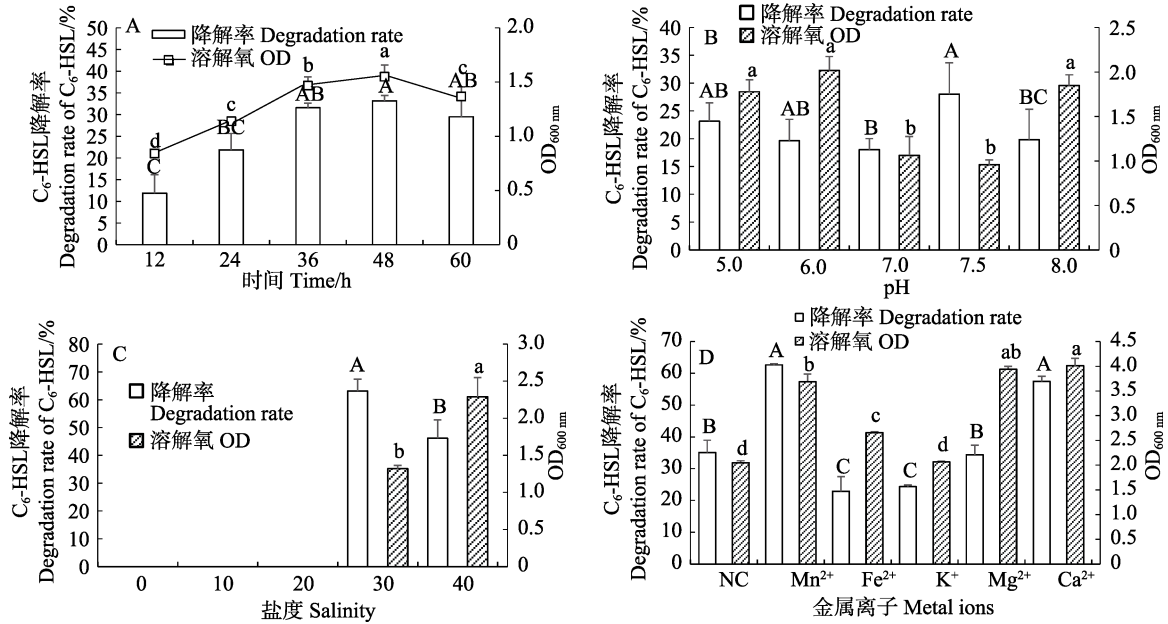


图 7 不同培养时间(A)、pH(B)、盐度(C)和金属离子(D)对菌株 W1B 的 C_6 -HSL 降解率及生长的影响
Fig.7 Effects of different culture time (A), pH (B), salinity (C) and metal ions (D) on the degradation rate of C_6 -HSL and the growth of strain W1B

的提高呈先上升后下降的趋势(图 6C), 盐度为 20 条件下, 菌株 BDZ5 生长情况最好; 当盐度为 30 时, 菌株 BDZ5 对信号分子 C_6 -HSL 的降解率达到最高。菌株 W1B 在盐度 ≤ 20 的条件下无法培养(图 7C), 且在盐度为 40 条件下的生长情况显著好于盐度为 30 ($P < 0.05$); 但在盐度为 30 条件下, 菌株 W1B 对信号分子 C_6 -HSL 的降解率显著高于盐度为 40 ($P < 0.05$)。培养基中添加一定量的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 使菌株 BDZ5 的生长显著提高($P < 0.05$)(图 6D), 其中, Mn^{2+} 的效果最好; 且 Mn^{2+} 能显著提高菌株 BDZ5 对信号分子 C_6 -HSL 的降解能力($P < 0.05$)。 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 均能使菌株 W1B 的生长显著提高($P < 0.05$)(图 7D), 且 Ca^{2+} 效果最好; Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 能提高菌株 W1B 对信号分子 C_6 -HSL 的降解率, 但与对照组相比未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究采用 A136 液体 X-gal 法从健康的凡纳滨对虾体内及养殖环境中筛选得到 2 株对信号分子 C_6 -HSL 具有降解作用的活性菌株 BDZ5 和 W1B, 经鉴定分别为芽孢杆菌属和科贝特氏菌属。近年来, QQ 菌的相关研究已经成为了微生物领域的热点, 但其在水产养殖领域的应用尚处于起步阶段。此前, 已有研究表明, 芽孢杆菌属的某些细菌, 如短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、蜡

样芽孢杆菌(*B. cereus*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)和枯草芽孢杆菌等能抑制某些病原菌的 QS 系统, 降低病原菌的毒力并对水产动物起到保护作用(Bai *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008; 宋增福等, 2013; Tinh *et al.*, 2014; 韦存等, 2018), 本研究结果再一次表明了芽孢杆菌属细菌的 QQ 功能。科贝特氏菌是生活在海水环境中的一种革兰氏阴性菌, 目前, 针对科贝特氏菌的研究相对较少, 尤其是在 QQ 方面。Trentin 等(2011)曾从干扰病原菌 QS 系统的角度探究了海科贝特氏菌对表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)生物膜形成的影响, 但并未给出直接研究结果来证明海科贝特氏菌的 QQ 活性。该研究是首次报道关于科贝特氏菌属对信号分子 C_6 -HSL 具有强降解作用。

本研究发现, 经沸水浴处理后, 2 株功能菌株均丧失了对信号分子 C_6 -HSL 的降解活性。QQ 菌通过 QQ 活性物质起到抑制病原菌 QS 系统的作用, 根据分子量的大小, 可分为大分子 QQ 酶和小分子 QS 阻抑物(于敏等, 2018)。其中, AHL 降解酶是目前大分子 QQ 物质研究的重点, 根据降解机制的不同, AHL 降解酶又分为 AHL 内酯酶、AHL 酰基转移酶和 AHL 氧化还原酶, 多数的 AHL 降解酶不具有耐热性, 因此, 可通过检测功能菌株降解信号分子的耐热性, 初步判断菌株是否具有 AHL 降解酶。本研究结果表明, 功能菌株可能存在 AHL 降解酶活性, 但菌株 BDZ5 和 W1B 各具有何种 QQ 酶仍需进一步深入探讨。

益生菌的安全性问题备受关注, 目前, 还没有形成

完善的安全性评价体系。当前, 针对益生菌安全性的研究主要集中在体外研究和体内研究 2 个方面(郝生宏等, 2004)。溶血实验和药物敏感性实验是体外安全性评估的 2 个重要方面(Baumgartner *et al.*, 1998; 刘勇等, 2011)。某些细菌能释放溶血素引起红细胞膜裂解而导致严重的细菌性疾病(Craig *et al.*, 2017), 甚至对人类具有潜在的危害。本研究中, 枯草芽孢杆菌 BDZ5 和海科贝特氏菌 W1B 均未表现出明显的溶血现象, 表明在实验条件下, 该 2 株菌株均不产生溶血素。药物敏感性实验是体外安全性评价的另一个重要方面, 其主要目的是测试待测菌株对抗生素是否具有耐药性, 从而防止耐药益生菌无限生长及对机体内源性菌株产生耐药性诱导(王晓琳, 2016)。本研究发现, 菌株 BDZ5 对头孢氨苄、头孢唑林等 13 种抗生素敏感, 菌株 W1B 对羧苄西林、头孢他啶等 8 种抗生素敏感, 并对多数抗生素中度敏感, 表明多数抗生素能对该 2 株菌株进行有效控制。根据体外安全性评估结果, 可以将该 2 株菌作为潜在益生菌应用于水产养殖。

除了体外安全性评估, 对养殖动物进行体内安全性测试也是十分重要的。对水产动物进行体内安全性测试的方式主要包括注射、浸浴和投喂等。张欢欢等(2016)采用注射和浸浴的方式检测功能菌对凡纳滨对虾的安全性; 陈文斌等(2017)采用浸浴的方式发现降氮菌株 NB9 对对虾的成活率无显著影响。本研究发现, 与副溶血弧菌不同, 向凡纳滨对虾体内注射 1×10^4 CFU/ml 和 1×10^6 CFU/ml 的 BDZ5 及 W1B 菌悬液均不会引起对虾死亡率的升高, 进一步表明这 2 株菌对凡纳滨对虾无明显毒害作用。

本研究进一步测试了感染细菌后, 各组凡纳滨对虾血清中的免疫及抗氧化相关酶活性, 包括 SOD、NOS、LZM 和抗菌活性。其中, SOD 在清除凡纳滨对虾体内自由基方面具有重要作用(Trenzado *et al.*, 2006); NOS 在细菌感染后被激活, 通过释放 NO 对病原起到灭杀作用(Yao *et al.*, 2010); LZM 和抗菌酶在破坏和清除体内病原方面十分重要(Chang *et al.*, 2018)。这些免疫及抗氧化酶活性的变化反映出凡纳滨对虾受刺激的情况。本研究中, 未观察到注射 BDZ5 和 W1B 菌悬液对凡纳滨对虾的免疫及抗氧化酶活性具有显著影响, 表明这 2 株菌对凡纳滨对虾未造成明显的刺激。相反, 注射 1×10^6 CFU/ml 的副溶血弧菌后, NOS 活性显著提高, 表明凡纳滨对虾受到了病原的刺激; 抗菌酶活性显著降低, 表明凡纳滨对虾的免疫系统受到了病原的破坏。此外, 还观察到凡纳滨对虾注射 1×10^6 CFU/ml 的副溶血弧菌后的 LZM 活性显著低于注射 1×10^6 CFU/ml 的 W1B, 与该 2 组的累积死

亡率数据一致。总之, 通过凡纳滨对虾血清中免疫及抗氧化酶活性的变化进一步说明了 BDZ5 和 W1B 具有安全性。

为探究不同的培养条件对这 2 株活性菌株生长及功能的影响, 本研究以 LB 液体培养基为基础培养基进行单因素实验, 分别研究了不同培养时间、起始 pH、盐度和金属离子对活性菌株生长和信号分子 C₆-HSL 降解率的影响, 研究结果可为菌株的大规模发酵及实际应用提供参考。此外, 本研究还发现, 不同培养条件对活性菌株的生长和功能的影响具有不一致性, 即最适生长条件下, 菌株并不一定具有最高的信号分子 C₆-HSL 降解活性, 二者之间甚至可能完全相反, 这与丁碧婷(2012)的研究结果相似。

综上所述, 本研究从凡纳滨对虾养殖体系中筛选得到 2 株具有 QQ 功能的活性菌株, 经鉴定分别是芽孢杆菌属和科贝特氏菌属。安全性评价结果表明, 这 2 株活性菌对凡纳滨对虾无明显毒害作用, 可以作为潜在益生菌应用于对虾养殖, 最终通过单因素条件优化实验确定了 2 株活性菌的最适生长和信号分子 C₆-HSL 降解条件, 为基于 QQ 角度防治对虾细菌性病害提供了优良菌种, 并为菌株的大规模发酵及后续应用提供了参考资料。后续研究将集中在 QQ 活性物质的分离、纯化及实际应用效果方面, 探究活性菌株的主要功能组分及对对虾的保护作用, 为在实际生产中应用 QQ 菌株防治细菌性病害提供基础研究资料。

参 考 文 献

- Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119–124
- Bai F, Han Y, Chen J, *et al.* Disruption of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by the AiiA protein of *Bacillus thuringiensis*. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 36–40
- Baumgartner A, Kueffer M, Simmen A, *et al.* Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. *LWT-Food Science and Technology*, 1998, 31(5): 489–494
- Cao H, He S, Lu L, *et al.* Identification of a *Proteus penneri* isolate as the causal agent of red body disease of the cultured white shrimp *Penaeus vannamei* and its control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105(2): 423–430
- Chang ZQ, Ge QQ, Sun M, *et al.* Immune responses by dietary supplement with *Astragalus polysaccharides* in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(2): 702–711
- Chen WB, Pan LQ, Huang F. Isolation, identification and safety evaluation of efficient nitrite-N degradation strain from biofloc-

- based shrimp culture ponds. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(3): 121–129 [陈文斌, 潘鲁青, 黄飞. 对虾生物絮团中亚硝酸盐降解菌分离鉴定与安全性评价. *海洋湖沼通报*, 2017(3): 121–129]
- Craig TK, Cech CA, Dorwart M, *et al.* Alpha-hemolysin variants. *United States Patent Application*, 2017, 15: 274–770
- Ding BT. Screen for the quorum sensing inhibitory activity from marine bacterial isolates and the study of active compounds. Master's Thesis of Yangzhou University, 2012 [丁碧婷. 具有群体感应抑制活性的海洋细菌的筛选与活性物质研究. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 2016, 57: 128–134
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, *et al.* Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 40(1): 86–116
- Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, *et al.* Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology*, 2011, 157(1): 179–188
- Hao SH, Tong JM, Sa RN, *et al.* Research progress on the safety and potential function of probiotics. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2004(9): 9–12 [郝生宏, 佟建明, 萨仁娜, 等. 益生菌安全性及其潜在功能研究进展. *中国畜牧兽医*, 2004(9): 9–12]
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 2014, 428–429: 297–302
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER, *et al.* Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 1990, 91(1–2): 1–13
- Liu Y, Zhang Y, Zhang HP. Evaluating methods of probiotic's safety in the world. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(6): 141–151 [刘勇, 张勇, 张和平. 世界益生菌安全性评价方法. *中国食品学报*, 2011, 11(6): 141–151]
- Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197–222
- Pan J, Huang T, Yao F, *et al.* Expression and characterization of *aiiA* gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiological Research*, 2008, 163(6): 711–716
- Song ZF, Fan B, Guo J, *et al.* Screening and identification of *Bacillus* to inhibit quorum sensing. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(6): 1059–1065 [宋增福, 范斌, 郭婧, 等. 具有群体感应抑制效果芽孢杆菌的筛选与鉴定. *水生生物学报*, 2013, 37(6): 1059–1065]
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689–1699
- Tang K, Zhang Y, Yu M, *et al.* Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2935
- Tinh NTN, Asanka Gunasekara R, Boon N, *et al.* N-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(1): 45–53
- Tinh NTN, Dung NV, Thuy VT, *et al.* Inhibition of quorum sensing-mediated bioluminescence in *Vibrio harveyi* by a recombinant AHL-lactonase from *Bacillus cereus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2014, 8: 353–360
- Trenzado C, Hidalgo M C, García-Gallego M, *et al.* Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 2006, 254(1–4): 758–767
- Trentin DS, Gorziza DF, Abraham WR, *et al.* Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42(4): 1329–1333
- Vinoj G, Vaseeharan B, Thomas S, *et al.* Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio biofilm* formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(6): 707–715
- Wang L, Wang YG, Zhang Z, *et al.* Diversity and drug resistance of bacterial pathogens isolated from bacterial ascetic disease in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 17–24 [王岚, 王印庚, 张正, 等. 养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 17–24]
- Wang XL, Ma S, Shan HW. Safety evaluation of two probiotics strains and their effects on the immunity and the ability of anti-WSSV of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Ocean University of China(Natural Science)*, 2016, 46(10): 39–47 [王晓琳, 马甦, 单洪伟. 两株潜在益生菌安全性评价及其对凡纳滨对虾免疫力和抗 WSSV 能力影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(10): 39–47]
- Wang Y, Yu YM, Zhang JJ, *et al.* Exploitation and application of quorum sensing and quorum quenching in marine microorganism. *Biotic Resources*, 2017, 39(6): 413–422 [王岩, 于雅萌, 张静静, 等. 海洋微生物群体感应与群体感应淬灭的开发利用. *生物资源*, 2017, 39(6): 413–422]
- We C, Yu P, Yu MC, *et al.* Preliminary study of screening and characteristics of strains with quorum sensing inhibition activity in shrimp culture environment. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(1): 27–34 [韦存, 于鹏, 于明超, 等. 对虾养殖体系中细菌群体感应抑制菌株的筛选及其特性初步研究. *南方水产科学*, 2018, 14(1): 27–34]
- Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 2017, 551(7680): 313–320
- Xu WJ, Pan LQ. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 2013, 412–413: 117–124
- Yao CL, Ji PF, Wang ZY, *et al.* Molecular cloning and expression

- of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(3): 453–460
- Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, *et al.* Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339–1346 [叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339–1346]
- Yu M, Liu N, Zhao YB, *et al.* Quorum quenching enzymes of marine bacteria and implication in aquaculture. Journal of Ocean University of China(Natural Science), 2018, 48(S1): 34–43 [于敏, 刘娜, 赵友彬, 等. 海洋细菌密度感应淬灭酶及在水产养殖中的应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(S1): 34–43]
- 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]

(编辑 陈 严)

Screening, Safety Evaluation and Fermentation Conditions Optimization of Quorum Quenching Bacteria from *Litopenaeus vannamei* Culture System

YU Peng^{1,2}, YE Haibin², SHAN Hongwei^{1①}, MA Shen¹, WANG Teng¹

(1. Ocean University of China, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Qingdao 266003; 2. Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104)

Abstract With the development of shrimp culture industry, bacterial diseases are becoming very serious. To explore the new methods of controlling bacterial diseases in shrimps through quorum quenching (QQ), potential probiotics with QQ activity from the culture system of *Litopenaeus vannamei* were screened and identified in the present study. The safety of QQ strains was evaluated and fermentation conditions were optimized. The *Agrobacterium tumefaciens* A136 liquid X-gal method was used to screen QQ strains. Two bacterial fermentation broths showed significant degradation of hexanoyl homoserine lactone (C₆-HSL), while the degradation activities were both lost after boiling water bath treatment. The strains were subjected to 16S rDNA gene sequencing analysis, and BDZ5 and W1B were identified as *Bacillus* sp. and *Cobetia* sp., respectively. The safety evaluation results showed that strains BDZ5 and W1B were not hemolyzed and were not sensitive to most antibiotics. After injection of the two strains, the cumulative mortality of shrimp did not increase, and the serum immune and antioxidase enzyme activities in shrimp did not change significantly, indicating that the two strains are safe for shrimp. Single factor condition optimization results showed the optimal growth conditions of BDZ5 as follows: initial pH 7.0, salinity 20, and 0.0005% MnCl₂ for 48 h culture time. Moreover, the optimal growth conditions of W1B were as follows: initial pH 6.0, salinity 40, and 0.05% CaCl₂ for 48 h. Except for the culture time, the optimal C₆-HSL degradation conditions of two strains were different from their growth conditions. Under the culture condition of initial pH 7.5, salinity 30, and 0.0005% MnCl₂ for 48 h, the degradation rate of the signal molecule C₆-HSL by the action of the two active bacteria reached the maximum. The results of the study can provide excellent strains for controlling bacterial diseases in shrimp based on QQ and provide reference materials for large-scale fermentation and subsequent application of the strains.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Bacterial disease control; Quorum quenching bacteria; Safety; Condition optimization

① Corresponding author: SHAN Hongwei, E-mail: shanhongwei@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190630001

http://www.yykxjz.cn/

张云滨, 任宪云, 高保全, 吕建建, 王磊, 刘萍. 三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆及在病原胁迫后的表达特征分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 92-100

Zhang YB, Ren XY, Gao BQ, Lü JJ, Wang L, Liu P. Cloning and expression analysis of c-Jun N-terminal kinase gene in *Portunus trituberculatus* after pathogenic stress. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 92-100

三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆 及在病原胁迫后的表达特征分析*



张云滨^{1,3} 任宪云^{2,3} 高保全^{2,3} 吕建建^{2,3}
王磊^{1,3} 刘萍^{2,3}①

(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. 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 C-JUN 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)作为丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的重要一员,在细胞增殖、凋亡和免疫应激等过程中发挥着重要作用。为深入研究 JNK 基因的免疫防御机制,本研究从三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)转录组数据库中筛选到 JNK 基因的 EST 序列,利用 RACE 扩增技术克隆得到该基因全长序列,命名为 *PtJNK*, cDNA 全长为 3240 bp,开放阅读框(ORF)为 1380 bp,编码 459 个氨基酸,具有 TPY 磷酸化位点的 S_TKC 保守结构域,是 JNK 基因家族典型特征。组织表达分布结果显示,*PtJNK* 基因在所有组织中均有表达;Real-time PCR 检测不同病原刺激下 *PtJNK* 基因的表达水平,结果显示,注射副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)后,该基因显著下调表达($P<0.05$);而注射白斑综合征病毒(WSSV)后,该基因显著上调表达($P<0.05$)。综上所述,*PtJNK* 基因是一种广泛表达基因,且在不同的病原感染情况下,该基因的表达模式存在差异,在免疫防御过程中具有重要作用。

关键词 三疣梭子蟹; *PtJNK*; 基因克隆; 病原感染; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0011-09

C-JUN 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)在 1990 年被发现,是形成丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的重要亚基。JNK 基因家族具有 THR-Pro-Tyr(TPY)磷酸化位点的丝氨酸/苏氨酸蛋白

激酶(S_TKC)典型结构域,是上游基因 MKK4 与 MKK7 的激活区域,磷酸化的 JNK 可激活下游各种转录因子(Davis, 2000; Minden *et al*, 2008)和非转录因子(Lin, 2003),参与细胞增殖(Zhang *et al*, 2002)、

* 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)、国家自然科学基金面上项目(41576147; 41876186)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)、江苏省重点研发计划(面上项目)(BE2017325)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022018027)共同资助 [This work was supported by the National Shrimp and Crab Industry Technology System (CARS-48), the National Natural Science Foundation of China (41876186; 41576147), the Project of Taishan Scholars Leading Talent (LJNY2015002), the Key Research and Development Plan of Jiangsu Province (BE2017325), and Central Level Public Welfare Research Institutes Basic Research Business Expenses (20603022018027)]. 张云滨, E-mail: 930476134@qq.com

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

收稿日期: 2019-6-30, 收修改稿日期: 2019-07-29

凋亡(Kyriakis *et al.*, 1994)、分化和免疫应激(Huang *et al.*, 2009)等生理过程。国内外研究者发现, JNK 可介导多种外界因素引起的细胞凋亡, 如 Dhanasekaran 等(2008)研究发现, JNK 可活化其下游转录因子 c-JUN/AP-1 的活性, 进而调节凋亡蛋白的表达; 活化 P53 基因的表达可调节细胞凋亡(Jones *et al.*, 2008); JNK 还可以介导非转录因子 BCL-2 家族基因的表达来调节细胞凋亡(Aoki *et al.*, 2002)。JNK 除在细胞凋亡中发挥重要作用外, 在机体免疫应激过程中也发挥重要作用, 如在果蝇(*Drosophila*)中, JNK 基因可以激活脂肪体中抗菌肽基因的表达, 参与对致病菌(Bond *et al.*, 2009)、真菌(Sluss *et al.*, 1996)和病毒(Delaney *et al.*, 2006)的免疫防御; Shi 等(2012)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中获得的 JNK 同源基因与 WSSV 的复制和基因转录有关; Zhu 等(2016)在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中发现, JNK 信号通路可调节抗菌肽(AMPs)的表达。可见 JNK 在机体的免疫防御过程中具有极其重要的作用。然而, 在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)中, 有关 JNK 是否参与细胞凋亡、免疫防御的作用机制尚未见报道。

三疣梭子蟹具有较高的经济价值, 是我国重要的海产养殖品种(任海波等, 2018)。但由于养殖环境的破坏与病害频发, 三疣梭子蟹养殖规模呈现下降的趋势, 其中, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和白斑综合征病毒(WSSV)是导致三疣梭子蟹病害频发的主要病原(周俊芳等, 2014; 李卢, 2005; 阎斌伦等, 2010)。因此, 本研究采用 RACE 技术克隆三疣梭子蟹的 JNK 基因, 通过生物学软件分析其基因结构与功能, 并利用实时荧光定量技术(qRT-PCR)对其在不同病原感染下的表达模式进行分析, 为进一步探索三疣梭子蟹 JNK 基因在免疫防御中的作用机制提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验样品的获取

三疣梭子蟹采集于山东省潍坊市昌邑海丰养殖基地, 选择健康的三疣梭子蟹 200 只[(25±3) g], 在 10 m² 的室内水池中暂养 7 d, 水温为(25±2)°C, 盐度为 33, 持续充氧, 为保证水质良好, 每天换水 1/3, 定时、定点、定量投喂新鲜杂鱼, 投喂量为其体重的 30%左右。随机选取 3 只暂养后的健康三疣梭子蟹, 分别取其 10 个组织(脑、肝胰腺、血细胞、肌肉、胸腺、肠、眼柄、胃、鳃和心脏)存于液氮, 用于组织表达分布分析, 其中, 血细胞 800×g 4°C 离心 10 min, 去上清液, 保留血细胞, 并保存于液氮中。

将剩余的健康三疣梭子蟹平均分为 3 组, 即对照组(甲壳动物生理盐水)、副溶血弧菌感染组(1×10⁷ CFU/ml)和 WSSV(3.7×10⁷ copy/ml)感染组, 每组 50 只以确保有足够的取样个体数量, 浓度参照张杰等(2018), 注射量为 100 μl, 分别在感染 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时取其鳃、肝胰腺和血细胞组织, 每组取 3 只混合放置在 1.5 ml 离心管中。其中, 血细胞 800×g 4°C 离心 10 min, 去上清液, 保留血细胞, 并保存于液氮中, 用于后续总 RNA 提取等。

1.2 总 RNA 提取与 RACE 模板合成

将保存于液氮未处理的组织进行充分研磨, 采用 TRIzol[®] Reagent(Roche 公司)方法进行总 RNA 提取, 然后进行 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo)检测其质量和浓度, 将高质量的 RNA 进行分装保存(-80°C)。将各组织中高质量的总 RNA 均匀混合, 并使用 SMARTer[®] RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa 公司)试剂盒合成 3'和 5' RACE cDNA 模板(-80°C分装保存), 用于后续基因克隆实验。

1.3 *PtJNK* 基因 cDNA 全长扩增

根据三疣梭子蟹转录组数据库筛选得到 *PtJNK* 的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5' RACE 特异性引物及通用引物, 由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1), 使用 Trans Taq[®] DNA 高保真聚合酶(北京全式金生物公司)进行 3'和 5'末端巢式 PCR 扩增, 第 1 轮使用 UPM 通用引物, 10 μl 反应体系: 0.5 μl 模板、0.4 μl Forward/Reverse Primer (10 μmol/L)、5 μl Premix Taq (LA Taq Ver 2.0)、ddH₂O 补足; 程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 10 min。第 2 轮以第 1 轮反应为模板, 使用 NUP 通用引物, 20 μl 反应体系, 程序: 94°C 5min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 10 min。将获得的 PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将检测合理的目的条带进行切胶回收(TaKaRa Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0), 与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接 3 h, 转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞(TSINGKE)中, 涂布于含氨苄的固体培养基上, 37°C 恒温过夜培养, 挑取阳性单克隆, 加入含 100 μg/ml 氨苄的 LB 液体培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养 4 h, 用 M13-47/48 引物进行菌落 PCR 鉴定, 并将检测准确的目的菌液送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

表 1 本研究所用引物序列
Tab.1 Nucleotide sequences of the PCR primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'~3')	用途 Purpose
PtJNK-3' F1	GACCCAGAACGCAGGATAAGT	3'-RACE
PtJNK-3' F2	TGTTCTCCCCCTCTCCCACT	
PtJNK-5' R1	GTTGGCTGTAATCTGGACATAAAGT	5'-RACE
PtJNK-5' R2	GGGCTCCTCACTGCTTCCAA	
JNK-F	TATGTTGAAAACCGTCCTCGC	RT-PCR
JNK-R	CCACACTTATCTGCGTTCTG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primers
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	菌落 PCR Colony PCR
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13R (-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	qRT-PCR 内参 qRT-PCR internal reference
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	

1.4 *PtJNK* 基因序列生物信息学分析

利用 Contig Express 软件将 3'和 5'克隆序列与 EST 序列进行拼接、验证,得到 *PtJNK* 基因的 cDNA 全长,利用 NCBI-BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件对 *PtJNK* 基因序列进行比对,并使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 在线软件预测 *PtJNK* 基因序列的开放阅读框(ORF)。利用 ExPASy(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)、SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线生物学分析软件对基因编码的氨基酸进行物理性质、结构域、跨膜结构域和信号肽的预测。使用 DNA MAN 5.2.9 软件对不同物种的氨基酸序列进行多重序列比对,并通过 MEGA 6.0 软件(Tamura *et al*, 2011)采用邻接法(Neighbor-Joining method) (Saitou *et al*, 1987)进行系统进化树的构建。

1.5 *PtJNK* 基因组织表达分析

将提取的总 RNA 用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) kit (南京诺维赞)进行反转录成 cDNA,用于组织表达定量检测。根据 *PtJNK* 基因的全长序列,通过 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 特异性引物,内参基因选用 β -actin(表 1)。采用 10 μ l qRT-PCR 体系:SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 5.0 μ l, 正/反向引物(10 μ mol/L) 0.4 μ l, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.2 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, 灭菌水 3.0 μ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1.0 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法(Livak *et al*, 2001)对荧光定量结果进行分析,并通过 SPSS 19.0 软件进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 *PtJNK* 基因全长与序列结构特征

利用 RACE 方法得到三疣梭子蟹 *JNK* 基因全长序列 3240 bp,命名为 *PtJNK*(GenBank 登录号:MK28792)(图 1)。生物学软件分析显示,该基因包含 5'非编码区 668 bp, 3'非编码区 1192 bp,其开放阅读框(ORF)1380 bp,编码 459 个氨基酸,预测分子量为 51.7 kDa,理论等电点为 6.47。SMART、Signal 4.1 在线软件分析显示,该氨基酸序列具有 TPY 磷酸化位点的 S_TKC 保守结构域(图 2),属于 *JNK* 基因家族典型结构特征,无信号肽及跨膜结构域。

2.2 *PtJNK* 氨基酸同源性与系统进化树分析

利用 Blast 在线软件对 *PtJNK* 氨基酸序列和其他物种的 *JNK* 氨基酸序列进行同源性比对,结果显示,*PtJNK* 氨基酸序列与锯缘青蟹(*Scylla paramamosain*) *SpJNK* 氨基酸序列同源性最高(91.7%),其次是中华绒螯蟹 *EsJNK*(89.98%)、凡纳滨对虾 *PvJNK*(88.52%)、日本对虾(*Penaeus japonicas*) *PjJNK*(87.90%)。利用 DNA MAN 对多个序列进行同源性比对发现(图 3),每个氨基酸序列都具有 TPY 磷酸化位点的 S_TKC 保守结构域结构。通过对多个氨基酸序列构建系统进化树发现(图 4),三疣梭子蟹与锯缘青蟹和中华绒螯蟹聚为一支,其次与凡纳滨对虾和日本对虾聚为一类。

2.3 *PtJNK* 基因组织表达分析

2.3.1 *PtJNK* 全组织相对表达分析 利用 qRT-PCR 技术对三疣梭子蟹不同组织的 *PtJNK* mRNA 进

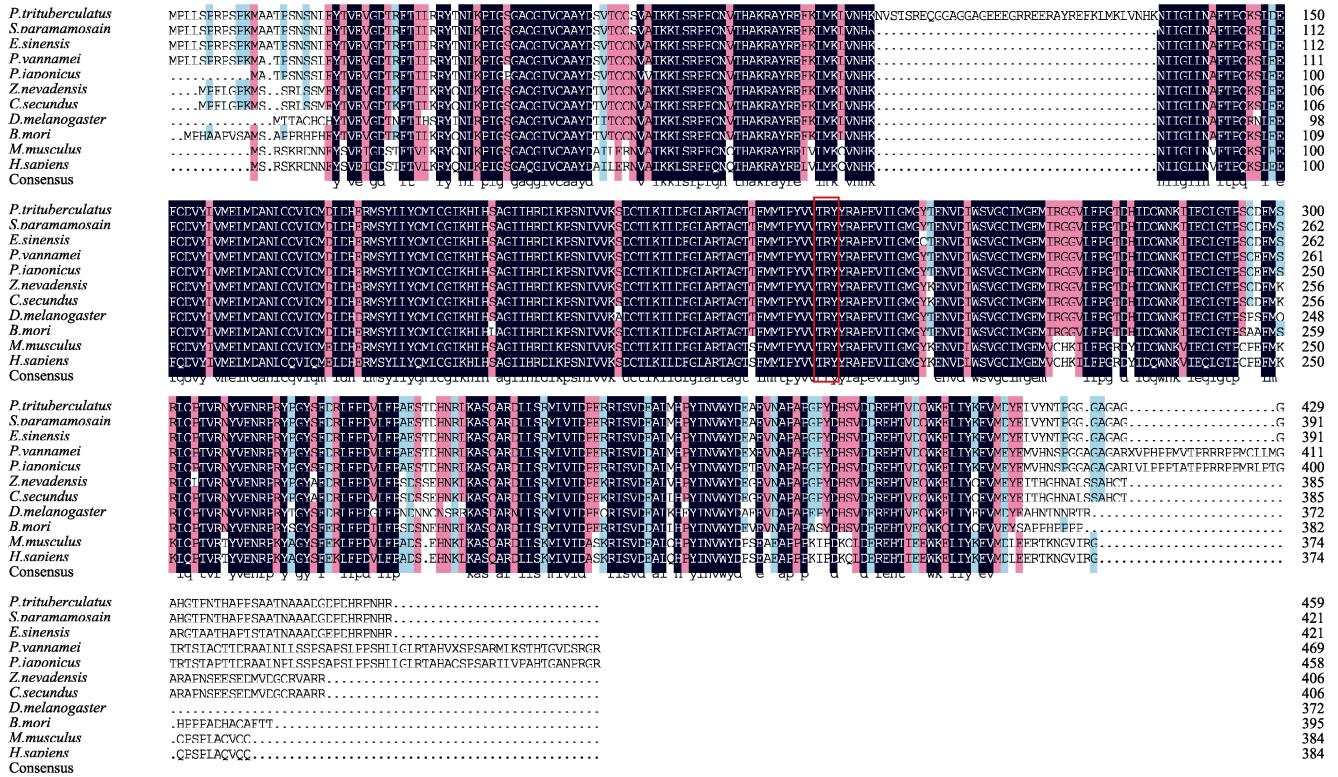


图 3 三疣梭子蟹 PtJNK 氨基酸序列的多序列比对
 Fig.3 The multiple sequence alignment of that PtJNK amino acid sequences

各物种名称及 GenBank 登录号：三疣梭子蟹 MK28792；锯缘青蟹 AYK28495.1；中华绒螯蟹 AHG95993.1；凡纳滨对虾 XP_027218684.1；日本对虾 BAI87826.1；家蚕 NP_001103396.1；果蝇 AAB97094.1；乾木白蚁 PNF21055.1；内华达古白蚁 KDR18179.1；小鼠 BAA85875.1；人 NP_001310231.1
 Name of each species and GenBank accession numbers: *P. trituberculatus* MK28792; *S. paramamosain* AYK28495.1; *E. sinensis* AHG95993.1; *P. vannamei* XP_027218684.1; *P. japonicus* BAI87826.1; *B. mori* NP_001103396.1; *D. melanogaster* AAB97094.1; *C. secundus* PNF21055.1; *Z. nevadensis* KDR18179.1; *M. musculus* BAA85875.1; *H. sapiens* NP_001310231.1

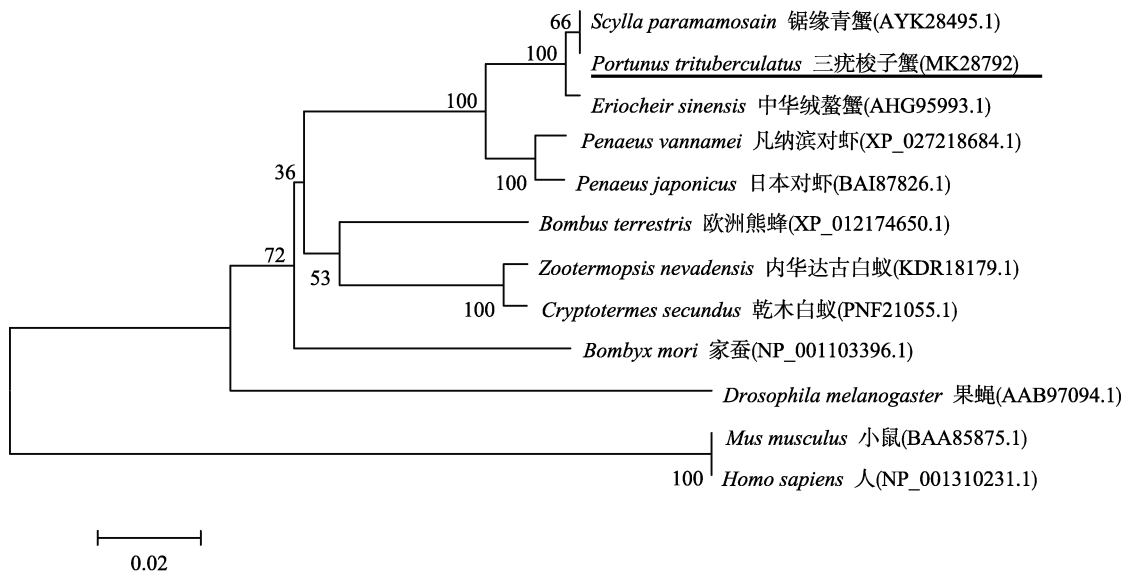


图 4 基于 JNK 氨基酸序列构建的不同物种的系统进化树
 Fig.4 Phylogenetic tree of different species based on JNK amino acid sequences

行相对表达定量检测, 结果显示(图 5), *PtJNK* 在各组织中都有表达, 且表达存在显著差异($P < 0.05$)。实验以肝胰腺作为对照, 其中, 胃和肌肉中的表达量最高(与肝胰腺的表达水平相比分别为 3.98 和 3.78 倍); 其次在鳃的表达水平是肝胰腺的 1.79 倍; 在心脏略低于肝胰腺的表达水平, 在血细胞的相对表达量较低。因此, 推测 *PtJNK* 可能在三疣梭子蟹中发挥不同的作用, 其作用因组织类型的不同而不同。

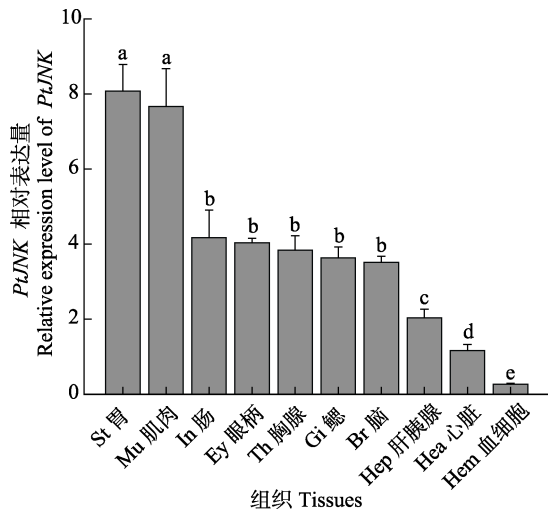


图 5 三疣梭子蟹 *PtJNK* 基因在不同组织中的表达
Fig.5 Relative expression characterization of *PtJNK* gene in the various tissues of *P. trituberculatus*

相同字母代表差异不显著($P > 0.05$),
不同字母代表差异显著($P < 0.05$), 下同

Same letters indicated no significantly different ($P > 0.05$),
different letters indicated significantly different ($P < 0.05$).
The same as below

2.3.2 不同病原刺激下 *PtJNK* 基因的表达分析 本研究利用 qRT-PCR 技术, 研究在不同的病原刺激下, 三疣梭子蟹血细胞、肝胰腺和鳃中 *JNK* 基因的表达情况(图 6)。在副溶血弧菌感染后, *PtJNK* 基因在血细胞、鳃和肝胰腺 3 个组织中, 与对照组相比基本呈现不同程度的下调趋势, 且呈现先下降后上升再下降后趋于平衡的表达模式。在血细胞中, 分别在 12 h 和 24 h 高于对照组表达量, 达到最高表达水平, 为对照组的 1.79 倍和 1.54 倍; 在肝胰腺中, 在 12 h 达到最高值, 为对照组的 0.63 倍; 在鳃中, 在 6 h 达到最高表达量, 为对照组的 0.61 倍, 在 48 h 和 72 h 达到恒定水平, 为对照组的 0.56 倍和 0.59 倍。

在注射 WSSV 后, *PtJNK* 基因在血细胞、肝胰腺和鳃 3 个组织中, 相对对照组呈上调表达。在血细胞中呈先下降后上升再下降的表达模式, 在 24 h 达到最大值, 为对照组的 18.21 倍; 在肝胰腺中, *PtJNK*

基因的表达整体呈先上升后下降的表达趋势, 在 12 h 表达量达到最大值, 为对照组的 4.91 倍; 在鳃中, *PtJNK* 基因的表达整体呈先上升后下降再上升的表达趋势, 其中, 在 12 h 下调至最低水平, 为对照组的 0.38 倍。

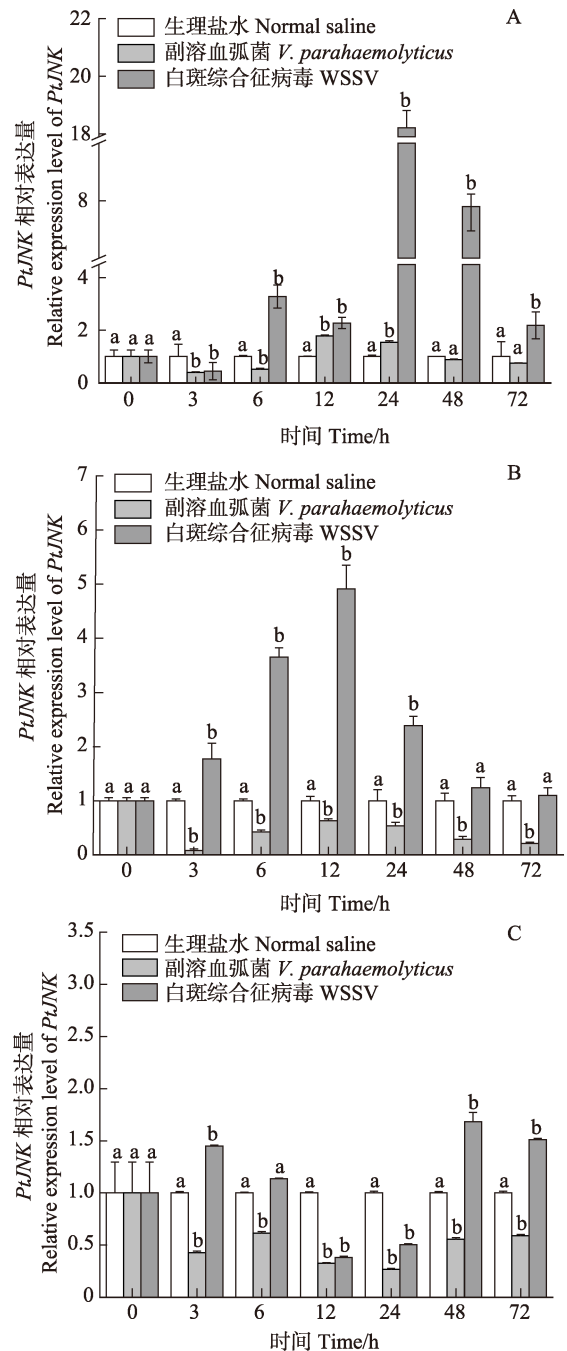


图 6 三疣梭子蟹在不同病原感染下 *PtJNK* 在血细胞(A)、肝胰腺(B)和鳃(C)中的表达模式

Fig.6 The expression of *PtJNK* in haemocytes (A), hepatopancreas(B), and gill(C) of *P. trituberculatus* after different pathogen infection

感染组间没有进行差异显著分析

No analysis was performed between infected groups

3 讨论

为更加深入了解三疣梭子蟹 *JNK* 基因的分子特征, 本研究首次获得 *PtJNK* 基因的全长序列, cDNA 全长为 3240 bp。经生物学软件分析, *PtJNK* 基因含有 TPY 磷酸化位点的 S_TKC 保守结构域, 是 C-JUN 氨基末端激酶(JNK)基因家族的典型结构域。氨基酸多重序列比对结果显示, *PtJNK* 氨基酸序列与其他物种具有高度的保守性。系统进化树结果表明, 无脊椎动物与脊椎动物有关 *JNK* 基因在进化上并没有十分密切的联系, 而三疣梭子蟹 *PtJNK* 基因与锯缘青蟹、中华绒螯蟹聚为一支。综上所述, 该序列确定为三疣梭子蟹 *JNK* 基因, 且在进化上高度保守。

JNK 基因可由各种环境应激激活, 如细菌或病毒感染、氧化应激等。为了深入研究 *JNK* 基因在三疣梭子蟹中的功能, 进行了病原感染实验, 并利用 qRT-PCR 对 *PtJNK* 基因的组织表达模式进行了分析。结果显示, 该基因在各检测组织(胃、肌肉、肠、眼柄、胸腺、鳃、脑、心脏、肝胰腺和血细胞)中均有表达, 其中, 在胃和肌肉中表达量最高。时恭芳(2017)在对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究中发现, *PmJNK* 在各组织中广泛表达, 其中, 在血淋巴、鳃和肠道中高表达; Sun 等(2016)对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)研究发现, *JNK* 基因在肌肉中表达量最高。因此, 推断 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹中可能参与多种生理表达, 且因物种的不同其表达模式具有明显的差异。

在无脊椎动物中, 血细胞(Wang *et al.*, 2005; Bachère *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2013)、肝胰腺(Diggles *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012)被认为是主要的免疫器官, 在宿主对外来病原体的免疫防御中发挥重要作用。为进一步研究 *PtJNK* 基因的功能, 本研究对血细胞、鳃和肝胰腺 3 个组织进行了表达定量分析。研究发现, 在注射副溶血弧菌后, *PtJNK* 基因在血细胞、鳃和肝胰腺中的表达呈现一定程度的下调表达($P < 0.05$), 在 3 h 后, 该基因的表达量呈先上升后下降的模式, 而在对凡纳滨对虾(Li *et al.*, 2015)和近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) (Qu *et al.*, 2016)中研究发现, *JNK* 基因呈上调表达, 且在病原感染的过程中发挥着免疫调节作用, 因此, 推测副溶血弧菌导致三疣梭子蟹机体紊乱, 引起 *PtJNK* 基因表达受到抑制, 表明 *PtJNK* 基因参与了三疣梭子蟹免疫防御过程。WSSV 感染后发现, 在所观察的血细胞、肝胰腺和鳃中均呈现显著的上调表达($P < 0.05$), 分别在 24 h、12 h 和 48 h 达到最大值, 为对照组的 18.21 倍、4.9 倍和 11.68 倍, 这与凡纳滨对虾的研究结果相似; Shi 等

(2012)的研究证明了该基因具有抑制 WSSV 复制的功能, Li 等(2015)证明了 *JNK* 途径的激活(包括 MKK7/*JNK/AP-1*)可以增强抗菌肽(AMPs)的产生。另有研究发现, 在病毒感染过程中, *JNK* 信号通路参与病毒复制和调控特定病毒蛋白的表达(Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015), 而抗菌肽在机体免疫调节中具有重要的作用, 这进一步证实了 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹免疫防御过程中起调节作用。

综上所述, 本研究首次成功克隆得到三疣梭子蟹的 *PtJNK* 基因序列全长, 并对其氨基酸序列进行了生物学分析, 通过病原感染实验检测 *PtJNK* 基因在血细胞、肝胰腺和鳃中的相对表达量, 初步证实了 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹感染病原的过程中发挥着重要的作用, 为深入研究 *PtJNK* 基因的功能作用机制提供了理论参考。

参 考 文 献

- Aoki H, Kang PM, Hampe J, *et al.* Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(12): 10244–10250
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 149–168
- Bond D, Foley E. A quantitative RNAi screen for *JNK* modifiers identifies Pvr as a novel regulator of *Drosophila* immune signaling. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(11): 1000655
- Davis RJ. Signal transduction by the *JNK* group of MAP kinases. *Cell*, 2000, 103(2): 239
- Delaney JR, Stoven S, Uvell H, *et al.* Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the *JNK* and NF- κ B signaling pathways. *EMBO Journal*, 2006, 25(13): 3068–3077
- Dhanasekaran DN, Reddy EP. *JNK* signaling in apoptosis. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245–6251
- Diggles BK, Moss GA, Carson J, *et al.* Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 43(2): 127–137
- Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of *JNK* and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, 2009, 48(3): 161–169
- Jones E, Dickman M, Whitmarsh A. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Journal*, 2007, 405(3): 617–623
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, *et al.* The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 1994, 369(6476): 156–160
- Li C, Li H, Wang S, *et al.* The c-Fos and c-Jun from *Litopenaeus*

- vannamei* play opposite roles in *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(1): 26–36
- Li L. Common diseases and their control of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2005, 32(6): 269–271 [李卢. 三疣梭子蟹的常见病及其防治. *水产科技情报*, 2005, 32(6): 269–271]
- Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis. *Bioessays News and Reviews in Molecular Cellular and Developmental Biology*, 2003, 25(1): 17–24
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Letters in Spatial and Resource Sciences*, 2008, 1333(2): 85–104
- Qu F, Xiang Z, Xiao S, *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in immune defense against bacterial infection in *Crassostrea hongkongensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 67: 77–85
- Ren HB, Li YB, Zhang XR, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of *Scygonadin* from *Portunus trituberculatus*. *Journal of Biology*, 2018, 35(4): 21–24 [任海波, 李燕波, 张肖荣, 等. 三疣梭子蟹抗菌肽 *Scygonadin* 基因的克隆与序列分析. *生物学杂志*, 2018, 35(4): 21–24]
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- Shi GF. The cloning and function research of the genes JNK, C-JUN and ATF-2 in the JNK signaling pathway from shrimp, *Penaeus monodon*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [时恭芳. 斑节对虾 JNK 信号通路中的 JNK、C-JUN 和 ATF-2 基因的克隆与功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Shi H, Yan X, Ruan L, *et al.* A novel JNK from *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 37(3–4): 421–428
- Sluss HK, Goberdhan DC, Davis RJ, *et al.* A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes and Development*, 1996, 10(21): 2745–2758
- Sun J, Li Y, Li M, *et al.* A novel JNK is involved in immune response by regulating IL expression in oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 79: 93–101
- Sun Y, Zhang L, Zhang M, *et al.* Characterization of three mitogen-activated protein kinases (MAPK) genes reveals involvement of ERK and JNK, not p38 in defense against bacterial infection in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 507–515
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang PH, Liang JP, Gu ZH, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 359–371
- Wang Y, Puscheck EE, Lewis JJ, *et al.* Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertility and Sterility*, 2005, 83(1): 1144–1154
- Wei S, Huang Y, Huang X, *et al.* Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 1(43): 230–240
- Xiao YM, Zhou YH, Xiong Z, *et al.* Involvement of JNK in the embryonic development and organogenesis in zebrafish. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(6): 716–725
- Yan BL, Liang LG, Zhang XJ. Prevention and cure of fish disease proceedings on main diseases of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2010, 37(1): 29–33 [阎斌伦, 梁利国, 张晓君. 三疣梭子蟹主要病害研究进展. *水产科技情报*, 2010, 37(1): 29–33]
- Zhang J, Lü JJ, Liu P, *et al.* Cloning of Toll4 in *Portunus trituberculatus* and its expression in responding to pathogenic infection and low salinity stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 146–155 [张杰, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 Toll4 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 146–155]
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 2002, 12(1): 9–18
- Zhou JF, Li XC, Wang JY, *et al.* Analysis of major infectious diseases and their causative agents of Chinese sea crab. *Marine Sciences*, 2014, 38(6): 102–106 [周俊芳, 李新苍, 王江勇, 等. 中国海水蟹主要流行性疾病及其病原分析. *海洋科学*, 2014, 38(6): 102–106]
- Zhu YT, Zhang X, Wang SC, *et al.* Antimicrobial functions of EsLecH, a C-type lectin, via JNK pathway in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 61: 225–235

Cloning and Expression Analysis of c-Jun N-Terminal Kinase Gene in *Portunus trituberculatus* after Pathogenic Stress

ZHANG Yunbin^{1,3}, REN Xianyun^{2,3}, GAO Baoquan^{2,3}, LÜ Jianjian^{2,3}
WANG Lei^{1,3}, LIU Ping^{2,3}^①

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

Abstract The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily, which plays an important role in cell proliferation, apoptosis, and immune stress. To further explore the immune defense mechanism of JNK in *Portunus trituberculatus*, the EST sequence of *PtJNK* was isolated from the transcriptome database of *P. trituberculatus*. In this study, the JNK gene of *P. trituberculatus* (*PtJNK*) was successfully cloned by RACE; measurements showed a cDNA length of 3240 bp and an open reading frame of 1380 bp. *PtJNK* consists of 459 amino acids, including a serine/threonine protein kinase (S-TKc) domain with a conserved Thr-Pro-Tyr (TPY) motif, which is a typical feature of the JNK gene family. The results of tissue expression and distribution show that the *PtJNK* gene is expressed in all tissues. Real-time PCR was used to detect the expression of *PtJNK* under different pathogenic stimuli. The results show that expression of the gene is significantly down-regulated after injection of *Vibrio parahaemolyticus* ($P < 0.05$), while expression is significantly up-regulated when white spot syndrome virus is injected ($P < 0.05$). To sum up, *PtJNK* gene is a widely expressed gene, and expression of the gene differs according to pathogen.

Key words *Portunus trituberculatus*; *PtJNK*; Gene cloning; Pathogenic infection; Quantitative Real-time PCR

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190527004

http://www.yykxjz.cn/

方振朋, 孟宪红, 李旭鹏, 栾生, 曹家旺, 陈宝龙, 孔杰, 闫茂仓, 胡利华. 基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 101-109

Fang ZP, Meng XH, Li XP, Luan S, Cao JW, Chen BL, Kong J, Yan MC, Hu LH. Genetic diversity analysis of domestic commercial brands seedlings of *Litopenaeus vannamei* based on microsatellite molecular markers. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 101-109

基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾 商业苗种遗传多样性分析*



方振朋^{1,2} 孟宪红^{2①} 李旭鹏² 栾生²
曹家旺² 陈宝龙² 孔杰² 闫茂仓³ 胡利华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. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 温州 325005)

摘要 为研究我国凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)商业苗种的遗传多样性特征,于河北、山东、广东、海南等地采集了6个有代表性的凡纳滨对虾品牌苗种,分别命名为黄骅R、东营M、广州P、广州Z、海南S和海南Z,以8个微卫星标记检测其遗传多样性。结果显示,6个品牌的凡纳滨对虾在8个位点呈现不同程度的多态性,其平均等位基因数(N_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和多态信息含量(PIC)分别为4.5~9.5、0.516~0.733、0.346~0.550和0.472~0.700,各品牌遗传多样性丰富程度从高到低分别为黄骅R>广州Z>广州P>海南Z>东营M>海南S。哈迪-温伯格平衡(HWE)检验显示,4.17%(2/48)的检测结果表明为显著的偏离($0.01 < P < 0.05$),58.33%(28/48)表现为极显著偏离($P < 0.01$)。分子变异方差分析(AMOVA)发现,12%的变异来自品牌间,24%的变异来自品牌内个体间,其余64%的变异均来自所有品牌个体。UPGMA聚类分析结果显示,6个品牌的凡纳滨对虾聚为2个明显的分支,广州P和广州Z聚为一支,东营M、黄骅R、海南Z和海南S聚为一支。主成分分析(PCA)结果显示,各品牌凡纳滨对虾无法单独进行聚类。本研究初步分析了当前国内养殖凡纳滨对虾的遗传背景,实验结果可为凡纳滨对虾良种选育提供数据支撑。

关键词 凡纳滨对虾; 商业苗种; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0012-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)原产地主要为中、南美的秘鲁北部至墨西哥太平洋沿岸,尤其以

* 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放基金项目(J2018003)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2018GH10)、山东省农业良种工程(2017LZN011)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Open Research Fund from Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource (J2018003), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018GH10), Shandong Province Agricultural Seed Improvement Project (2017LZN011), Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System(CARS-48)]. 方振朋, E-mail: fangzhenpeng@126.com

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

收稿日期: 2019-05-27, 收修改稿日期: 2019-06-15

厄瓜多尔沿岸分布最为密集(王兴强等, 2004)。凡纳滨对虾为世界三大养殖对虾之一(张伟权, 1990), 其产量约占全球对虾产量的 70%(张龙等, 2019), 具有成活率高、食性广、生长快、适应能力强等优点。凡纳滨对虾于 1988 年从美国引入, 之后迅速在全国范围内普及(于洋, 2014; 唐扬等, 2018), 成为我国海水养殖动物中养殖发展最快的一个种类(马春艳等, 2011)。目前, 我国已成为世界上凡纳滨对虾养殖产量最高的国家(颀晓勇等, 2008; 童馨等, 2009)。

随着我国凡纳滨对虾市场需求量的增大, 对虾苗种培育方式也出现了转变。目前, 在集约化苗种培育技术已达峰值的背景下, 有些育苗场为了进一步降低成本, 种虾不经选育, 长期近交繁殖, 随着养殖产量的增大, 随之而来的问题也越来越多。最大的问题莫过于养殖对虾遗传多样性下降, 加之外来亲本得不到更新, 国内养殖对虾出现了种质退化、病害暴发频繁的现象。从长远角度来看, 查清我国凡纳滨对虾遗传背景, 对进一步培育优良品种和促进可持续健康养殖具有重要指导意义。

分子标记目前已广泛运用于水产动物育种中(张琼等, 2011; 孙苗苗等, 2017; 王军等, 2018), 其中, 又以微卫星(Microsatellite或Simple Sequence Repeats)分子标记应用最为普遍。微卫星标记是2~6个碱基为核心的短串联重复序列, 重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性且数量丰富, 分布于生物体整个基因组中(Tautz, 1989; Schlötterer *et al.*, 1992)。微卫星标记具有多态性高、重复性好、操作简单、共显性遗传等优点, 被广泛用于对虾群体遗传多样性分析(Bringmann *et al.*, 1996; Postlethwait *et al.*, 1998; 张天时等, 2005; 曾地刚等, 2008)。本研究利用8个扩增稳定的微卫星位点, 对国内6个商业品牌凡纳滨对虾苗种进行遗传多样性分析, 初步分析当前国内养殖凡纳滨对虾的遗传背景, 为凡纳滨对虾优良品种的选育提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用我国有代表性的 6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种[平均体长为(49.73±1.53) mm, 平均体重为(1.41±0.11) g], 分别命名为黄骅 R、海南 Z、海南 S、广州 Z、广州 P 和东营 M。每个品牌取 30 尾个体进行肌肉组织 DNA 提取, 共计 180 尾凡纳滨对虾个体。

1.2 实验方法

采用天根海洋动物组织 DNA 提取试剂盒进行肌肉组织 DNA 提取, 利用紫外分光光度计(BioImaging systems, UVP)进行 DNA 浓度测量, 并根据测量结果将 DNA 稀释至 50 ng/μl。将稀释得到的 DNA 利用 8 个微卫星位点进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 总体积为 20 μl, 其中, 模板 DNA 1.5 μl, (Vazyme) 2 × Taq Master Mix (Dye Plus) 10 μl, 正向和反向引物 (10 mmol/L)各 0.8 μl, 灭菌超纯水 6.9 μl。PCR 反应程序: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s; 72℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 30 个循环; 72℃延伸 5 min; 4℃保存。PCR 产物微卫星分型于生工生物工程(上海)股份有限公司, 利用 ABI 3730XL 测序仪完成, 所用微卫星位点及其引物信息见表 1。

1.3 数据处理

对 6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检测和遗传多样性分析。利用 GENEPOP version 3.4 软件进行 HWE 检验, 得到精确 P 值(P_{H-W})。通过 Cervus 3.0 计算各位点的等位基因数目(Number of alleles, N_a), 观测杂合度(Observed heterozygosities, H_o)、期望杂合度(Expected heterozygosities, H_e)、8 个微卫星位点的多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)和无效等位基因频率[Null alleles frequency, $F(\text{Null})$]。利用 GenAlEx 6.51 软件计算 6 个品牌凡纳滨对虾在各位点的香农多样性指数(Shannon's diversity index)、8 个位点每个品牌特有等位基因(Private alleles)平均值、各品牌间的遗传分化程度和基因流(包括总的 F_{ST} 值以及两两品牌间的 F_{ST} 值); 分子变异方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA), 估测遗传变异在品牌内和品牌间的分配情况; 6 个品牌间 Nei's 无偏遗传距离、遗传相似性系数、品牌间遗传距离矩阵、个体间遗传距离矩阵; 利用品牌间和个体间遗传距离矩阵进行主成分分析(Principal coordinate analysis, PCA)。利用 NTSYSpc 2.1 软件按照遗传一致度进行 6 个品牌凡纳滨对虾 UPGMA 聚类。

2 结果

2.1 6 个商业品牌凡纳滨对虾苗种遗传多样性分析

6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种的遗传多样性参数见表 2 和图 1。在 8 个微卫星位点中, 6 个品牌凡纳滨对虾总等位基因数为 36~76 个, 最大为黄骅 R, 最小为东营 M。各品牌平均等位基因数为 4.5~9.5 个。

表 1 8 个微卫星位点信息
Tab.1 The information of 8 microsatellites loci

位点 Loci	引物序列(5'~3')及荧光类型 Primer sequences (5'~3') and the fluorescence labeling of primers	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物片段范围 Amplified fragment size (bp)
TUMXLv7.121	F: HEX-GGCACACTGTTTAGTCCTCG R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG	58	194~244
TUMXLv9.90	F: TAMRA-GACCAAAGGATATTGGCTCG R: GTAATCAGGAGATGGTCCGC	58	282~292
M1103	F: 6-FAM-GGCTGTGTTTGCGGTGTAGTTT R: TCATACGATAATGGCATAGAAGG	55	376~391
TUMXLv9.103	F: ROX-CACCAAAACGAACGAAACG R: GGATAAAAACGAATTGTATACCG	58	199~393
Lv12	F: 6-FAM-GATCATTCGCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	55	125~134
TUMXLv10.33	F: HEX-CGAAGAGATTTATCCAGGG R: CGTGCATTATTATCCTTTCC	56	252~324
TUMXLv8.256	F: ROX-GGACTCACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAGTC	55	150~163
TUMXLv7.56	F: TAMRA-CCATGGCTTTCCTTCTTTTC R: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG	62	311~490

黄骅 R 平均每个微卫星位点存在 1.625 个特有等位基因, 在所有品牌中最多。东营 M 平均每个位点存在 0.125 个特有等位基因, 为各品牌中最少。8 个微卫星位点的多态信息含量(PIC)值为 0.343~0.925, 最高为 TuMXLv7.56 位点, 最低为 M1103 位点, 除 M1103 位点外, 其他 7 个微卫星位点 PIC 都大于 0.5。黄骅 R、广州 Z 和海南 Z 的香农多样性指数较高, 其他 3 个品牌较低。8 个微卫星位点的无效等位基因频率范围为 0.031~0.403, 5 个位点存在无效等位基因。8 个微卫星位点分别对 6 个品牌凡纳滨对虾进行了 48 次 HWE 检验。其中, 4.17%(2/48)的检测结果表明为显著的偏离($0.01 < P < 0.05$), 58.33%(28/48)表现为极显著偏离($P < 0.01$), 其余的 37.5%(18/48)符合 HWE ($P > 0.05$)。

2.2 6 个商业品牌凡纳滨对虾的遗传分化

分子变异方差分析(AMOVA)发现, 仅有 12% 的遗传变异来自品牌间, 24% 来自品牌内个体间, 其余 64% 的变异均来自所有品牌个体, 这表明遗传变异主要存在于个体间(表 3)。

6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种的 F 统计量分别为 0.359 (F_{IT}), 0.273 (F_{IS}), 0.118 (F_{ST})。两两品牌间的值 F_{ST} 在 0.034 和 0.111 之间, 均 < 0.15 (表 4), 且明显的分成两部分。其中, 小于 0.05 的为 4 组, 占全部 15 组的 26.67%, 没有出现遗传分化($F_{ST} < 0.05$); 介于 0.05 和 0.15 之间的为 11 组, 占全部 15 组的 73.33%,

为中等程度分化($0.05 < F_{ST} < 0.15$)。另外, 从基因流分布情况来看, 两两群体间 $N_m > 1$, 范围为 1.806~7.027 (表 4)。

2.3 6 个商业品牌凡纳滨对虾的遗传聚类

从表 5 可以看出, 东营 M 和海南 Z 品牌间的遗传距离最近(0.128), 遗传相似性系数最大(0.880), 亲缘关系最近; 广州 P 和海南 S 品牌间的遗传距离最远(0.549), 遗传相似性系数最小(0.578), 亲缘关系最远。由图 2 可以看出, 6 个品牌的凡纳滨对虾聚为 2 个明显的分支, 广州 P 和广州 Z 聚为一支, 东营 M、黄骅 R、海南 Z 和海南 S 聚为一支。

2.4 6 个商业品牌凡纳滨对虾遗传关系主成分分析

主成分分析(PCA)结果显示(图 3), 6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种产生了明显的遗传歧化。其中, 广州 P 和广州 Z 最为聚集, 其次为东营 M 和海南 Z, 之后为黄骅 R 和海南 S, 主成分 1 (Coord.1)和主成分 2 (Coord.2)共解释了总遗传变异的 71.22%。在个体水平上, 主成分 1 (Coord.1)和主成分 2 (Coord.2)共解释了总遗传变异的 20.05%。从图 3 可知, 6 个品牌的 180 尾凡纳滨对虾个体聚集较为集中, 其中, 广州 P、广州 Z 和黄骅 R 3 个品牌的凡纳滨对虾交集最大。同时, 每个品牌的凡纳滨对虾个体无法单独聚为一类。

表2 6个品牌凡纳滨对虾在8个微卫星位点中的遗传多样性参数
Tab.2 Genetic diversity indices of 8 microsatellite loci of *L. vannamei* from 6 brands

品牌 Brands	参数 Indices	位点 Loci							
		TuMXLv 8.256	M1103	TuMXLv 7.121	TuMXLv 9.90	Lv12	TuMXLv 9.103	TuMXLv 7.56	TuMXLv 10.33
广州 P	N_a	5	5	4	8	9	10	12	7
	N_e	2.590	2.187	3.209	4.775	5.279	4.986	6.977	4.235
	I	1.195	1.109	1.261	1.731	1.839	1.870	2.176	1.619
	H_o	0.233	0.533	0.733	0.567	0.600	0.600	0.867	0.200
	H_e	0.614	0.543	0.688	0.791	0.811	0.799	0.857	0.764
	P_{H-w}	0	0.090	0.570	0	0.270	0	0	0
广州 Z	N_a	6	5	5	8	7	15	16	7
	N_e	2.667	1.933	2.857	4.523	4.327	8.219	9.677	3.082
	I	1.278	0.873	1.288	1.742	1.630	2.409	2.451	1.433
	H_o	0.267	0.533	0.500	0.433	0.433	0.633	0.867	0.133
	H_e	0.625	0.483	0.650	0.779	0.769	0.878	0.897	0.676
	P_{H-w}	0	1.000	0.040	0	0	0	0	0
海南 Z	N_a	6	5	6	11	6	12	10	7
	N_e	2.795	1.421	3.020	4.986	2.975	5.863	7.087	4.337
	I	1.321	0.649	1.361	1.920	1.316	2.013	2.087	1.653
	H_o	0.267	0.300	0.867	0.800	0.633	0.700	0.833	0.533
	H_e	0.642	0.296	0.669	0.799	0.664	0.829	0.859	0.769
	P_{H-w}	0	0.140	0.370	0	0	0	0.440	0.130
东营 M	N_a	3	2	5	7	5	4	8	2
	N_e	1.665	1.514	2.643	4.433	2.242	3.141	4.412	1.342
	I	0.642	0.523	1.235	1.680	1.093	1.231	1.647	0.423
	H_o	0.467	0.233	0.633	0.767	0.133	0.400	0.700	0.233
	H_e	0.399	0.339	0.622	0.774	0.554	0.682	0.773	0.255
	P_{H-w}	0.750	0.090	0.980	0.170	0	0.010	0.520	0.640
黄骅 R	N_a	8	3	6	11	10	12	15	11
	N_e	3.066	1.439	3.346	8.108	5.573	5.769	11.842	3.364
	I	1.525	0.532	1.393	2.231	1.942	2.060	2.569	1.622
	H_o	0.433	0.300	0.700	0.800	0.467	0.333	0.633	0.333
	H_e	0.674	0.305	0.701	0.877	0.821	0.827	0.916	0.703
	P_{H-w}	0	0.990	0.140	0.620	0	0	0	0
海南 S	N_a	6	2	5	4	3	4	7	7
	N_e	2.927	1.142	2.296	2.353	1.106	3.025	4.412	3.015
	I	1.291	0.245	1.028	1.002	0.230	1.212	1.624	1.359
	H_o	0.300	0.133	0.333	0.433	0.033	0.467	0.700	0.367
	H_e	0.658	0.124	0.564	0.575	0.096	0.669	0.773	0.668
	P_{H-w}	0	0.700	0	0.100	0	0	0	0

3 讨论

微卫星分子标记在种内有高度的遗传变异,是群体遗传分化分析的有效标记(孙效文等, 2008)。微卫星分子标记广泛分布于基因组中,数量众多,容易检测,在分子辅助育种和物种多样性检测等方面被广泛

应用(张丽娟等, 2014)。群体的遗传多样性来源于物种适应复杂环境和生存进化(Li *et al*, 2016),其主要表现在等位基因数的丰富和均匀程度、遗传杂合度的大小、多态信息含量的高低 3 个方面(Beardmore *et al*, 1997; 王鹤等, 2016)。研究发现,等位基因越丰富,遗传杂合度数值越大,多态信息含量越高,则群体遗

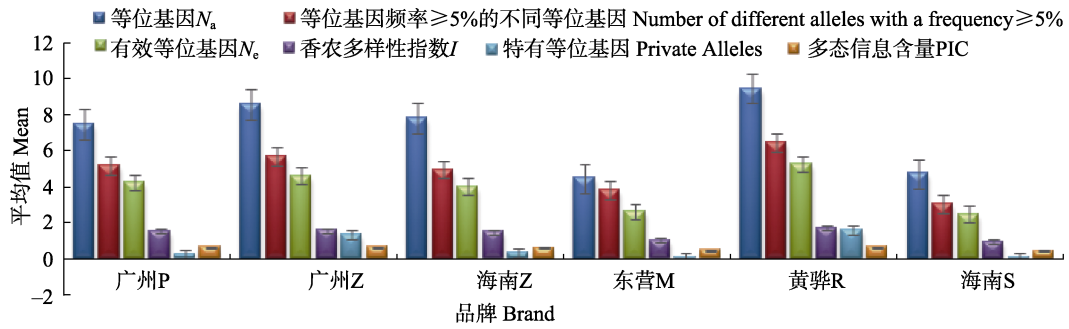


图 1 6 个品牌凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性参数均值(8 个微卫星位点)

Fig. 1 Mean value of genetic diversity parameters of *L. vannamei* from 6 brands (8 microsatellite loci)

表 3 6 个品牌凡纳滨对虾分子变异方差分析

Tab.3 Analysis of molecular variances (AMOVA) of microsatellites in 6 brands of *L. vannamei*

变异 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	变异组分 Variance components	占总变异的百分比 Percentage of variation	固定系数 Fixation indices	<i>P</i>
品牌间 Among brands	5	124.825	0.359	12%	0.118	0.001
品牌内个体间 Among individuals	174	594.033	0.732	24%	0.273	0.001
所有个体间 Within individuals	180	351.000	1.950	64%	0.359	0.001
总计 Total	359	1069.858	3.041	100%		

表 4 6 个品牌凡纳滨对虾 F_{ST} 值(下三角)与 N_m 值(上三角)

Tab. 4 Pair-wise F_{ST} (below the diagonal) and N_m (above the diagonal) between six brands of *L. vannamei*

	广州 P	广州 Z	海南 Z	东营 M	黄骅 R	海南 S
广州 P	1	7.027	4.175	2.061	4.995	1.806
广州 Z	0.034	1	4.015	2.657	6.108	1.988
海南 Z	0.056	0.059	1	5.146	5.231	3.205
东营 M	0.059	0.086	0.046	1	2.093	
黄骅 R	0.108	0.039	0.046	0.085	1	3.394
海南 S	0.086	0.111	0.072	0.107	0.069	1

表 5 6 个品牌凡纳滨对虾遗传相似性系数(下三角)与遗传距离(上三角)

Tab.5 Genetic similarity coefficient (below the diagonal) and genetic distance (above the diagonal) of six brands' *L. vannamei*

	广州 P	广州 Z	海南 Z	东营 M	黄骅 R	海南 S
广州 P	1	0.172	0.314	0.510	0.286	0.549
广州 Z	0.842	1	0.317	0.359	0.212	0.447
海南 Z	0.730	0.729	1	0.128	0.241	0.222
东营 M	0.601	0.698	0.880	1	0.366	0.318
黄骅 R	0.751	0.809	0.786	0.694	1	0.206
海南 S	0.578	0.639	0.801	0.728	0.814	1

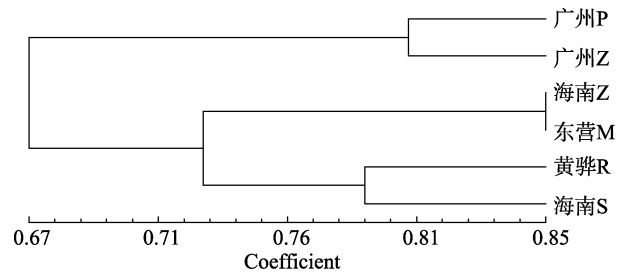


图 2 根据遗传一致度构建的 UPGMA 树

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on genetic identity of *L. vannamei* from 6 brands

传变异更高, 更能应对环境变化, 也更能产生优质的种质资源(Eschenroeder *et al*, 2016)。

关于凡纳滨对虾微卫星标记开发和筛选的工作已有大量报道(Meehan, *et al*, 2003; 马宁等, 2013; 杨铭等, 2017)。本研究从实验室发表过的文章(李东宇等, 2016)中筛选出 8 个扩增稳定的微卫星位点, 分析了 6 个国内品牌的凡纳滨对虾商业苗种的遗传多样性、遗传结构和亲缘关系。结果显示, 87.5% (7/8) 的位点平均多态信息含量(PIC)都在 0.5 以上。根据 Botstein 等(1980)提出的衡量标准, 当 $PIC > 0.5$ 时, 意味着该位点为高度多态位点, 这也说明本研究所引用的微卫星标记的多态性较高。基因杂合度是衡量群体

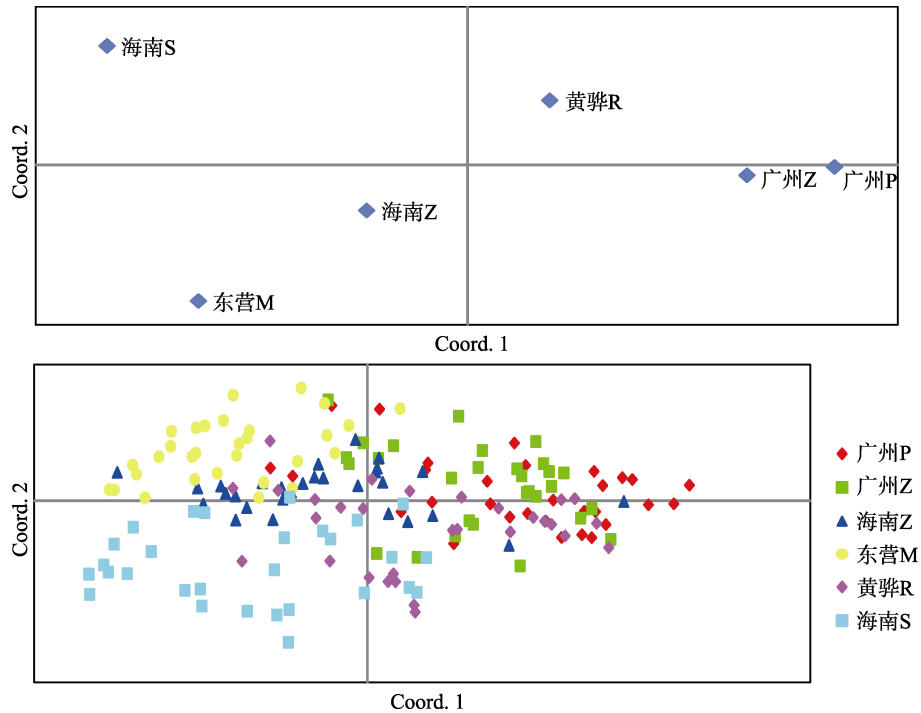


图 3 6 个品牌凡纳滨对虾主成分分析

Fig. 3 Principal coordinate analysis (PCA) for *L. vannamei* from six brands

遗传变异水平的理想参数(王日芳等, 2017), 8 个微卫星位点中的观测杂合度(H_o)平均为 0.486, 期望杂合度(H_e)平均为 0.745, 观测杂合度小于期望杂合度, 也从一个侧面说明了国内商业苗种凡纳滨对虾出现了杂合子缺失、纯合子过剩的情况。在进行微卫星分型的 8 个位点中, 有 5 个(62.5%)位点显著偏离 HWE ($P < 0.05$)。产生该结果的原因: 一方面为实验对虾纯合子过剩、杂合子缺失; 另一方面为水产动物生物结构较为简单, 从而导致的遗传变异度也较高。因此, 造成微卫星位点在同一物种不同个体中发生碱基形态和数目的变异, 无法扩增正确的等位基因, 扩增的无效等位基因会导致分型结果显著偏离 HWE (舒妙安等, 2011; 宋忠魁等, 2013)。亲缘关系的远近可以用遗传距离来反映(陈子桂等, 2016; 刘洪涛等, 2018)。在本研究中, 遗传距离最大的 2 个品牌是广州 P 和海南 S, 遗传距离最小的 2 个品牌是东营 M 和海南 Z, 并且针对个体的遗传关系主成分分析(PCA)表明, 6 个品牌的凡纳滨对虾无法依照每个品牌单独聚集, 品牌间亲缘关系较为接近。这种结果表明, 当前国内不同品牌的凡纳滨对虾来源存在一定的相似性, 也可能是二代、三代苗种导致部分品牌对虾出现近交情况, 使其亲缘关系逐渐接近。

种苗处于对虾产业链上游, 其质量对养殖成败起关键作用(黄小帅等, 2019)。本研究所分析的 6 个品

牌凡纳滨对虾商业苗种中, 黄骅 R 与广州 Z 具有较高的遗传多样性, 不同品牌的商业苗种间的遗传特征存在一定差异。在当前凡纳滨对虾养殖规模不断扩大的情况下, 研究遗传因素与养殖生产性能之间的关联尤为重要, 只有充分掌握对虾群体的遗传背景, 才能合理利用杂交优势进行良种选育。

参 考 文 献

- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 1997, 28(10): 829–839
- 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
- Bringmann P, Rinke J, Appel B, *et al.* Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(4): 2706–2721
- Chen ZG, Wang PP, Liao Y, *et al.* Genetic diversity analysis of F_2 generation families of carp hybrid lines population using microsatellite. *Fisheries Science and Technology Information*, 2016, 43(2): 83–87 [陈子桂, 王培培, 廖愚, 等. 微卫星分析鲤鱼杂交系 F_2 代家系群体遗传多样性. *水产科技情报*, 2016, 43(2): 83–87]
- Eschenroeder JC, Roberts JH. Novel polymorphic microsatellite

- loci for distinguishing rock bass (*Ambloplites rupestris*), Roanoke bass (*Ambloplites cavifrons*), and their hybrids. *Molecular Biology Reports*, 2016, 43(10): 1035–1039
- Huang XS, Xu Y, Hu XJ, *et al.* Genetic diversity analysis of first filial generation of seven introduced *Litopenaeus vannamei* populations using microsatellite DNA markers. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(1): 54–62 [黄小帅, 徐煜, 胡晓娟, 等. 利用微卫星标记分析 7 个凡纳滨对虾引进群体子一代的遗传多样性. *南方水产科学*, 2019, 15(1): 54–62]
- Jie XY, Su TF, Chen W, *et al.* Analysis on genetic diversity of six cultured stocks of *Litopenaeus vannamei*. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(6): 42–49 [颀晓勇, 苏天凤, 陈文, 等. 凡纳滨对虾 6 个养殖群体遗传多样性的比较分析. *南方水产*, 2008, 4(6): 42–49]
- Li DY, Kong J, Meng XH, *et al.* Development of multiplex PCR systems of microsatellite markers for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its application for parentage identification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 58–67 [李东宇, 孔杰, 孟宪红, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 58–67]
- Li Y, Zhao H, Peng Z, *et al.* Isolation and characterization of 21 polymorphic microsatellite markers for a new labeonine fish (*Paraqianlabeo lineatus* Zhao *et al.* 2014) using illumina paired-end sequencing. *Journal of Applied Ichthyology*, 2016, 32(1): 126–128
- Liu HT, Yang MQ, He YG, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in eight geographical populations of *Litopenaeus vannamei*. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2018, 36(2): 146–152 [刘洪涛, 杨明秋, 何玉贵, 等. 凡纳滨对虾八个地理群体遗传多样性的微卫星分析. *海南大学学报自然科学版*, 2018, 36(2): 146–152]
- Ma CY, Ma HY, Ma LB, *et al.* Microsatellite analysis on genetic variation of imported *Litopenaeus vannamei* population and culture stocks. *Marine Fisheries*, 2011, 33(1): 1–8 [马春艳, 马洪雨, 马凌波, 等. 凡纳滨对虾引进群体和 2 个养殖群体遗传变异的微卫星分析. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 1–8]
- Ma N, Zeng DG. Isolation of microsatellite sequences from *Litopenaeus vannamei*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(6): 2629–2633 [马宁, 曾地刚. 凡纳滨对虾微卫星序列的筛选. *西南农业学报*, 2013, 26(6): 2629–2633]
- 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*, 2003, 5(4): 311–330
- Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, *et al.* Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics*, 1998, 18(4): 345–349
- Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(2): 211–215
- Shu MA, Zhou YF, Zhu XY, *et al.* Microsatellite analysis on genetic diversity of seven wild populations of *Scylla paramamosain* in China. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 977–984 [舒妙安, 周宇芳, 朱晓宇, 等. 中国沿海拟穴青蟹群体遗传多样性的微卫星分析. *水产学报*, 2011, 35(7): 977–984]
- Song ZK, Nie ZP, Wang YF. Screening for polymorphic primer pairs of (CA)_n microsatellite from *Scylla paramamosain* (mud crab) genome. *Marine Sciences*, 2013, 37(10): 98–103 [宋忠魁, 聂振平, 王芳宇. 拟穴青蟹(CA)_n 微卫星 DNA 多态性引物筛选. *海洋科学*, 2013, 37(10): 98–103]
- Sun MM, Yang QB, Chen BY, *et al.* Genetic diversity in four populations of *Penaeus monodon* assessed by AFLP makers. *Marine Sciences*, 2017, 41(3): 41–47 [孙苗苗, 杨其彬, 陈百尧, 等. 斑节对虾 4 个地理群体遗传多样性的 AFLP 分析. *海洋科学*, 2017, 41(3): 41–47]
- Sun XW, Zhang XF, Zhao YY, *et al.* Development and application of microsatellite markers in aquatic species. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(4): 689–703 [孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 689–703]
- Tang Y, Meng XF, Shen RF, *et al.* Research and application of family selective breeding in culture of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*, 2018, 37(4): 555–563 [唐扬, 孟小菲, 沈瑞福, 等. 凡纳滨对虾家系选育的研究与应用. *水产科学*, 2018, 37(4): 555–563]
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463–6471
- Tong X, Gong SY, Yu DH, *et al.* Genetic diversity of cultured Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stocks of different generations in China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(2): 214–220 [童馨, 龚世圆, 喻达辉, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同世代养殖群体的遗传多样性分析. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2): 214–220]
- Wang H, Wang TT, Hu LP, *et al.* Microsatellite analysis of genetic characteristics in crosses between Korea population and China population of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2016, 35(1): 60–66 [王鹤, 王田田, 胡丽萍, 等. 仿刺参中国群体与韩国群体杂交子代微卫星标记分析. *水产科学*, 2016, 35(1): 60–66]
- Wang 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]
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 78–86]

- Wang XQ, Ma S, Dong SL. Studies on the biology and cultural ecology of *Litopenaeus vannamei*: A review. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(4): 94–100 [王兴强, 马甦, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展. *海洋湖沼通报*, 2004(4): 94–100]
- Yang M, Yu Y, Zhang XJ, *et al.* Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 96–102 [杨铭, 于洋, 张晓军, 等. 基于转录组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发. *海洋科学*, 2017, 41(2): 96–102]
- Yu Y. Development of molecular markers and their applications in selective breeding of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2014 [于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014]
- Zeng DG, Chen XH, Li YM, *et al.* SSR Analysis of genetic diversity of *Litopenaeus vannamei*. *Reservoir Fisheries*, 2008, 28(1): 31–34 [曾地刚, 陈晓汉, 李咏梅, 等. 凡纳滨对虾遗传多样性的 SSR 分析. *水利渔业*, 2008, 28(1): 31–34]
- Zhang L, Chen Z, Wang L, *et al.* Effect of stocking density on intermediate cultivation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 76–83 [张龙, 陈钊, 汪鲁, 等. 放养密度对凡纳滨对虾苗种中间培育效果的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 76–83]
- Zhang LJ, Zhu F, Yin SW, *et al.* Microsatellite analysis of *Odontobutis potamophila*, *O. yaluensis* and their hybrid progeny. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(5): 9–14 [张丽娟, 祝斐, 尹绍武, 等. 河川沙塘鳢、鸭绿沙塘鳢及其杂交子代的微卫星分析. *淡水渔业*, 2014, 44(5): 9–14]
- Zhang Q, Li XL, Xue SW, *et al.* Screening and polymorphism of EST-microsatellite markers in *Litopenaeus vannamei*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(1): 121–126 [张琼, 李喜莲, 薛淑雯, 等. 凡纳滨对虾 EST-SSR 标记的筛选及遗传多态性检测. *海洋学报*, 2011, 33(1): 121–126]
- Zhang TS, Liu P, Li J, *et al.* Genetic diversity of cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp using microsatellites. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 6–12 [张天时, 刘萍, 李健, 等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究. *水产学报*, 2005, 29(1): 6–12]
- Zhang WQ. An important breeding species in the world—Biology of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Sciences*, 1990, 14: 69–73 [张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾生物学简介. *海洋科学*, 1990, 14: 69–73]

(编辑 马瑾艳)

Genetic Diversity Analysis of Domestic Commercial Brands Seedlings of *Litopenaeus vannamei* Based on Microsatellite Molecular Markers

FANG Zhenpeng^{1,2}, MENG Xianhong^{2①}, LI Xupeng², LUAN Sheng²,
CAO Jiawang², CHEN Baolong², KONG Jie², YAN Maocang³, HU Lihua³

(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, Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory of Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;
3. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou 325005)

Abstract To clarify the genetic diversity characteristics of domestic commercial brand seedlings of *Litopenaeus vannamei*, six domestic commercial brands of *L. vannamei*, namely, Huanghua R, Dongying M, Guangzhou P, Guangzhou Z, Hainan S, and Hainan Z, were collected from Hebei, Shandong, Guangdong, and Hainan Province. Their genetic diversity was detected using eight microsatellite markers. The results showed that the average allele number (N_a), expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), and polymorphic information content (PIC) were 4.5~9.5, 0.516~0.733, 0.346~0.550, and 0.472~0.700, respectively. The genetic diversity of the six brands ranged from high to low: Huanghua R > Guangzhou Z > Guangzhou P > Hainan Z > Dongying M > Hainan S, and 48 Hardy-Weinberg equilibrium tests were conducted on the 6 brands of *L. vannamei* using 8 microsatellite loci. It was observed that, 4.17% (2/48) showed significant deviation ($0.01 < P < 0.05$) and 58.33% (28/48) showed extremely significant deviation ($P < 0.01$). Molecular variance analysis (AMOVA) showed that 12% of the variance was from the brand, 24% was from the individual within the brand, and the remaining 64% was from all individual brands. UPGMA clustering map showed that each brand of *L. vannamei* could not cluster independently. The analysis showed that the six brands of *L. vannamei* clustered into two distinct branches, Guangzhou P and Guangzhou Z clustered into one branch, and Dongying M, Huanghua R, Hainan Z, and Hainan S clustered into another branch. PCA results showed that each brand of *L. vannamei* could not cluster independently. This study preliminarily analyzed the genetic background of *L. vannamei* cultured in China. The experimental results can provide data to support the breeding of improved varieties of *L. vannamei*.

Key words Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*; Commercial seedling; Microsatellite; Genetic diversity

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190722001

http://www.yykxjz.cn/

段骄阳, 刘慧, 陈四清, 蒋增杰, 蔺凡, 常丽荣, 卢龙飞. 基于 DEB 理论的皱纹盘鲍个体生长模型参数的测定. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 110–117

Duan JY, Liu H, Chen SQ, Jiang ZJ, Lin F, Chang LR, Lu LF. The measurement of parameters for the dynamic energy budget (DEB) model in *Haliotis discus hannai* (disk abalone). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 110–117

基于 DEB 理论的皱纹盘鲍个体 生长模型参数的测定*



段骄阳^{1,2} 刘 慧^{2①} 陈四清² 蒋增杰² 蔺 凡² 常丽荣³ 卢龙飞³

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心
上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 3. 威海长青海洋科技股份有限公司 荣成 264316)

摘要 为获取皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)个体生长模型所需的6个关键参数,设计了饥饿耗能、温度对耗氧的影响等相关生理实验,计算得到各项参数值。单位体积维持耗能率的值 $[\dot{p}_M]$ 、形成单位体积结构物质所需的能量值 $[E_G]$ 、单位体积最大储存能量 $[E_m]$ 和储备能量值 μ_E 4个参数,通过连续测定皱纹盘鲍饥饿过程中呼吸耗氧率和软组织干重不断下降直至保持稳定时的能量值计算;温度函数中Arrhenius温度 T_A 的数值根据皱纹盘鲍在不同温度梯度下的单位干重耗氧率测定、计算;形状系数 δm 值通过统计测量的壳长、软组织湿重等生物学参数拟合回归得到。结果显示,皱纹盘鲍在饥饿后,呼吸耗氧率和软组织干重分别降低了26.3%和70.0%,呼吸耗氧率由2.69 mg/(ind·h)逐渐降低并稳定在0.8 mg/(ind·h),软组织干重由(5.21±0.89) g降低至(3.84±0.22) g;根据公式计算得 $[\dot{p}_M]$ 和 $[E_G]$ 的值分别为20.18 J/(cm³·d)和8120 J/cm;皱纹盘鲍饥饿前后有机物含量分别为80%和58%,经过换算, $[E_m]$ 和 μ_E 的值分别为2726 J/cm³和32583 J/g。不同规格的皱纹盘鲍在水温为5℃~20℃范围内,温度与单位干重耗氧率呈正比;当水温超过20℃之后,温度与单位干重耗氧率呈反比。在转折点20℃之前,单位干重耗氧率的ln值与温度(热力学温度, K)的倒数呈线性关系,线性回归方程斜率的绝对值为Arrhenius温度 T_A 值($T_A=7196$ K)。生物学统计分析鲍壳长(L)与体积(V)呈三次函数关系: $V=0.0639 L^{3.1621}$ ($R^2=0.9852$),根据公式对软组织湿重的立方根与壳长进行线性回归,所得的斜率即为形状系数 δm 值($\delta m=0.43$)。本研究对建立以DEB理论为指导的皱纹盘鲍个体生长模型提供了数据支撑。

关键词 皱纹盘鲍; DEB理论; 模型参数

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0013-08

动态能量收支(Dynamic energy budget, DEB)理论是 Kooijman(1986)基于 κ 原则提出的,描述生物摄入

* 科技部国际创新合作专项“基于生态系统的水产养殖空间规划研究”(2016YFE0112600)和“欧盟地平线 2020 项目”(633476-H2020-SFS-2014-2015)共同资助 [This work was supported by the Key Programme for International Cooperation on Scientific and Technological Innovation, Ministry of Science and Technology (2016YFE0112600), and Optimizing Space Available for European Aquaculture (AquaSpace) (633476-H2020-SFS-2014-2015)]. 段骄阳, E-mail: d1395127939@163.com

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

收稿日期: 2019-07-22, 收修改稿日期: 2019-08-02

同化的能量一部分(κ)用于维持身体结构生长,另一部分($1-\kappa$)用于性腺成熟和繁殖储备(Kooijman, 2000)。依据 DEB 理论而建立的个体生长模型,又称动态能量收支模型、DEB 模型,不仅能够量化能量在整个生物生活史阶段的分配情况(Sousa *et al*, 2010; Ren *et al*, 2001; Kooijman, 2010),而且能够模拟生物在一段时期内的生长状况。DEB 理论的关键是基于物种之间代谢的相似性,且都遵循 κ 原则。DEB 模型是参数化模型,原则上相同的基础模型结构可用于所有的生物物种,模型表现出的物种在生命史上的差异主要是由于 DEB 参数集合的差异(Sousa *et al*, 2006)。因此,参数对于 DEB 模型的构建十分重要,参数越准确,模型的拟合效果越好(Ren *et al*, 2008; 张继红等, 2016)。目前,DEB 模型已成功应用于水产养殖,包括鱼类(Orestis *et al*, 2019)、贝类(Bourlès *et al*, 2009)、大型海藻(蔡碧莹等, 2019)和海参(Ren *et al*, 2016)等。

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国重要的养殖经济贝类,主要分布在辽东半岛和山东半岛(常亚青等, 1998)。皱纹盘鲍含有丰富的营养成分,深受人们喜爱(Koizumi *et al*, 2017; 李太武等, 1995)。随着市场需求量的增大以及水产养殖技术的成熟,皱纹盘鲍已经实现大规模人工养殖(杨义等, 2007; 张晓梅等, 2010)。通过建立皱纹盘鲍个体生长模型,并进一步建立其养殖容量模型,对于指导养殖管理和评估养殖容量具有重要意义(刘慧等, 2018)。国内外对双壳滤食性贝类 DEB 模型的研究已有较多报道。国外已建立贻贝(*Mytilus edulis*) (Saraiva *et al*, 2012)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Rico-Villa *et al*, 2010)、蛤类(*Macoma balthica*; *Cerastoderma edule*) (van Hare *et al*, 1993)等的 DEB 模型;国内有虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) (张继红等, 2017)的 DEB 模型。由于国外鲍养殖相较于其他海产贝类品种较少,国内对数理模型的研究起步较晚,因此,单壳滤食性贝类(如鲍)DEB 模型的研究较少,主要以传统能量方程的研究为主(Fang *et al*, 2018)。本研究参照国内外贝类生物 DEB 模型的研究方法,通过生理实验确定皱纹盘鲍 DEB 模型的 6 个相关参数,包括单位体积维持耗能率(Volume-specific maintenance costs, $[\dot{p}_M]$)、单位体积结构物质所需的能量(Volume-specific costs for structure, $[E_G]$)、单位体积最大储能密度(Maximum storage density, $[E_m]$)、储备能量含量(Energy content of reserve, μ_E)、形状系数(Shape coefficient, δm)和 Arrhenius 温度(Arrhenius temperature, T_A),可为皱纹

盘鲍个体生长模型的构建奠定参数基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

选取壳长为(5.91±0.26) cm 的皱纹盘鲍用于饥饿实验。选取不同规格[分为 3 组:a 组壳长为(2.37±0.18) cm, b 组为(4.65±0.11) cm, c 组为(6.21±0.51) cm]分别用于温度对耗氧的影响实验和生物学测量。样品均取自山东省荣成市寻山集团。皱纹盘鲍去掉表层附着物之后置于实验室水槽中 24 h 充气暂养,暂养水温为(18±1)°C,盐度为 30,暂养 3 d,成活率稳定后开始正式实验。

实验于 2018 年 9 月~10 月初、10 月底~12 月在威海长青海洋科技股份有限公司国家海产贝类研究中心实验室进行。

1.2 实验方法

1.2.1 饥饿实验 取同一规格、壳长为(5.91±0.26) cm 皱纹盘鲍 70 个,进行饥饿实验。实验期间不投饵,水温为皱纹盘鲍正常呼吸代谢的温度,控制在 18°C 左右,每 7 d 换水 3 次,保持水槽中的海水清洁且不含杂藻。每隔 5~10 d 取 5 个皱纹盘鲍,碘量法(GB/T 7489-87)测定其呼吸耗氧率,并测定其总湿重(W)、软组织湿重(WW)、软组织干重(DW)和软组织有机物含量(%),软组织干重与呼吸耗氧率基本保持恒定时结束实验(35 d)。其中,总湿重为皱纹盘鲍体表无水后的全重量;软组织湿重为剥离壳之后,剩余全部软组织的鲜重;软组织干重为测定完软组织湿重之后,在 60°C 下的烘干箱烘干 72 h 的重量;软组织有机物含量根据灰分法(GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》)估算,即将称过干重的软组织进行碳化至无烟,然后转移到马弗炉中,在 450°C 下灼烧 4 h 后称重,质量差即为软组织有机物的含量。皱纹盘鲍不随饥饿时间而变化的呼吸耗氧率为单位体积维持耗能率 $[\dot{p}_M]$:

$$[\dot{p}_M] = R_t \times E_o \times t / (\rho_o \times V) \quad (1)$$

式中, R_t 为皱纹盘鲍饥饿后基本恒定的呼吸耗氧率[mg/(ind·h)], E_o 为 O_2 的能值(1 ml O_2 =20.3 J)(Ren *et al*, 2008), t 为时间转化系数(1 d=24 h), ρ_o 为 O_2 在 15°C 下的密度(1.226 mg/ml), V 为皱纹盘鲍的体积(cm^3)。

皱纹盘鲍软组织干重不随饥饿时间变化时有机物的重量即为皱纹盘鲍单位体积结构物质所需的能量 $[E_G]$:

$$[E_G] = k \times W_t \times C_t / (T_r \times V) \quad (2)$$

式中, k 为有机物的能值(23000 J/g) (Brey *et al.*, 1988; van der Veer *et al.*, 2006), W_t 为实验结束时保持恒定的软组织干重(g), C_t 为实验结束时贝类软组织有机物含量(%), T_r 为生长效率的转换系数($T_r=40\%$) (van der Veer *et al.*, 2006), V 为鲍的体积(cm^3)。

鲍最大储存能量 $[E_m]$ 为初始能量与饥饿后剩余的结构物质能量之差:

$$[E_m] = k \times (W_0 \times C_0 - W_t \times C_t) / V \quad (3)$$

式中, k 为有机物的能值(23000 J/g), W_0 为软组织干重的初始值(g), C_0 为实验初始时皱纹盘鲍软组织有机物含量(%), W_t 为实验结束时保持恒定软组织干重(g), C_t 为实验结束时贝类软组织有机物含量(%), V 为鲍的体积(cm^3)。

储备能量含量 μ_E 为初始和终末能量之差与软组织干重之差的比值:

$$\mu_E = k \times (W_0 \times C_0 - W_t \times C_t) / (W_0 - W_t) \quad (4)$$

式中, k 为有机物的能值(23000 J/g), W_0 为软组织干重的初始值(g), C_0 为实验初始时鲍软组织有机物含量(%), W_t 为实验结束时保持恒定的软组织干重(g), C_t 为实验结束时贝类软组织有机物含量(%)。

1.2.2 单位干重耗氧率的影响 将暂养的 3 种规格的皱纹盘鲍分为 5 组, 每组 5 只, 由室温 18°C 逐步升温或降温至 5°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 和 25°C 5 个温度梯度, 防止皱纹盘鲍因温度骤变不适应而死亡。溶解氧采用碘量法测定, 耗氧实验进行 1~2 h, 在密闭的呼吸室中测定初始和终末耗氧率(DO), 并测定鲍的软组织干重(DW)。

单位干重耗氧率 OR 计算公式:

$$\text{OR} = (\text{DO}_0 - \text{DO}_t) \times V_L / (\text{DW} \times t_1) \quad (5)$$

式中, OR 为皱纹盘鲍单位干重耗氧率 [$\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$], DO_0 为初始溶解氧(mg/L), DO_t 结束时溶解氧(mg/L), V_L 为呼吸室体积(L), DW 为软组织干重(g), t_1 为耗氧实验持续的时间(h)。

1.2.3 生物学测定 取 100 只不同规格的鲍测定其生物学参数, 包括壳长(L)、总湿重(W)、软组织湿重(WW)及软组织干重(DW)。壳长用游标卡尺(精度 0.01 mm)测量; 重量采用电子天平(精度 0.01 g)称量。体积(V)通常较难测量, 一般根据软组织湿重和密度($1.1 \text{ g}/\text{cm}^3$)的乘积得到(Sablani *et al.*, 2004)。

$$V = (\delta m \times L)^3 \quad (6)$$

式中, V 为鲍的体积(cm^3); δm 为形状系数; L 为鲍的壳长(cm); DW 为鲍软组织干重(g)。

1.3 数据分析

实验结果运用 Excel 2016 进行数据统计与线性回归估计并作图; 采用 SPSS 22.0 分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)得到标准差, 最终结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

2 结果

2.1 $[E_G]$ 、 $[\dot{p}_M]$ 、 $[E_m]$ 和 μ_E 的值

实验共进行 35 d, 期间不投喂。随着饥饿时间延长, 皱纹盘鲍软组织干重和耗氧率逐渐降低。鲍呼吸耗氧率由最初 $2.69 \text{ mg}/(\text{ind}\cdot\text{h})$ 逐渐下降, 到第 30 天左右逐渐稳定在 $0.8 \text{ mg}/(\text{ind}\cdot\text{h})$ (图 1), 软组织干重由 $(5.21\pm 0.89) \text{ g}$ 降低至 $(3.84\pm 0.22) \text{ g}$ (图 2), 并基本保持恒定。软组织干重和呼吸耗氧率较初始值下降 26.3% 和 70%, 皱纹盘鲍软组织有机物含量从 80% 降到 58% (表 1)。

皱纹盘鲍在饥饿后耗氧率基本维持稳定, 根据公式(1)计算得出单位体积维持耗能率 $[\dot{p}_M]$ 的平均值为 $20.18 \text{ J}/(\text{cm}^3\cdot\text{d})$ 。

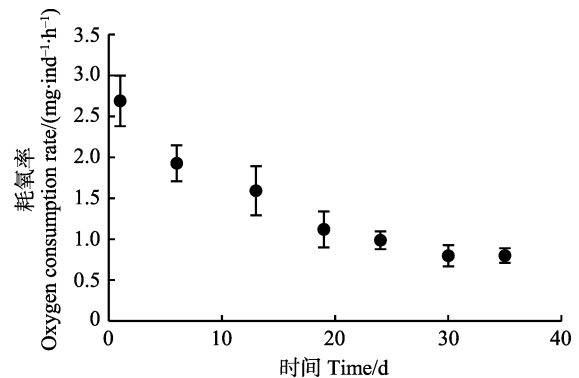


图 1 皱纹盘鲍耗氧率随饥饿时间的变化情况

Fig.1 The change of oxygen consumption rate of *H. discus hannai* with the starvation time

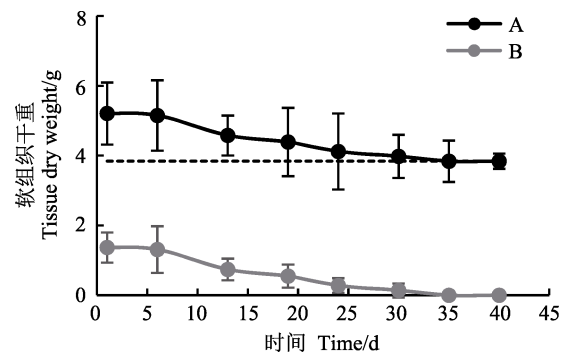


图 2 皱纹盘鲍软组织干重(A)和存储物质(B)

随饥饿时间变化情况

Fig.2 Changes in dry flesh weight (A) and storage of reserves (B) in *H. discus hannai* during the starvation experiment

表 1 饥饿实验相关参数计算值
Tab.1 Parameter calculation value related to the starvation experiment

项目 Items	初始值 Initial value	终末值 End value	结果 Result
软组织干重 Dry flesh weight (g)	5.21±0.89	3.84±0.22	
有机物含量 Organic content (%)	80.00±6.01	58.00±4.65	
单位体积结构物质所需的能量 [E_G] Volume-specific costs for structure, [E_G](J/cm ³)			8120±328
单位体积最大储存能量 [E_m] Maximum storage density, [E_m](J/cm ³)			2726±168
单位体积维持耗能率 [\dot{p}_M] Volume-specific maintenance costs, [\dot{p}_M](J/(cm ³ ·d))			20.18±2.71
储备能量含量 μ_E Energy content of reserve, μ_E (J/g)			32583±2810

在饥饿实验 25 d 内, 软组织干重下降明显, 在 35 d 之后基本趋于稳定, 根据公式(2), 将软组织干重转化为单位体积结构物质所需的能量值 [E_G], 为 8120 J/cm³。

根据公式(3), 将鲍饥饿实验初始时的能量值与饥饿后剩余能量的差值转化为单位体积最大存储能量 [E_m], 为 2726 J/cm³(表 1); 能量的差值与饥饿实验初始与结束时软组织干重差值的比值为储备能量 μ_E , 为 32583 J/g。

2.2 Arrhenius 温度 T_A 的值

在实验条件下, 3组皱纹盘鲍(表1)单位干重耗氧率随个体大小的增加而减小(图3)。耗氧率随温度呈先上升后下降的趋势, 在5℃~20℃时, 单位干重耗氧率随温度的升高而增大, 在20℃达最高值; 之后, 随温度升高, 单位干重耗氧率降低。在20℃转折点之前, 依据温度对皱纹盘鲍单位干重耗氧率的关系, 得出 a、b、c 组鲍耗氧率的 ln 值与温度(热力学温度)倒数的线性关系分别为 $\ln R = -6201.1T^{-1} + 21.377$ ($R^2 = 0.9914$)、 $\ln R = -7578.7T^{-1} + 25.87$ ($R^2 = 0.9126$)、 $\ln R = -7807.6T^{-1} + 26.104$ ($R^2 = 0.8656$) (图4)。3组方程斜率的绝对值的平均值为7196 K, 即皱纹盘鲍的 Arrhenius 温度 T_A 。

表 2 3 组皱纹盘鲍生物学特征
Tab.2 Biological characteristics of three groups of *H. discus hannai*

组别 Group	a	b	c
壳长 Shell length (cm)	2.37±0.18	4.65±0.11	6.21±0.51
总湿重 Shell-on wet weight (g)	1.28±0.27	10.90±2.58	28.75±5.60
软组织干重 Dry flesh weight (g)	0.15±0.08	1.98±0.35	5.63±0.89

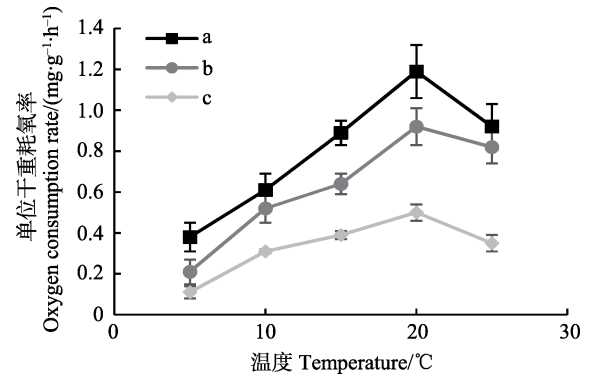


图 3 不同大小的皱纹盘鲍在不同温度下的单位干重耗氧率
Fig.3 Oxygen consumption rate per unit dry weight of abalone at different sizes

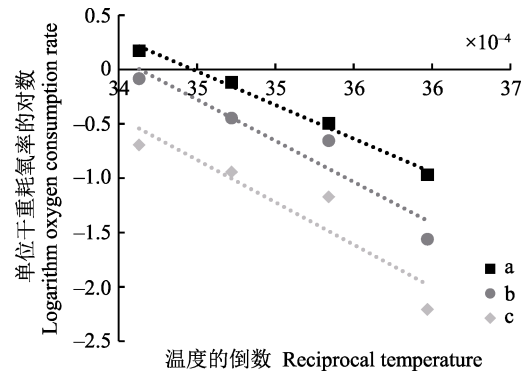


图 4 皱纹盘鲍单位干重耗氧率的 ln 值与温度的倒数线性关系

Fig.4 Linear relationship between the logarithm value of the oxygen consumption rate per unit dry weight and the reciprocal temperature

2.3 形状系数 δm 的值

通过拟合回归, 皱纹盘鲍壳长与体积符合三次函数(图5): $V = 0.0639 L^{3.1621}$ ($R^2 = 0.9852$), 根据公式(6)壳长与软组织湿重的立方根线性回归的斜率(图5)即为

形状系数 δm 的值为0.43。

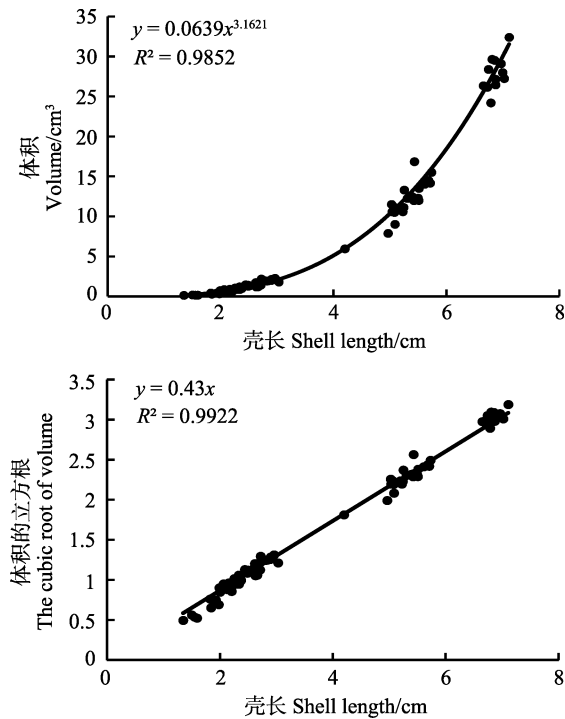


图5 皱纹盘鲍壳长与软组织湿重的关系

Fig.5 The relationship between wet flesh weight and shell length for *H. discus hannai*

3 讨论

3.1 贝类 DEB 模型参数获取方法

体积是模型输出状态变量的关键因素,形状系数 δm 是表征体积和表面积函数的重要参数,因此, δm 值的获得对模型构建十分重要。因贝类的体积和表面积较难测量,通常使用间接法测定。一种方法是只有贝壳的情况下测定贝壳的重量,用密度为 1 g/cm^3 物质(如马铃薯渣)填满贝壳再次称重(van der Veer *et al.*, 2001、2006),质量差为贝的物理体积,然后再通过公式 $V = (\delta m \times L)^3$ 计算形状系数的值,这种方法测定的体积要比实际生物量要高(van der Veer *et al.*, 2006), δm 的值也高。为使数据更准确,研究者通过另一种方法,直接测定软组织湿重,通过软组织密度转化获得。本研究根据后一种方法测定。

$[E_G]$ 和 $[\dot{p}_M]$ 的值无法直接测量得出,根据 van der Veer 等(2006)总结的方法: $[E_G]$ 值可以通过计算贝饥饿后且死亡之前软组织干重乘以转换系数来计算; $[\dot{p}_M]$ 值通过测定随着饥饿时间的推移,呼吸耗氧率的变化来推算,但要注意饥饿实验不能过长,否则结构物质会被分解,参数值会偏低。 $[E_m]$ 值可以直

接通过比较饱食个体最初的能量和饥饿后但死亡之前能量含量得出,也可通过比较个体在冬季和生长旺盛季节能量的差异间接估计得出,但这种方法耗时长且所得值偏小。3个参数均与饥饿过程有关,因此,通过饥饿实验可以同时获得 $[E_G]$ 、 $[E_m]$ 和 $[\dot{p}_M]$ 的值。本研究3个参数的获取就是采用饥饿实验的方法。

几乎所有贝类的生长都受温度的影响(王有基等, 2014),因 Arrhenius 温度 T_A 值是模型中很重要的一个参数。温度对生长、摄食、耗氧、排氨和吸收效率都有影响,因此, Arrhenius 温度可以通过测定温度对生物这几项指标的影响获得(张继红等, 2016)。其中,温度对生物的生长、摄食和吸收效率的影响通常需要长时间观测;排氨值的测定往往不够准确,通常食物残渣与生物粪便不好收集,容易造成数据偏高或偏低;测定耗氧相对来说耗时短且准确率相对高,因此,较多研究者通过测定温度对耗氧的影响来确定 Arrhenius 温度的值。本研究即通过温度对耗氧率的影响获得鲍的 Arrhenius 温度的值。

3.2 不同贝类 DEB 模型参数的差异

目前已有多种双壳贝类 DEB 模型参数的报道,其中,形状系数主要在 0.17~0.39 范围内,如太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 δm 值为 0.175,紫贻贝(*Mytilus edulis*)为 0.287,虾夷扇贝为 0.32 等(van der Veer *et al.*, 2006)。本研究测得的皱纹盘鲍形状系数是 0.43,比已报道的双壳贝类数值要大,这也许与皱纹盘鲍是单壳贝类,其软组织湿重与壳长的比值要高于双壳贝类。

贝类 Arrhenius 温度 T_A 的数值差异较大,一般品种贝类 Arrhenius 温度数值主要在 4000~11000 范围内,例如虾夷扇贝的 T_A 值为 4160(张继红等, 2016);新西兰绿唇贻贝(*Perna canaliculus*)的 T_A 值为 5530(Ren *et al.*, 2005);太平洋牡蛎幼虫的 T_A 值为 11000(Rico-Villa *et al.*, 2010)。本研究测得的鲍的 T_A 值为 7196,在已知研究报道的中上范围内。分析 T_A 值差异较大的主要原因是不同地域、不同贝类种群对温度的响应适应能力有差异(常亚青, 2007)。

不同贝类饥饿实验相关参数值 $[E_G]$ 、 $[\dot{p}_M]$ 、 $[E_m]$ 和 μ_E 值也有一定的差异,贝类 $[\dot{p}_M]$ 和 $[E_m]$ 的值在 10~26 和 2000~3000 范围内(van der Veer *et al.*, 2006)。主要原因是不同贝类对饥饿胁迫的响应程度不同;同时,这几个参数都与体积有关,因此,单位体积的差距导致最终的参数值不同,例如虾夷扇贝(张继红等,

2016)在饥饿 30 d 后, 软组织干重和耗氧率降低了 56%和 81%, 而本研究测得皱纹盘鲍在饥饿 35 d 后, 软组织干重和耗氧率较初始下降 26%和 70%, 其中, 耗氧率下降均在 60%以上, 这与贝类在饥饿后首先通过调节自身代谢水平来适应环境的变化, 减少能量的消耗有关(何毛贤等, 2010; Mehner *et al.*, 2010); 而软组织干重的下降率相差较大, 这主要是因为皱纹盘鲍耐饥饿能力较强, 一般体重下降 12%~24%才开始死亡(Leighton *et al.*, 1963)。

DEB 模型中其他的参数, 如温度函数中温度的上下限可根据鲍生长温度确定, 结构物质体积根据鲍性腺发育成熟的壳长计算, 吸收效率可根据已有研究得出。

DEB 模型已广泛应用于双壳贝类, 但对于鲍等单壳贝类研究较少。本研究通过实验计算了 6 个参数值, 为进一步构建皱纹盘鲍 DEB 模型提供了必需的参数值, 也为进一步研究其他单壳贝类提供了理论依据。

参 考 文 献

- Bourlès Y, Alunno-Bruscia M, Pouvreau S, *et al.* Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research*, 2009, 62(2-3): 62-71
- Brey T, Rumohr H, Ankar S. Energy content of macrobenthic invertebrates: General conversion factors from weight to energy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1988, 117(3): 271-278
- Cai BY, Zhu CB, Liu H, *et al.* Model simulated growth of kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 31-41 [蔡碧莹, 朱长波, 刘慧, 等. 桑沟湾养殖海带生长的模型预测. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 31-41]
- Chang YQ, Wang ZC. An energy budget for individual pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Ino). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1998, 9(5): 511-516 [常亚青, 王子臣. 皱纹盘鲍的个体能量收支. *应用生态学报*, 1998, 9(5): 511-516]
- Chang YQ. Mollusc culture. Beijing: China Agriculture Press, 2007 [常亚青. 贝类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 2007]
- Fang JH, Zhang P, Fang JG, *et al.* The growth and carbon allocation of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) of different sizes at different temperatures based on the abalone-kelp integrated multitrophic aquaculture model. *Aquaculture Research*, 2018, 49(8): 2676-2683
- He MX, Yuan T, Huang LM. Preliminary study on compensatory growth in pearl oyster *Pinctada martensi* Dunker, following starvation. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(6): 143-146 [何毛贤, 袁涛, 黄良民. 马氏珠母贝饥饿补偿生长的初步研究. *热带海洋学报*, 2010, 29(6): 143-146]
- Koizumi Y, Tsuji Y. Abalone *Haliotis* spp. Application of Recirculating Aquaculture, 2017, 12(30): 175-211
- Kooijman SALM. Population dynamics on basis of budgets. *Dynamics of Physiologically Structured Populations*, 1986, 266-297
- Kooijman SALM. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
- Kooijman SALM. Dynamic energy budget theory for metabolic organization. Cambridge: Cambridge University Press, 2010
- Leighton D, Boolootian RA. Diet and growth in the black abalone, *Haliotis cracerodii*. *Ecology*, 1963, 44(2): 227
- Li TW, Su XR, Ding MJ. The determination of some nutritional in abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1995(1): 47-48 [李太武, 苏秀榕, 丁明进. 皱纹盘鲍中几种营养成分的测定. *中国海洋药物*, 1995(1): 47-48]
- Liu H, Cai BY. Advance in research and application on aquaculture carrying capacity. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 158-166 [刘慧, 蔡碧莹. 水产养殖容量研究进展及应用. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 158-166]
- Mehner T, Wieser W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Fish Biology*, 2010, 45(2): 325-333
- Orestis SZ, Nikos P, Konstadia L. A DEB model for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Parameterisation and application in aquaculture. *Journal of Sea Research*, 2019, 143: 262-271
- Ren JS, Ross AH. Environmental influence on mussel growth: A dynamic energy budget model and its application to the greenshell mussel *Perna canaliculus*. *Ecological Modelling*, 2005, 189(3-4): 347-362
- Ren JS, Ross AH. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling*, 2001, 142(1-2): 105-120
- Ren JS, Schiel DR. A dynamic energy budget model: Parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 361(1): 42-48
- Ren JS, Stenton-Dozey J, Zhang J. Parameterisation and application of dynamic energy budget model to the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016, 9(1): 1-8
- Rico-Villa B, Bernard I, Robert R, *et al.* A dynamic energy

- budget (DEB) growth model for Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 2010, 305(1-4): 84-94
- Sablani SS, Kasapis S, Rahman MS, *et al.* Sorption isotherms and the state diagram for evaluating stability criteria of abalone. *Food Research International*, 2004, 37(10): 915-924
- Saraiva S, van der Meer J, Kooijman SALM, *et al.* Validation of a dynamic energy budget (DEB) model for the blue mussel. *Marine Ecology Progress*, 2012, 463(3): 141-158
- Sousa T, Domingos T, Poggiale JC, *et al.* Dynamic energy budget theory restores coherence in biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, 365(1557): 3413-3428
- Sousa T, Mota R, Domingos T, *et al.* Thermodynamics of organisms in the context of dynamic energy budget theory. *Physics Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2006, 74(5 Pt 1): 051901
- van der Veer H, Cardoso JFMF, van der Meer J. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*, 2006, 56(2): 107-124
- van der Veer H, Kooijman SALM, van der Meer J. Intra- and interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets. *Journal of Sea Research*, 2001, 45(34): 303-320
- van Haren RJF, Kooijman SALM. Application of a dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research*, 1993, 31(2): 119-133
- Wang YJ, Li LS, Li Q, *et al.* Research progress on eco-physiological responses of shellfish under ocean acidification and global warming. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(13): 3499-3508 [王有基, 李丽莎, 李琼, 等. 珍海洋酸化和全球变暖对贝类生理生态的影响研究进展. *生态学报*, 2014, 34(13): 3499-3508]
- Yang Y, Jiang SH, Tang L, *et al.* Advancements in studies on energy budget of abalone. *Science Paper Online*, 2007, 2(2): 149-152 [杨义, 姜森颢, 唐玲, 等. 鲍能量学研究进展. *中国科技论文*, 2007, 2(2): 149-152]
- Zhang JH, Wu WG, Liu Y, *et al.* A dynamic energy budget (DEB) growth model for Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* cultured in China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 497-506 [张继红, 吴文广, 刘毅, 等. 虾夷扇贝动态能量收支生长模型. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 497-506]
- Zhang JH, Wu WG, Xu D, *et al.* The estimation of dynamic energy budget (DEB) model parameters for scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 703-710 [张继红, 吴文广, 徐东, 等. 虾夷扇贝动态能量收支模型参数的测定. *水产学报*, 2016, 40(5): 703-710]
- Zhang XM, Wang CL, Li LG, *et al.* Oxygen consumption rate and effect of hypoxia stress on enzyme activity of *Octopus variabilis*. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(2): 72-79 [张晓梅, 王春琳, 李来国, 等. 耗氧率及溶氧胁迫对长蛸体内酶活力的影响. *水生态学杂志*, 2010, 3(2): 72-79]

(编辑 陈 辉)

The Measurement of Parameters for the Dynamic Energy Budget (DEB) Model in *Haliotis discus hannai* (Disk Abalone)

DUAN Jiaoyang^{1,2}, LIU Hui^{2①}, CHEN Siqing², JIANG Zengjie², LIN Fan², CHANG Lirong³, LU Longfei³

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, 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. Weihai Changqing Ocean Science & Technology Co., Ltd, Rongcheng 264316)

Abstract Six key parameters for the dynamic energy budget (DEB) model of the disk abalone (*Haliotis discus hannai*) were obtained through physiological experiments. The goal was to determine the influence of starvation on energy consumption and the influence of temperature on oxygen consumption. The value of four parameters, *i.e.*, Volume-specific maintenance costs [\dot{p}_M], Volume-specific costs for structure [E_G], Maximum storage density [E_m], and Energy content of reserve μ_E , was calculated through measuring energy consumption when oxygen consumption rate and dry flesh weight had ceased to decrease and remained steady during the starvation period. The value of Arrhenius temperature (T_A) was determined by measuring oxygen consumption rate of abalone per unit dry weight under different temperature gradients. The value of shape coefficient (δm) was calculated with a regression equation based on length and body mass data. The results showed: After the starvation experiment, dry flesh weight and oxygen consumption rate decreased by 26.3% and 70%, respectively. Meanwhile, the oxygen consumption rate increased from 2.69 mg/(ind·h) to 0.8 mg/(ind·h), and remained constant. The dry flesh weight decreased from (5.21±0.89) g to (3.84±0.22) g. Calculated according to the standard formulas, the values of [\dot{p}_M] and [E_G] were 20.18 J/(cm³·d) and 8120 J/cm³, respectively. The content of organic matter before and after starvation was 80% and 58%, respectively. Through conversion of the organic content, the values of [E_m] and μ_E were 2726 J/cm³ and 32583 J/g, respectively. For abalone of different sizes, temperature was proportional to the oxygen consumption rate at water temperatures of 5°C~20°C, and the temperature was inversely proportional to the oxygen consumption rate over 20°C. Before the turning point of 20°C, the ln value of the oxygen consumption rate was linearly correlated to the reciprocal of the thermodynamic temperature. The absolute value of the slope of the linear regression equation was the Arrhenius temperature T_A value ($T_A=7196$ K) before the turning point (20°C). Through biological statistical analysis, there was a cubic function relationship between abalone shell length (L) and volume (V): $V=0.0639L^{3.1621}$ ($R^2=0.9852$). The slope was shown as the Shape coefficient δm value ($\delta m=0.43$), which was calculated by linear regression of volume of the cube root of the soft tissue and shell length. This study provides scientific data support for the construction of an individual-based model following the DEB theory for *H. discus hannai*.

Key words *Haliotis discus hannai*; Dynamic energy budget (DEB) theory; Model parameters

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190502001

http://www.yykxjz.cn/

姚高友, 谭杰, 吴羽媛, 苏晓盈, 刘付少梅, 张元, 方家熙, 陈楠生, 王春德, 刘志刚. 墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 118–126

Yao GY, Tan J, Wu YY, Su XY, Liufu SM, Zhang Y, Fang JX, Chen NS, Wang CD, Liu ZG. Genetic analysis of *Argopecten irradians concentricus*, “Bohai Red” and their hybrids. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 118–126

墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传分析*



姚高友^{1,3} 谭 杰^{1,3} 吴羽媛¹ 苏晓盈¹ 刘付少梅²
张 元^{1,3} 方家熙⁴ 陈楠生⁵ 王春德⁶ 刘志刚^{1,3①}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 湛江银浪海洋生物技术有限公司 湛江 524022;
3. 广东省南海经济无脊椎动物健康养殖工程研究中心 湛江 524088; 4. 香港理工大学应用生物及化学科技学系 香港 999077; 5. 西蒙·弗雷泽大学理学院分子生物和生物化学系 加拿大不列颠哥伦比亚省本那比市 V5A 1S6;
6. 青岛农业大学海洋与工程学院 青岛 266109)

摘要 利用 SSR (Simple Sequence Repeats) 分子标记技术, 对扇贝“渤海红”、墨西哥湾扇贝 (*Argopecten irradians concentricus*) 及其杂交子代 3 个群体共 90 个个体的遗传多样性进行分析。结果显示, 8 个 SSR 位点共扩增出 67 个等位基因, 各位点等位基因数范围为 4~14 个, 平均等位基因数为 8.5 个。扇贝“渤海红”有效等位基因数(N_e)、平均观测杂合度(H_o)和多态信息含量(PIC)最高, 分别为 2.3947、0.504 和 0.462; 3 个群体的遗传分化指数(F_{st})、基因流(N_m)和固定系数(F_{is})分别为 0.1398、1.5387 和 0.3698。对亲代与杂交子代间的遗传分化分析表明, 杂交子代与扇贝“渤海红”的遗传距离最小(0.1188), 遗传相似度最大(0.888), 杂交子代的遗传结构更偏向亲本扇贝“渤海红”。研究结果可为扇贝“渤海红”和墨西哥湾扇贝群体种质资源评估和杂交新品种的选育提供理论参考。

关键词 墨西哥湾扇贝; 扇贝“渤海红”; 杂交; 遗传多样性

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0014-09

扇贝“渤海红”为紫扇贝 (*Argopecten purpuratus*) 与海湾扇贝北部亚种 (*A. irradians irradians*) 杂交, 经 6 代选育而成, 于 2015 年通过新品种审定。与传统海湾扇贝相比, 扇贝“渤海红”生长上表现出极显著的杂种优势, 产生了巨大的社会及经济效益(丰玮等, 2012; 李建立等, 2012; 南乐红等, 2012; Wang *et al.*,

2017), 但扇贝“渤海红”高温耐受性差, 96 h 半致死温度为 29℃ (Wang *et al.*, 2017), 不利于其在全国推广养殖。墨西哥湾扇贝 (*Argopecten irradians concentricus*) 又称海湾扇贝南方亚种, 原产于美国大西洋沿岸, 其生长快、鲜肉柱率高、高温耐受性强, 稚贝在 32℃ 海水中存活率达 76%(刘志刚等, 2007a),

* 广东海洋大学 2017 年“高水平大学”省财政资金支持项目(002026003003)、2019 广东省重点领域研发计划(2019B020238002)和 2019 广东省现代农业产业技术体系创新团队(2019KJ146)共同资助 [This work was supported by Guangdong Ocean University Project of “High-level University”(002026003003) in 2017, Key Research and Development Program of Guangdong (2019B020238002), and 2019 Innovation Team of Modern Agricultural in Guangdong(2019KJ146)].

姚高友, E-mail: gaoyouyao@126.com

① 通讯作者: 刘志刚, 教授, E-mail: liuzg919@126.com

收稿日期: 2019-05-02, 收修改稿日期: 2019-07-10

1991年引进中国后在南方北部湾成功推广,成为北部湾渔业支柱产业之一(Abbott, 1974; 刘志刚等, 2007b)。但由于最初引进群体小且经过20多年小群体繁育,墨西哥湾扇贝已出现较为严重的种质退化问题(彭张明等, 2014),影响产业健康可持续发展。

杂交育种是贝类遗传改良的重要方法,能够有效提高子代生长及抗逆性状。为解决墨西哥湾扇贝种质退化问题,国内学者进行了华贵栉孔扇贝(*Chalmys nobilis*)×墨西哥湾扇贝(潘奕达, 2016; 潘奕达等, 2017)、紫扇贝×墨西哥湾扇贝(南乐红等, 2012)种间杂交与墨西哥湾扇贝×海湾扇贝等北部亚种(Zhang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011)等种内杂交。其杂交子代虽然在生长上表现出一定的杂种优势,但未能完全适应我国南方海域环境,种质退化问题仍未得到有效解决。为改善墨西哥湾扇贝种质退化和扇贝“渤海红”高温敏感性问题,课题组进行了墨西哥湾扇贝与扇贝“渤海红”的杂交育种研究,并成功获得杂交子代。杂交子代在生长上表现出明显的杂种优势,并完全适应我国南方北部湾海域环境,具有良好的推广养殖前景。

种群结构的变异大小可以评判种群抵御外界环境压力及进化的潜力,即遗传多样性较高的种群对环境恶化耐受力较强,反之,则可能出现衰退(Cronquist, 1991; 钱迎倩等, 1994)。遗传多样性评估对贝类健康养殖指导及适应性进化潜力评价具有重要意义。刘保忠(2003)和Wang等(2011)发现,我国海湾扇贝养殖群体与原引种地区海湾扇贝群体相比,等位基因数量降低了20%,遗传多样性存在瓶颈效应。谭杰等(2018)研究发现,海湾扇贝北部亚种“中科红”经过多年的定向选育,仍具有较高的遗传多样性,还具有较高的选育潜力。目前,关于扇贝“渤海红”及墨西哥湾扇贝及其杂交子代遗传多样性研究未见报道。SSR分子标记技术作为重要的DNA分子标记技术之一,在皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)(聂鸿涛等, 2013)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(张秀英等, 2012)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)(韩斐斐等, 2012; 张广明等, 2018)、栉江珧(*Atrina pectinata*)(李东明等, 2017)和马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)(赵晓霞等, 2010)等多种重要海水贝类遗传多样性分析中得到广泛应用。荧光标记毛细管电泳检测技术具有自动化、精度高、高通量等优点,已在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)(郭香等, 2018)、欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)(Wang *et al.*, 2010)等重要贝类品种中得到应用。本研究利用8对SSR引物,采用毛细管电泳技术,对扇贝“渤海红”、墨西哥湾扇贝及其杂交子代的遗传多样性进行分析,以期扇贝

“渤海红”和墨西哥湾扇贝的群体遗传评估和杂交新品种的选育提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

墨西哥湾扇贝群体为北部湾普通养殖群体,由湛江银浪生物技术有限公司提供。扇贝“渤海红”群体由青岛农业大学王春德教授提供。杂交贝为扇贝“渤海红”×墨西哥湾扇贝正反交子代(各1/2)中的橙色壳色群体。每个群体随机选取30个个体,取闭壳肌于无水乙醇中,放入-20℃保存备用。

1.2 基因组DNA提取与检测

采用全式金公司海洋生物基因组DNA提取试剂盒(Marine Animal Genomic DNA Kit)提取各群体基因组DNA。以1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.3 微卫星引物

从本课题组开发的墨西哥湾扇贝SSR引物中,挑选多态性好、等位基因数较多的8对引物用于遗传分析,引物信息见表1,荧光SSR引物由天一辉远公司合成。

1.4 PCR扩增程序及反应

PCR反应采用全式金公司Super mix试剂盒,PCR反应体系为10 μl,其中,模板0.5 μl,引物对各0.5 μl, 2×Taq PCR Master Mix 5 μl, 无菌水3 μl。PCR扩增反应程序:95℃预变性5 min, 10个循环,每个循环降低1℃(95℃变性30 s, 62℃~52℃退火30 s, 72℃延伸30 s), 25个循环(95℃变性、52℃退火、72℃延伸), 72℃延伸10 min, 4℃, 保存。扩增产物采用ABI3730XL测序仪进行片段长度分析。

1.5 数据分析

利用POPGENE 1.32软件计算群体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、遗传相似系数及遗传距离等。使用PIC-CALC软件计算多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点的多态性

8个简单重复序列标记(Simple Sequence Repeats, SSR)位点均能在扇贝“渤海红”、墨西哥湾扇贝及其杂交子代中有效扩增。表2为8个位点的遗传多样性信息。8个微卫星位点共得到68个等位基因,其中,

位点 M1 的等位基因最多(12 个), 位点 M7 等位基因最少(4 个), 各微卫星位点的期望杂合度(H_e)范围为 0.2973~0.6265, 观测杂合度(H_o)范围为 0.1556~0.5385, 平均期望杂合度为 0.5491, 平均观测杂合度

为 0.2960, 多态信息含量(PIC)介于 0.2657~0.6255 之间, 平均多态信息含量为 0.49836, 说明位点具有较高的遗传多样性, 其中, 高度多态位点 5 个(PIC>0.5), 中度多态位点 3 个(0.25<PIC<0.5)。

表 1 8 个多态 SSRs 引物信息
Tab.1 Primer information for eight pairs of polymorphic SSRs

编号 Number	引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	重复类型(次数) Repeat type (frequency)	产物大小 Size of product (bp)
1	M1-F	CAACATTCACACACTACCGTATGA	TA ₍₆₎	125~156
	M1-R	ACCAAAAATGATTGAACGTAACACT		
2	M4-F	TCAAACCTGCCAATTCATAGAACA	AT ₍₆₎	133~137
	M4-R	TGATTTATTCGTGGTAATTTGGAA		
3	M5-R	CATATTGTAGGGGCGTGGTTTTTC	AT ₍₇₎	119~156
	M5-F	CAATAGCAGTAACGGCGAACAAA		
4	M6-F	GACATTTTCCTGTCGATAAGAGCC	TC ₍₆₎	102~126
	M6-R	ATATAGGGGTTGGTGAATGCATTG		
5	M7-F	TGTTAAAGTTGTTCTCTGGCATGT	AT ₍₆₎	119~121
	M7-R	GCTGCAAAATTTTGTCACTACTG		
6	M8-F	GCTTGTAATGATTTGGAGTGT	AT ₍₇₎	158~167
	M8-R	TGGCACTTCATCTCAGTTAATATGT		
7	M100-F	GCGAGATTCAATACGCATGTGTA	TA ₍₇₎	99~110
	M100-R	GTGCTGAAATTGATGCATGCATG		
8	M115-F	GTTCCCAGATGACTAGTGAAGCA	TA ₍₇₎	101~125
	M115-R	TGCAAAAATGGATGTCTATTGAAGTG		

表 2 3 个群体在 8 个微卫星位点上的遗传多样性信息
Tab.2 The polymorphism information of eight microsatellite loci in three populations

位点 Locus	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	多态信息含量 PIC
M1	12	2.652	0.626	0.538	0.596
M4	7	2.199	0.548	0.195	0.508
M5	7	2.523	0.607	0.489	0.539
M6	6	2.161	0.540	0.250	0.488
M7	4	1.419	0.297	0.239	0.265
M8	10	3.001	0.670	0.155	0.625
M100	8	2.130	0.533	0.271	0.446
M115	14	2.304	0.569	0.228	0.514
均值 Mean	8.500	2.299	0.549	0.296	0.498

2.2 等位基因频率

8 个位点在 3 个群体中扩增的等位基因片段大小范围为 91~205 bp(表 3), 3 个群体均存在稀有等位基因(0<基因频率<0.050), 墨西哥湾扇贝、扇贝“渤海红”及杂交子代分别存在 15、29 和 13 个稀有等位基因。各个微卫星位点在 3 个群体的等位基因频率分布不均, 群体间存在一定的遗传差异。

2.3 遗传距离

墨西哥湾扇贝、扇贝“渤海红”及杂交子代的遗传距离及遗传相似度见表 4。结果显示, 3 个群体间

均具有较高的遗传相似度, 其中, 扇贝“渤海红”与杂交子代的遗传相似度(0.888)高于墨西哥湾扇贝与杂交子代(0.736), 墨西哥湾扇贝与扇贝“渤海红”遗传相似度最小(0.714)。杂交子代与墨西哥湾扇贝的遗传距离(0.279)高于扇贝“渤海红”与杂交子代的遗传距离(0.118)。杂交子代的遗传结构更倾向亲本扇贝“渤海红”。

2.4 3 个群体遗传多样性分析

杂交子代、墨西哥湾扇贝、扇贝“渤海红”的平均多态信息含量分别 0.358、0.4376、0.462(表 5~表 7), 说明 3 个群体都具有中等遗传多样性(0.25<P<0.5)。其中,

扇贝“渤海红”平均期望杂合度、平均观测杂合度和平均有效等位基因最高,分别为 0.2971、0.5045 和 2.394。杂交子代平均期望杂合度、平均观测杂合度、平均有效等位基因最低,分别为 0.2458、0.4230 和 1.8316。

2.5 群体间遗传分化

群体间的基因流(N_m)和遗传分化指数(F_{st})是反应群体遗传分化的重要指标(表 8)。当 $0 < F_{st} < 0.05$ 时,说明群体的遗传分化程度很弱;当 $0.05 < F_{st} < 0.15$ 时,

群体处于中等程度的遗传分化;当 $0.15 < F_{st} < 0.25$ 时,群体有较大的遗传分化;当 $F_{st} > 0.25$ 时,群体的遗传分化极大(Wright, 1951)。在本研究中,3 个群体 8 个微卫星位点 F_{st} 值介于 0.0825~0.2755,平均值为 0.1398,表明 13.98%的遗传变异由群体分化而导致,86.02%的遗传变异来源于群体内部,说明群体中存在较低水平的随机交配,3 个群体平均基因流(N_m)为 1.5387,平均固定系数(F_{is})为 0.3698。3 个群体间出现中等程度的遗传分化。

表 3 3 个群体 8 个微卫星位点上的等位基因频率
Tab.3 Allele frequency of three populations in eight microsatellite loci

位点 Locus	等位基因 大小 Allele size (bp)	墨西哥 湾扇贝 <i>A. irradian sconcentricus</i>	扇贝 “渤海红” “Bohai Red”	墨西哥湾扇贝 ×扇贝“渤海 红”杂交子代 Hybrid	位点 Locus	等位基因 大小 Allele size (bp)	墨西哥 湾扇贝 <i>A. irradian sconcentricus</i>	扇贝 “渤海红” “Bohai Red”	墨西哥湾扇贝 ×扇贝“渤海 红”杂交子代 Hybrid	
M1	145	0.241	0.016	0.166	M8	153	0.032	0.379	—	
	147	0.032	0.016	0.133		158	0.854	0.137	0.266	
	151	0.016	0.033	—		160	0.080	0.120	0.550	
	152	—	0.050	—		162	—	0.035	0.033	
	154	—	0.050	0.016		163	—	0.155	0.033	
	156	0.677	0.383	0.683		167	0.032	0.155	—	
	158	0.032	0.050	—		197	—	0.017	0.066	
	160	—	0.300	—		201	—	—	0.033	
	162	—	0.033	—		205	—	—	0.016	
	161	—	0.016	—		M110	98	—	0.016	—
	164	—	0.033	—			101	0.265	0.383	0.383
	152	—	0.016	—			103	0.687	0.516	0.566
	M4	135	0.500	—			0.016	106	—	0.016
136		0.046	0.116	—	109	—	—	0.0333		
137		0.015	0.033	0.016	110	0.015	0.066	0.016		
139		0.375	0.666	0.90	96	0.015	—	—		
140		—	0.033	—	99	0.015	—	—		
142		0.062	0.133	0.066	M115	91	—	0.033	—	
146	—	0.016	—	92		—	0.016	—		
M5	152	0.062	0.016	0.016		99	—	0.050	—	
	154	0.093	0.233	0.616		102	0.046	—	—	
	156	0.578	0.666	0.366		108	—	0.033	—	
	158	—	0.033	—		113	—	0.033	—	
	160	—	0.016	—		115	0.203	0.783	0.850	
162	—	0.016	—	119		—	—	0.016		
180	0.265	0.016	—	120	0.015	—	—			
M6	152	0.062	0.016	0.033	123	—	—	—		
	154	0.046	0.150	0.466	126	0.046	—	—		
	156	0.609	0.800	0.500	128	0.609	0.017	0.133		
	158	—	0.016	—	121	0.078	—	—		
	160	0.281	0.016	—	130	—	0.016	—		
M7	116	0.031	0.050	—	131	—	0.016	—		
	118	—	—	—						
	120	0.687	0.933	0.866						
	122	0.281	0.016	0.133						

表4 墨西哥湾扇贝、扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传距离(对角线下方)和遗传相似系数(对角线上方)
Tab.4 Genetic similarity coefficient (above the diagonal) and distance (below the diagonal) of three populations

群体 Populations	墨西哥湾扇贝 <i>A. irradians concentricus</i>	扇贝“渤海红” “Bohai Red”	墨西哥湾扇贝×扇贝 “渤海红”杂交子代 Hybrid
墨西哥湾扇贝 <i>A. irradians concentricus</i>	***	0.715	0.756
扇贝“渤海红”“Bohai Red”	0.336	***	0.888
杂交子代 Hybrid	0.279	0.119	***

表5 杂交子代在8个微卫星位点的遗传多样性参数
Tab.5 Genetic diversity index of hybrid (*A. irradians concentricus*×“Bohai Red”) in eight microsatellite loci

参数 Parameters	位点 Locus								均值 Mean
	M1	M4	M5	M6	M7	M8	M110	M115	
N_a	4.000	4.000	3.000	3.000	2.000	7.000	4.000	3.000	3.750
N_e	1.950	1.227	1.941	2.132	1.300	2.620	2.130	1.350	1.831
H_e	0.600	0.066	0.233	0.066	0.266	0.133	0.400	0.200	0.245
H_o	0.495	0.188	0.493	0.540	0.235	0.628	0.539	0.263	0.423
PIC	0.443	0.176	0.382	0.421	0.204	0.569	0.434	0.233	0.358

表6 墨西哥湾扇贝在8个微卫星位点的遗传多样性参数
Tab.6 Genetic diversity index of *A. irradians concentricus* in eight microsatellite loci

参数 Parameters	位点 Locus								均值 Mean
	M1	M4	M5	M6	M7	M8	M110	M115	
N_a	5.000	5.00	4.000	4.000	3.000	4.000	5.000	6.000	4.500
N_e	1.923	2.511	2.395	2.190	1.809	1.352	1.838	2.362	2.048
H_e	0.645	0.250	0.625	0.343	0.375	0.032	0.125	0.343	0.342
H_o	0.488	0.612	0.591	0.552	0.454	0.264	0.463	0.585	0.501
PIC	0.424	0.527	0.52	0.479	0.371	0.248	0.388	0.53	0.437

表7 扇贝“渤海红”在8个微卫星位点的遗传多样性参数
Tab.7 Genetic diversity index of “Bohai Red” in eight microsatellite loci

参数 Parameters	位点 Locus								均值 Mean
	M1	M4	M5	M6	M7	M8	M110	M115	
N_a	12.00	6.000	7.000	5.000	3.000	7.000	5.000	9.000	6.750
N_e	4.017	2.090	1.995	1.507	1.144	4.403	2.387	1.611	2.394
H_e	0.366	0.266	0.600	0.333	0.066	0.310	0.300	0.133	0.297
H_o	0.763	0.530	0.507	0.342	0.128	0.786	0.591	0.385	0.504
PIC	0.718	0.490	0.448	0.306	0.1213	0.743	0.498	0.370	0.462

表8 3个群体8个微卫星位点 F 统计量及基因流值
Tab.8 F -statistics and gene flow value of eight microsatellite loci in three populations

位点 Locus	遗传分化指数 F_{st}	基因流 N_m	固定系数 F_{is}
M1	0.0825	2.7818	0.0621
M4	0.1918	1.0533	0.5546
M5	0.1333	1.6254	0.0690
M6	0.1219	1.8001	0.4730
M7	0.0798	2.8810	0.1195
M8	0.1797	1.1414	0.7119
M110	0.0174	14.0963	0.4738
M115	0.2755	0.6576	0.4430
均值 Mean	0.1398	1.5387	0.3698

3 讨论

3.1 亲本群体遗传多样性

遗传多样性可用于评估一个种群抵御外界环境压力的能力及进化的潜力。在水产动物育种中,遗传多样性指数常作为一个养殖品种是否需要遗传改良的基础指标之一。本研究中,墨西哥湾扇贝遗传多样性参数(PIC=0.358)明显低于扇贝“渤海红”(PIC=0.462)。研究表明,亲本数量的减少会引起一些低频率位点的丢失(万俊芬等,2004a)。在贝类人工养殖过程中的近亲繁殖、遗传漂变及瓶颈效应使得养殖群体基因库中某些等位基因丢失,造成养殖群体遗传多样性和遗传变异度降低(吕林兰等,2008)。墨西哥湾扇贝养殖群体最初引种基础群体小(222个),且经过20多代的累代养殖(张福绥等,1994),遗传多样性出现明显下降。作为新兴的养殖品种扇贝“渤海红”群体,其遗传多样性参数接近高度遗传多样性(PIC>0.5),说明扇贝“渤海红”仍具有较大的选育潜力。

3.2 杂种优势与亲本遗传距离

杂种优势是指杂交子代在生长、存活等方面均优于双亲的现象(张国范等,2004)。一般认为,杂种优势的强弱与亲本自身的遗传差异有关,即在一定的范围内,亲本间的遗传差异越大,其杂交子代往往具有更高的杂种优势(魏继海等,2016;谢晓东等,2003)。而亲本间的遗传差异大小可以用遗传距离来衡量(张佳佳等,2018)。本研究中,墨西哥湾扇贝与扇贝“渤海红”的遗传相似度为0.7146,遗传距离为0.3361。根据Thorpe(1982)提出的同种群遗传相似性系数应介于0.80~0.97,而遗传距离应介于0.03~0.20的观点,本研究结果中,亲本群体这2个参数均不在同种群范围内,说明2个群体间存在明显的遗传差异。理论上,二者杂交能够产生杂种优势明显的杂交子代。研究表明,墨西哥湾扇贝×扇贝“渤海红”的杂交子代生长速度与亲本墨西哥湾扇贝相比,提高了20%,具有明显的生长优势,其结果也验证了本研究的推论(谭杰,2018)。但贝类遗传育种的实践及理论证明了杂种优势利用的关键不仅在于亲本间的遗传差异,还需要亲本间具有较高的配合力(张国范等,2004)。这在海湾扇贝自交家系与杂交家系(郑怀平等,2004)及太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)近交系间杂交(Hedgecock *et al.*, 1995)的杂种优势比较中均证明了这一点。因此,在扇贝“渤海红”与墨西哥湾扇贝2个亲本群体中选择更高配合力亲本个体可能会加强杂交子代杂种优势的利用。

3.3 杂交子代遗传偏向性与遗传变异

在贝类杂交育种中,杂交子代在遗传结构偏向亲本一方的现象已经有较多报道,如合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)×珠母贝(*Pinctada margaritifera*)的杂交子代在核型和同工酶上均与合浦珠母贝一致(姜卫国等,1983;李刚等,1983);栉孔扇贝×虾夷扇贝的杂交F₁代均偏向各自的母本(何斌等,2007);栉孔扇贝×华贵栉孔扇贝的杂交F₁代在遗传上也同样更加偏向母本栉孔扇贝(万俊芬等,2004b)。本研究中,杂交子代与亲本扇贝“渤海红”的遗传距离为0.1188,与亲本墨西哥湾扇贝的遗传距离为0.279,杂交贝在遗传结构上更偏向于亲本扇贝“渤海红”。研究表明,杂交子代偏向某一方亲本,与杂交过程中染色体重组、突变和异染色质附近区域的SSR标记的偏分离聚集(张玉山等,2008),以及在胚胎发育过程中染色体的选择性丢失等相关(Estoup *et al.*, 2002; Fujiwara *et al.*, 1997)。但也有学者认为,亲本遗传物质对后代贡献率不一致是因为两亲本基因纯合度不同,基因纯度高亲本基因型在后代中被检测几率增加(蔡磊等,2012)。亲本基因纯合度及遗传物质的重组、变异等原因可能造成杂交子代在遗传结构上更加偏向于亲本扇贝“渤海红”。

杂交能够提高杂交子代的遗传多样性,如日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)太湖群体和鄱阳湖群体杂交后,其杂交子代的观测杂合度有明显的提高(李瀚声等,2011);马氏珠母贝近交家系遗传多样性显著低于杂交家系(张嘉丽等,2015)。但本研究中,杂交子代的遗传参数(N_e 、 H_e 、 H_o 和PIC)均低于亲本墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”。同样的现象也出现在紫扇贝×海湾扇贝的杂交实验中(孙妍等,2013)。这可能与杂交实验中使用的亲本数量较少(5个)有关。研究表明,当亲本数量低于有效亲本数量时,会导致子代种群遗传变异力下降(Su *et al.*, 1996);张海滨等(2005)等也发现,海湾扇贝过低的亲本数量能够显著影响子代的生长及存活。贝类配子具有多产性,贝类杂交育种常采用少数亲本杂交的方式,这种杂交方式可能导致子代中亲本部分等位基因丢失而影响子代的遗传变异程度,不利于后续杂交子代继代选育。此外,本研究中杂交子代群体选用了橙色群体,这也可能造成杂交子代遗传多样性低于双亲。

参 考 文 献

Abbott RT. American seashells (2nd ed). New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1974

- Cai L, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Genetic analysis of northern largemouth bass, Florida largemouth bass, and their reciprocal hybrids. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 70–76 [蔡磊, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种及其杂交子代的遗传分析. *中国水产科学*, 2012, 19(1): 70–76]
- Cronquist A The evolution process: A critical study of evolutionary theory (2nd ed). New York: Columbia University Press, 1991
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 2002, 11(9): 1591–1604
- Feng W, Li JL, Cai DQ, *et al.* Comparison of development and growth of the F₁ and F₂ hybrids between the Peruvian and Bay scallop. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(20): 118–124 [丰玮, 李建立, 蔡德泉, 等. 紫扇贝与海湾扇贝杂交后代生长发育的比较研究. *中国农学通报*, 2012, 28(20): 118–124]
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, *et al.* Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma*, 1997, 106(1): 44–52
- Guo X, Zeng ZN, Zheng YY, *et al.* Genetic diversity in selected lines of *Crassostrea angulata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 1131–1136 [郭香, 曾志南, 郑雅友, 等. 福建牡蛎选育群体的遗传多样性. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 1131–1136]
- Hang FF, Zhang JB, Li L, *et al.* Genetic diversity in two-generation of cultured Japanese scallop (*Patinopecten (Mizuhopecten) yessoensis*) populations. *Marine Sciences*, 2012, 36(9): 1–8 [韩斐斐, 张继彪, 李莉, 等. 虾夷扇贝养殖群体及其子代的遗传多样性分析. *海洋科学*, 2012, 36(9): 1–8]
- He B, Yang AG, Wang YQ, *et al.* Segregation of ISSR markers in hybrid larvae of scallop *Chlamys farreri*×*Patinopecten yessoensis*. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(6): 32–38 [何斌, 杨爱国, 王清印, 等. 栉孔扇贝×虾夷扇贝单对杂交子一代幼虫 ISSR 标记的分离方式. *海洋水产研究*, 2007, 28(6): 32–38]
- Hedgecock D, McGoldrick DJ, Bayne BL. Hybrid vigor in Pacific oysters: An experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture*, 1995, 137(1): 285–298
- Jiang WG, Wei Y, Li G. Studies on the cultivated interspecific hybridizations between pairs of *Pinctada martensi*, *P. chemnitzii* and *P. maxima* (Mollusca, Bivalvia) II. Observation on the chromosomes of fertilization and hybrids. *Tropic Oceanology*, 1983, 2(4): 316–320 [姜卫国, 魏贻尧, 李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究——II. 受精过程和杂交后代的染色体观察. *热带海洋*, 1983, 2(4): 316–320]
- Li DM, Yang AG, Wu B, *et al.* Development and application of the EST-SSR markers in *Atrina pectinata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 137–142 [李东明, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉江珧(*Atrina pectinata*)EST-SSR 标记的开发与应用. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 137–142]
- Li G, Jiang WG, Wei YY. Studies on the cultivated interspecific hybridizations between pairs of *Pinctada martensi*, *P. chemnitzii* and *P. maxima* (Mollusca, Bivalvia) III. Comparative study on zymograms. *Tropic Oceanology*, 1983(4): 321–328 [李刚, 姜卫国, 魏贻尧. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究——III. 同工酶谱的比较研究. *热带海洋*, 1983(4): 321–328]
- Li HS, Feng JB, Xie N, *et al.* Genetic structure analysis of parents and F₁ generation groups of *Macrobrachium nipponense* from Taihu Lake and Poyang Lake. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(3): 321–327 [李瀚声, 冯建彬, 谢楠, 等. 日本沼虾太湖和鄱阳湖群体及其 F₁ 的遗传结构分析. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 321–327]
- Li JL, Wang CD, Li ZX, *et al.* Growth and path analyses of hybrid families between the Peruvian and Bay scallop. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 15–20 [李建立, 王春德, 李朝霞, 等. 紫扇贝和海湾扇贝杂交家系的生长和通径分析. *海洋科学*, 2012, 36(8): 15–20]
- Liu BZ. Study on the population genetics of Bay scallop *Argopecten irradians* and the molecular phylogeny of Pectinidae. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2003 [刘保忠. 海湾扇贝群体遗传学和扇贝科分子系统演化的研究. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2003]
- Liu ZG, Wang H, Fu SW. Morphological growth of cultured *Argopecten irradians concentricus* Say in Beibu Bay in Zhanjiang. *Journal of Fisheries of China*, 2007a, 31(5): 675–681 [刘志刚, 王辉, 符世伟. 湛江北部湾养殖墨西哥湾扇贝的形态增长规律. *水产学报*, 2007a, 31(5): 675–681]
- Liu ZG, Wang H, Li ZM, *et al.* Upper incipient lethal temperature of *Argopecten irradians concentricus* Say. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007b, 14(5): 778–785 [刘志刚, 王辉, 栗志民, 等. 墨西哥湾扇贝高起始致死温度的研究. *中国水产科学*, 2007b, 14(5): 778–785]
- Lü LL, Du XD, Wang Y, *et al.* Genetic diversity of three populations and the first generations of hybridization between different populations of pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(1): 26–32 [吕林兰, 杜晓东, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代遗传多样性的 ISSR 分析. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 26–32]
- Nan YH, Zhang JS, Feng W, *et al.* Inter-specific hybridization between *Argopecten purpuratus* and *Argopecten irradians concentricus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(20): 131–135 [南乐红, 张金盛, 丰玮, 等. 紫扇贝和墨西哥湾扇贝种间杂交的初步研究. *中国农学通报*, 2012, 28(20): 131–135]
- Nie HT, Li Q, Kong LF. Development of four multiplex PCR panels of microsatellites and application to kinship analysis in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(2): 207–215 [聂鸿涛, 李琪, 孔令锋. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用. *水产学报*, 2013, 37(2): 207–215]
- Pan YD, Feng J, Liu H, *et al.* Reciprocal crosses between *Argopecten irradians concentricus* and *Chlamys nobilis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 698–709 [潘奕达, 封杰, 刘行, 等. 墨西哥湾扇贝与华贵栉孔扇贝的远缘杂交. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 698–709]
- Pan YD. A preliminary study on the inter-genus hybridization

- between *Argopecten irradians concentricus* Say and *Chlamys hobillii*. Master's Thesis of Guangxi University, 2016 [潘奕达. 墨西哥湾扇贝与华贵栉孔扇贝属间远缘杂交的初步研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Peng ZM, LiuFu SM, Liu ZG. Research progress of artificial culture and genetic breeding of *Argopecten irradians concentricus* Say. Journal of Guangdong Ocean University, 2014, 34(1): 91–97 [彭张明, 刘付少梅, 刘志刚. 墨西哥湾扇贝人工养殖及遗传育种研究进展. 广东海洋大学学报, 2014, 34(1): 91–97]
- Qian YQ, Ma KP. Principles and methods of biodiversity research. Beijing: China Science and Technology Press, 1994 [钱迎倩, 马克平. 生物多样性的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社, 1994]
- Su GS, Liljedahl LE, Gall G. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1996, 142(3–4): 139–148
- Sun Y, Huang XT, Hu LP, et al. AFLP analysis of genetic structure of *Argopecten purpuratus*, *Argopecten irradians* and their positive and negative hybrid offspring. Marine Sciences, 2013, 37(8): 1–5 [孙妍, 黄晓婷, 胡丽萍, 等. 紫扇贝、海湾扇贝及其正反杂交子代群体遗传结构的 AFLP 分析. 海洋科学, 2013, 37(8): 1–5]
- Tan J, Peng XJ, Liu ZG, et al. SSR analysis of genetic diversity of *Argopecten irradians concentricus* and Zhongkehong *Argopecten irradians*. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(4): 1397–1405 [谭杰, 彭晓君, 刘志刚, 等. 墨西哥湾扇贝与“中科红”海湾扇贝群体遗传多样性 SSR 分析. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1397–1405]
- Tan J. Transcriptome analysis of *Argopecten irradians concentricus* and study on the molecular markers of its progeny crossed with *Argopecten 'Bohaihong'*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2018 [谭杰. 墨西哥湾扇贝转录组分析及其与扇贝“渤海红”杂交 F₁ 代分子标记研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Thorpe JP. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 1982, 13: 139–168
- Wan JF, Bao ZM, Liu GX, et al. Segregation of ISSR markers in hybrid larvae of two scallop species. Chinese High Technology Letters, 2004b, 14(5): 82–87 [万俊芬, 包振民, 刘广旭, 等. 扇贝种间单对杂交一代幼虫 ISSR 标记的分离方式. 高技术通讯, 2004b, 14(5): 82–87]
- Wan JF, Bao ZM, Wang XL, et al. The influence of parental stock size on the genetic structure of *Haliotis discus*. Journal of Fisheries of China, 2004a, 28(2): 127–132 [万俊芬, 包振民, 汪小龙, 等. 亲本数目对鲍养殖群体 AFLP 标记位点及其遗传结构的影响. 水产学报, 2004a, 28(2): 127–132]
- Wang C, Liu B, Li J, et al. Introduction of the Peruvian scallop and its hybridization with the Bay scallop in China. Aquaculture, 2011, 310(3–4): 380–387
- Wang C, Liu B, Liu X, et al. Selection of a new scallop strain, the Bohai Red, from the hybrid between the Bay scallop and the Peruvian scallop. Aquaculture, 2017, 479: 250–255
- Wang Y, Wang X, Wang A, et al. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). Aquaculture, 2010, 308(1): S28–S33
- Wei JH, Zhao JL, Wu JW, et al. Genetic characterization of *Oreochromis niloticus* (♀) × *Sarotherodon melanotheron* (♂) hybrid F₂ and F₃ by microsatellite analysis. South China Fisheries Science, 2016, 12(1): 30–35 [魏继海, 赵金良, 吴俊伟, 等. 尼罗罗非鱼(♀)×萨罗罗非鱼(♂)杂交 F₂ 与 F₃ 群体遗传特征的微卫星分析. 南方水产科学, 2016, 12(1): 30–35]
- Wright S. Genetical structure of populations. Annals of Eugenics, 1951, 15(1): 323–354
- Xie XD, Ni ZF, Meng FR, et al. Relationship between differences of gene expression in early developing seeds of hybrid versus parents and heterosis in wheat. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(3): 260–266 [谢晓东, 倪中福, 孟凡荣, 等. 小麦杂交种与亲本发育早期种子的基因表达差异及其与杂种优势关系的初步研究. 遗传学报, 2003, 30(3): 260–266]
- Zhang FS, He YZ, Qi LX, et al. Introduction and spat-rearing of the F₁ generation of *Argopecten irradians concentricus* Say. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1994, 25(4): 372–377 [张福绥, 何义朝, 亓铃欣, 等. 墨西哥湾扇贝的引种和子一代苗种培育. 海洋与湖沼, 1994, 25(4): 372–377]
- Zhang GF, Liu X, Que YH, et al. The theory and application of hybridization and heterosis in marine mollusks. Marine Sciences, 2004, 28(7): 54–60 [张国范, 刘晓, 阙华勇, 等. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展. 海洋科学, 2004, 28(7): 54–60]
- Zhang GM, Sun XJ, Wu B, et al. Transferability of EST-SSR from *Patinopekten yessoensis* into *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 139–146 [张广明, 孙秀俊, 吴彪, 等. 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 139–146]
- Zhang H, Liu X, Zhang G, et al. Growth and survival of reciprocal crosses between two Bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 2007, 272(S1): S88–S93
- Zhang HB, Liu X, Zhang GF, et al. Effects of effective population size on the F₁ growth and survival of Bay scallop *Argopecten irradians*. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(2): 177–180 [张海滨, 刘晓, 张国范, 等. 不同有效繁殖群体数对海湾扇贝 F₁ 生长和存活的影响. 海洋学报, 2005, 27(2): 177–180]
- Zhang JJ, Li J, Zhang GS, et al. Microsatellite-based analysis of genetic diversity of parent and hybrid of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (♀) × *P. vachelli* (♂). Fisheries Science, 2018, 37(5): 612–621 [张佳佳, 李杰, 张国松, 等. 杂交黄颡鱼(黄颡鱼♀×瓦氏黄颡鱼♂)及其双亲遗传多样性的微卫星分析. 水产科学, 2018, 37(5): 612–621]
- Zhang JL, Luo YQ, Huang Y, et al. Genetic structure of inbred and hybrid families of pearl oyster *Pinctada martensii*. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(4): 723–730 [张嘉丽, 罗燕秋, 黄怡, 等. 马氏珠母贝近交与杂交家系的遗传结构比较. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(4): 723–730]
- Zhang XY, Zhang XJ, Zhao C, et al. The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and analysis on population genetic diversity in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 815–824

- [张秀英, 张晓军, 赵翠, 等. 栉孔扇贝 BES-SSR 的开发及遗传多样性分析. 水产学报, 2012, 36(6): 815–824]
- Zhang YS, Chen QQ, Wu W, *et al.* Integration of centromeric regions on the rice molecular linkage map of SSR markers. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(2): 167–171 [张玉山, 陈庆全, 吴薇, 等. 水稻 SSR 标记遗传连锁图谱着丝粒的整合及其偏分离分析. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 167–171]
- Zhao XX, Deng YW, Du XD, *et al.* Genetic structure of four progeny stocks of *Pinctada martensii* by microsatellite markers analysis. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29(5): 879–884 [赵晓霞, 邓岳文, 杜晓东, 等. 利用微卫星标记分析马氏珠母贝 4 个养殖群体遗传结构. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 879–884]
- Zheng H, Xu F, Zhang G. Crosses between two subspecies of Bay scallop *Argopecten irradians* and heterosis for yield traits at harvest. *Aquaculture Research*, 2011, 42(4): 602–612
- Zheng HP, Zhang GF, Liu X, *et al.* Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(3): 267–272 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较. 水产学报, 2004, 28(3): 267–272]

(编辑 马璀艳)

Genetic Analysis of *Argopecten irradians concentricus*, “Bohai Red” and Their Hybrids

YAO Gaoyou^{1,3}, TAN Jie^{1,3}, WU Yuyuan¹, SU Xiaoying¹, LIUFU Shaomei², ZHANG Yuan^{1,3},
FANG Jiayi⁴, CHEN Nansheng⁵, WANG Chunde⁶, LIU Zhigang^{1,3①}

(1. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Zhanjiang Silverwave Marine Biotechnology Co.Ltd., Zhanjiang 524022; 3. Guangdong Province Nanhai Economic Invertebrates Healthy Breeding Engineering Research Center, Zhanjiang 524088; 4. Department of Applied Biology and Chemical Technology of Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong 999077; 5. Department of Molecular Biology and Biochemistry of Simon Fraser University, British Columbia V5A 1S6; 6. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract Hybridization between the ‘Bohai Red’ and *Argopecten irradians concentricus* was conducted. The hybrids exhibited heterosis in terms of survival rate, growth rate, and heat tolerance, demonstrating substantial potential to replace *A. irradians concentricus*. To ensure the efficient use of these hybrids, we need to understand the genetic structure of the hybrids and their parents. Microsatellites are widely used to assess the genetic diversity of aquaculture species and to construct a quantitative trait locus due to their characteristics such as abundant polymorphism, rich information, and high codominance and conservation. In this research, the genetic diversity of 90 individuals in 3 populations of *A. irradians concentricus*, ‘Bohai Red’, and their hybrids was analyzed using 8 pairs of microsatellite primers. A total of 67 alleles were amplified, and 4~14 alleles at each locus were generated, with a mean allele number of 8.5. Effective allele number, expected heterozygosity, and polymorphic content were the highest in ‘Bohai Red’ (2.3947, 0.504, and 0.462, respectively). The genetic differentiation index, gene flow, and fixed coefficient were 0.1398, 1.5387, and 0.3698, respectively. Between the hybrids and ‘Bohai Red’, the genetic distance was the smallest (0.1188) and the genetic similarity was the highest (0.888), suggesting their similar genetic structures. These findings provide a reference for the genetic analyses of ‘Bohai Red’ and *A. irradians concentricus* as well as for the breeding of new varieties.

Key words *Argopecten irradians concentricus*; “Bohai Red”; Hybridization; Genetic diversity

① Corresponding author: LIU Zhigang, E-mail: liuzg919@126.com

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20190422001

http://www.yykxjz.cn/

薛素燕, 李加琦, 李阳, 丁敬坤, 徐涵, 张雯雯, 毛玉泽, 方建光. 短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢及能量收支的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 127–133

Xue SY, Li JQ, Li Y, Ding JK, Xu H, Zhang WW, Mao YZ, Fang JG. Effects of short-term acidification on feeding, respiratory metabolism, and energy budget of *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 127–133

短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢 及能量收支的影响*



薛素燕^{1,2} 李加琦^{1,2} 李 阳¹ 丁敬坤¹
徐 涵¹ 张雯雯¹ 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)

摘要 采用实验生态学方法,研究了魁蚶(*Scapharca broughtonii*)摄食、呼吸代谢及能量收支对短期酸化(pH 分别为 8.2、7.9、7.6)的响应。结果显示,魁蚶的摄食率(IR)和排粪率(FER)均受 pH 影响显著($P<0.05$),都随 pH 的降低而减少;魁蚶的耗氧率(OR)受 pH 影响显著($P<0.05$),随 pH 降低呈明显的下降趋势,表明低 pH 在一定程度上抑制魁蚶的呼吸;排氨率(NR)受 pH 影响不显著,随 pH 的降低呈先下降再上升的趋势;O:N 值随 pH 的降低而减小。不同 pH 条件下的能量收支结果显示,魁蚶的摄食能、呼吸能、排粪能和生长余力(SFG)均随 pH 的降低而减少。通过建立能量收支方程发现, pH 显著影响魁蚶的能量分配($P<0.05$),随 pH 的降低,魁蚶的呼吸能和排泄能占摄食能的比例增加,而排粪能和生长能占比减少,说明低 pH 条件下,魁蚶会做出适当生理调整降低 IR,增加代谢率,导致能量减少,继而造成 SFG 减少。研究表明,短期酸化条件下,魁蚶的摄食和新陈代谢显著降低,可能是细胞能量需求的增加和氮损失的协同作用。

关键词 魁蚶; pH; 摄食; 呼吸代谢; 能量收支

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0015-07

海洋酸化会引发海洋生态系统内的一系列变化(唐启升等, 2013), 已对贝类的受精、钙化、生长和繁殖产生负面作用(Parker *et al*, 2009; Talmage *et al*,

2011)。双壳贝类是最容易因 pH 的降低而受到影响的海洋动物之一, 海洋酸化将对它们产生严重威胁(Kurihara *et al*, 2009), 可能导致代谢能力、能量存储

* 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)、国家基金委-山东省联合基金(U1606404)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZD0105)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017002)共同资助 [This work was supported by Creative Team Project of the Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao) (LMEES-CTSP-2018-4), National Natural Science Foundation of China (NSFC)-Shandong Joint Fund for Marine Ecology and Environment Science (U1606404), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD0105), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017002)]. 薛素燕, E-mail: xuesy@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2019-04-22, 收修改稿日期: 2019-06-25

及生长速度降低(Zhang *et al.*, 2012; Beniash *et al.*, 2010)。目前,海洋酸化对一些经济贝类的生理作用过程尚不清楚。研究海洋酸化对经济贝类生理过程的影响对我国的水产养殖具有重要意义。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是一种大型海洋底栖贝类,在我国辽东半岛、山东半岛等沿海资源量丰富,是我国具有重要经济价值的浅海增养殖贝类。由于生境破坏、过度捕捞、疾病暴发和近亲繁殖等因素,导致其种群数量急剧减少(Mao *et al.*, 2013)。近年来,国内许多学者开展了魁蚶的人工增养殖和资源修复等方面的研究(阮飞腾等, 2014; 李阳等, 2018; 薛素燕等, 2019),但有关酸化对其摄食生理及能量收支的影响等尚未见报道。本研究测定了不同 pH 条件下,魁蚶的摄食率[Ingestion rate, IR, mg/(g·h)]、排粪率[Faecal egestion rate, FER, mg/(g·h)]、耗氧率(Oxygen consumption rate,

OR, %)、排氨率(Ammonia excretion rate, NR, %)及能量收支参数,探讨了低 pH 对魁蚶的摄食、代谢及能量收支的影响,旨在为在日益酸化的海水环境中进行贝类养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用 2 龄魁蚶取自本课题组在山东青岛市崂山湾增养殖实验的贝类群体,清洁贝壳表面污物和附着生物,选择壳长为(4.31±0.23) cm 的个体若干,置于整理箱中暂养。暂养水温为(16.8±1.3)°C,每天全量换水 1 次,连续充气,并投喂螺旋藻(*Spirulina* spp.)液 2 次。实验所用海水经砂滤沉淀后储存备用,海水 pH 为 8.21±0.06,盐度为 33.12±0.36,暂养 14 d。实验用魁蚶生物学数据见表 1。

表 1 魁蚶生物学数据(平均值±标准差)
Tab.1 Biological characteristics of *S. broughtonii* (Mean±SD, n=36)

壳长 Shell length (mm)	壳高 Shell height (mm)	湿体重 Wet body weight (g)	软组织干重 Soft tissue dry weight (g)	壳干重 Shell dry weight (g)	肥满度 Condition index (%)
43.08±2.32	33.14±2.24	22.45±3.87	0.98±0.20	9.03±1.64	10.73±1.34

注:肥满度(%)=(软组织干重/壳干重)×100

Note: Condition index (%)=(soft tissue dry weight/shell dry weight)×100

1.2 实验设计

设置 3 个 pH 梯度分别为 8.2、7.9 和 7.6,其中, pH 为 8.2 实验组是自然海水组, pH 为 7.9 和 7.6 实验组通过向自然海水连续充入 CO₂ 加富空气以降低 pH 获得,充气时,使用多参数水质监测仪(SmarTROLL-MP, 美国)实时监测海水 pH 的变化,当 pH 达到所需值时,减缓纯 CO₂ 气体的通入流量,维持 pH 稳定在实验所需值。本实验中,每个 pH 实验组设置 4 个平行,每个平行 30 只魁蚶,置于方形水槽中(50 cm×30 cm×20 cm),为摄食、呼吸、排泄实验备用。

1.3 摄食实验

摄食实验在方形缸(20 cm×15 cm×10 cm)中进行。每个方形缸中放 5 只魁蚶,2 L 海水,水中溶解氧(DO)保持在 5 mg/L 以上,待魁蚶适应 10 min 后,投入初始浓度为 5 mg/L 的螺旋藻液,并保证螺旋藻在水中悬浮均匀。摄食实验的水环境与上述各 pH 实验组的水环境相同。每个 pH 摄食组设置 4 个平行,2 个空白对照组(不加魁蚶),实验时间为 2 h。实验结束后,将魁蚶取出,用游标卡尺测量魁蚶的规格(壳长、壳高),并称量其鲜重,之后用解剖刀将软组织与壳分开,分别以铝箔纸包封,60°C 烘干 48 h 至恒重,分析

天平称重。测定实验前后水体中螺旋藻的饵料浓度,收集实验后魁蚶的粪便,计算魁蚶的 IR 和 FER,公式如下:

$$IR = V(C_0 - C_t) / (N \times t \times W)$$

式中, V 为实验海水体积(ml), C_0 、 C_t 分别为实验开始和结束时的饵料浓度(mg/L), N 为实验魁蚶数量, t 为实验时间(h), W 为软组织干重(g)。

$$FER = IR \times (1 - AE)$$

式中, IR 为摄食率, AE 为同化率。

同化率(Assimilation rate, AE, %)公式:

$$AE = (F - E) / [(1 - E) \times F] \times 100$$

式中, $F = (POM/TPM)$, 为饵料中有机质的干重比例, $E = (POM/TPM)$, 为粪便中有机质的干重比例, POM 为颗粒有机物含量, TPM 为总颗粒物含量。

1.4 呼吸排泄实验

实验前停食 24 h,将 3 只生存状态良好、规格一致的魁蚶(表 1)放入 3 L 呼吸瓶中,实验持续 2 h。每组实验呼吸瓶的水环境与各处理水槽中水环境相同,以不加魁蚶的呼吸瓶为对照,实验设 4 个平行,2 个对照组。放入魁蚶待其适应 10 min 后作为实验起始时间,根据始末 DO 和氨氮(NH₄⁺-N)浓度的变化计算 OR 和 NR。在实验结束后,用游标卡尺测量魁蚶的

规格(壳长、壳高), 并称其鲜重, 之后用解剖刀将软组织与壳分开, 在 60℃ 烘箱中烘干 48 h 后, 称壳干重和软组织干重。按以下方法计算 OR 和 NR, 公式如下:

$$OR=(D_0-D_t)\times V/(W\times t)$$

式中, OR 为单位体重耗氧率[mg/(g·h)], D_0 和 D_t 为实验空白对照组和实验组水中 DO 的含量(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h), 16 为氧原子的摩尔质量(g/mol)。

$$NR=[(N_r-N_0)\times V]/(1000\times W\times t)$$

式中, NR 为单位体重排氮率[mg/(g·h)], N_0 和 N_r 为实验空白对照组和实验组水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浓度(mg/L)。 V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

氧氮比公式:

$$O:N=(OR/16)/(NR/14)$$

式中, O:N 为魁蚶 OR 和 NR 之间的比值; OR 为单位体重 OR[mg/(g·h)]; NR 为单位体重 NR[mg/(g·h)]。

采用 SmarTROLL-MP(美国)测定实验海水中的 DO, 采用次溴酸钠氧化法测定水中的氨态氮。

1.5 能量计算

贝类能量收支方程:

$$C=G+R+U+F$$

式中, C 为摄食能, G 为生长能, R 为呼吸能, U 为排泄能, F 为排粪能。

生长余力(SFG)为动物摄取的食物能量与其消耗及损失的能量之差, 用来预测供生长和再生产的剩余能量。生长余力公式:

$$SFG=A-(R+U)$$

式中, A 为吸收能($A=C-F$)。

本研究在进行能量预算时, 使用如下能量转换因子: 1 mg POM=20.78 J; 1 mg O_2 =14.24 J; 1 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ =24.87 J。

1.6 数据分析

使用 Excel 2016 和 SPSS 18.0 软件进行数据分析和作图, 采用单因子方差分析(One-way ANOVA)比较不同数据之间的差异性, $P<0.05$ 为不同处理组间差异显著标准。

2 结果与分析

2.1 短期酸化对魁蚶摄食率和排粪率的影响

在本研究中, pH 对魁蚶的 IR 有显著影响($P<0.05$)。魁蚶的 IR 随 pH 的降低而减少(图 1), pH 为 8.2 组的

IR 最高[4.82 mg/(g·h)], 显著高于 pH 为 7.9、7.6 组($P<0.05$); pH 为 7.6 组的 IR 和 pH 为 7.9 组相比差异不显著($P>0.05$)。

pH 对魁蚶的 FER 有显著影响($P<0.05$)。魁蚶 FER 随 pH 的降低而减少(图 1), pH 为 8.2 组的 FER 最高[1.51 mg/(g·h)], 显著高于 pH 为 7.9、7.6 组($P<0.05$)。

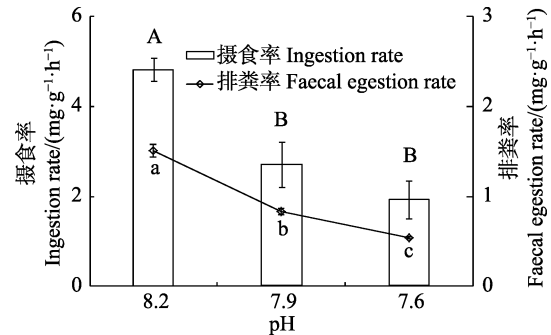


图 1 pH 胁迫对魁蚶摄食率和排粪率的影响
Fig.1 Effects of pH on the ingestion rate and faecal egestion rate of *S. broughtonii*

不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 下同
Different letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$), the same as below

2.2 短期酸化对魁蚶耗氧率和排氮率的影响

本研究中, pH 对魁蚶的 OR 有显著影响($P<0.05$)。魁蚶的 OR 随 pH 的降低呈下降趋势(图 2)。pH 为 8.2 组的 OR 最高[1.04 mg/(g·h)], 显著高于 pH 为 7.9、7.6 组($P<0.05$)。pH 为 7.6 组的 OR 最低[0.50 mg/(g·h)] 是 pH 为 8.2 组的 48%($P<0.05$), 但与 pH 为 7.9 组相比差异不显著($P>0.05$)。

pH 对魁蚶 NR 的影响不显著($P>0.05$)。随着 pH 的降低, 魁蚶的 NR 呈先下降再上升的趋势(图 2)。pH 为 8.2 组的 NR 最高[0.10 mg/(g·h)], pH 为 7.9 组的 NR 最低[0.06 mg/(g·h)], 是 pH 为 8.2 组的 60%。

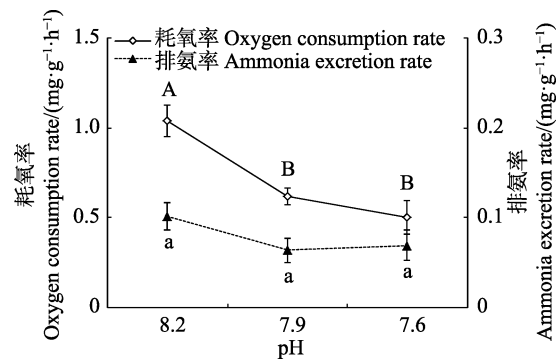


图 2 pH 胁迫对魁蚶耗氧率和排氮率的影响
Fig.2 Effects of pH on the oxygen consumption rate and the ammonia excretion rate of *S. broughtonii*

2.3 短期酸化下魁蚶的氧氮比的变化

本研究中, 魁蚶的 O:N 值随 pH 的降低呈下降的趋势。pH 为 8.2 组中, O:N 值最大(10.12), pH 为 7.6 组 O:N 值最小(7.91)(图 3)。方差分析表明, pH 对魁蚶 O:N 的影响无显著差异($P>0.05$)。

2.4 短期酸化下魁蚶的能量收支

本研究中, 随着 pH 的降低, 魁蚶的摄食能、呼吸能、排粪能和 SFG 逐渐减少, 而排泄能则呈先减少再略有增加的趋势(表 2)。方差分析表明, pH 对魁蚶的摄食能、呼吸能、排粪能和 SFG 均具有显著的影响($P<0.05$)。

不同 pH 条件下, 魁蚶的 SFG 能量收支方程见表 3。

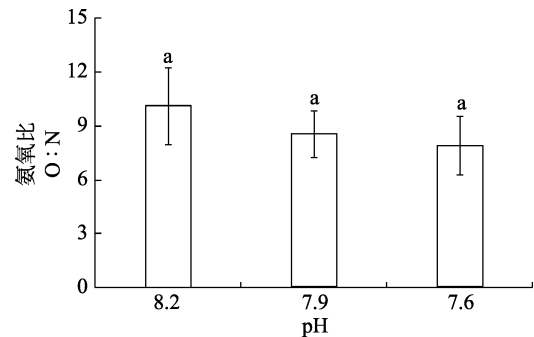


图 3 pH 胁迫对魁蚶 O:N 的影响

Fig.3 Effects of pH on O:N of *S. broughtonii*

表 2 魁蚶在不同 pH 下的能量收支

Tab.2 Energy budget of *S. broughtonii* at different pH [J/(g·h), Mean±SD]

pH	摄食能 Consumption energy	呼吸能 Respiration energy	排泄能 Excretion energy	排粪能 Fecal energy	生长余力 Scope for growth
8.2	100.25±5.32 ^a	14.07±1.26 ^a	2.52±0.38 ^a	31.39±1.37 ^a	52.27±4.72 ^a
7.9	56.51±10.56 ^b	8.87±0.66 ^b	1.53±0.34 ^b	17.32±0.82 ^b	28.79±11.03 ^b
7.6	40.26±8.56 ^b	7.18±1.35 ^b	1.73±0.43 ^{ab}	11.29±0.22 ^c	20.06±8.43 ^b

注: 同一列中不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Notes: Different letters in the same column indicate significant differences between treatments ($P<0.05$)

表 3 不同 pH 下魁蚶的能量收支方程

Tab.3 Energy budget equation of *S. broughtonii* at different pH

pH	能量收支方程 Energy budget equation
8.2	$100C=14.03R+2.52U+31.31F+52.14G$
7.9	$100C=15.69R+2.71U+30.65F+50.95G$
7.6	$100C=17.83R+4.29U+28.05F+49.82G$

3 讨论

3.1 短期酸化对魁蚶摄食的影响

pH 是影响贝类生理代谢的重要环境因子之一。大量研究表明, 适宜 pH 条件下, 贝类机体处于标准代谢状态, 超出贝类适宜 pH 范围, 其 IR 明显下降并表现出一定的不适应性(杨杰青等, 2016)。海洋酸化对海洋贝类等矿化生物的影响是备受关注的焦点之一(黄荣莲等, 2017), 低 pH 对海洋贝类的摄食能力具有显著影响(Fernández-Reiriz *et al.*, 2011)。长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、黑唇鲍(*Haliotis rubra*)处于酸化环境时, 其机体处于一种近乎麻痹的状态, 且摄食活力明显下降(Bamber *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1999)。在酸化条件下, 槽蛤仔(*Ruditapes decussatus*)幼体的 IR 显著降低(Fernández-Reiriz *et al.*, 2011)。何苗等(2017)研究也发现, pH 的降低对缢蛭(*Sinonovacula*

constricta)的 IR 存在显著性影响, 缢蛭的 IR 随 pH 降低呈明显下降趋势。提升 CO₂ 浓度对智利贻贝(*Mytilus chilensis*)稚贝的生理具有非常消极的影响, 能够降低其摄食、能量吸收、新陈代谢和最终用于生长的能量(Navarro *et al.*, 2013), 与本研究结果相似。本研究中, pH 为 8.2 组魁蚶的 IR 显著高于 pH 为 7.9、7.6 组, 同时, 魁蚶的 FER 也随着 pH 的降低而降低, 说明酸化对魁蚶的摄食和排粪产生了一定的消极作用, 使得魁蚶对短期的酸化环境表现出不适应性, 机体偏离正常的生理状态, 导致 IR 和 FER 明显下降。

3.2 短期酸化对魁蚶呼吸代谢的影响

双壳贝类在海水酸化的胁迫下, 无法完全补偿体内酸碱平衡而受到的干扰, 使能量代谢受到抑制(Miles *et al.*, 2007)。在多种情况下, 代谢抑制是双壳贝类在压力条件下生存的一种适应性策略(Michaelidis *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012)。Lanning 等(2010)研究表明, 海洋酸化会抑制长牡蛎的新陈代谢。在长期酸化条件下, 地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)会出现呼吸代谢下降的现象(Ding *et al.*, 2012)。在海水低 pH 环境中, 合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)和翡翠贻贝(*Perna viridis*)的新陈代谢均有所下降(Liu *et al.*, 2012)。在严重酸化条件下, 贝类新陈代谢降低的主要原因是细胞能量需

求的增加和氮损失的协同作用(Thomsen *et al.*, 2010)。但也有研究表明, 在酸化胁迫下, 槽蚶仔幼体的呼吸率显著降低, 而 NR 增加(Fernández-Reiriz *et al.*, 2011), 与本研究结果相似。本研究中, 随着 pH 的降低, 魁蚶的 OR 显著降低, NR 呈先降低后略有升高的趋势, 但均低于正常海水组, 推测魁蚶的呼吸代谢在酸化条件下受到了一定抑制。

O : N 值能够反映环境对有机体的压力程度, 其值的高低可以作为生物体适应环境压力的指标之一(Widdows *et al.*, 1971)。本研究中, 各 pH 组魁蚶的 O : N 值虽无显著差异, 但低 pH 组的 O : N 值均低于正常海水组。当贝类遭受来自外界的胁迫时, 其 O : N 值降低, 这与贝类遭受外界胁迫从而降解体内蛋白质形成氨基酸的生理适应相吻合(李晓艳, 2014; 焦海峰等, 2017)。

3.3 短期酸化对魁蚶能量收支的影响

海水中 CO₂ 浓度上升时, CO₂ 能穿过生物体的细胞膜等结构进入海洋生物体内, 使得细胞内的 pH 降低, 打破了细胞内原有的酸碱平衡, 生物体会启动一系列调控机制来调节酸碱平衡, 而调节过程需要消耗能量(Parker *et al.*, 2013; Gutowska *et al.*, 2010)。如果生物体自身所能产生的能量水平是一定的, 那么根据能量守恒定律, 离子运输或酸碱维持能量消耗的增加必然会引起其他生命活动能量分配的减少(王秀丹, 2017; Esbaugh *et al.*, 2012; Bechmann *et al.*, 2011)。当美洲牡蛎(*C. virginica*)处于较高 CO₂ 浓度的环境时(pH 为 7.5), 为维持自身的内稳态, 其能量消耗大大增加, 标准代谢率大大增加(Beniash *et al.*, 2010), 与上述研究结果相一致。本研究表明, 魁蚶的摄食能、呼吸能、排粪能和 SFG 均随 pH 的降低而减少(其中, pH 为 7.6 组魁蚶的摄食能仅为 pH 为 8.2 组摄食能的 40%), 排泄能呈先减少后增加的趋势。同时, 在 pH 从 8.2 降至 7.6 的过程中, 魁蚶呼吸能的占比由 14.03% 升至 17.83%, 排泄能占比由 2.52% 升至 4.29%, 而排粪能占比由 31.31% 降至 28.05%, 生长能占比则由 52.14% 降至 49.82%。在贝类能量分配中, 环境变化会引起各部分能量占比发生改变(王有基等, 2014)。随着 pH 的降低, 魁蚶会作出适当的生理调整(如降低摄食率、增加代谢率)以调节因酸化环境造成的体内酸碱平衡紊乱。研究表明, 摄入减少和排泄增加通常与能量输入减少有关, 海水酸化引起能量输入减少, 导致贝类生长缓慢(Fernández-Reiriz *et al.*, 2011)。

参 考 文 献

- Bamber RN. The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1990, 143(3): 181–191
- Bechmann RK, Taban IC, Westerlund S, *et al.* Effects of ocean acidification on early life stages of shrimp (*Pandalus borealis*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2011, 74(7–9): 424–438
- Beniash E, Ivanina A, Lieb NS, *et al.* Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 419: 95–108
- Ding ZK, Li HH, Xu YQ. Effect of ocean acidification on respiratory metabolism of marine living things. *Feed Industry*, 2012, 33(20): 15–17
- Esbaugh AJ, Heuer R, Grosell M. Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 2012, 182(7): 921–34
- Fernández-Reiriz MJ, Range P, Álvarez-Salgado XA, *et al.* Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 2011, 433: 97–105
- Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, *et al.* Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 2010, 180(3): 323–335
- Harris JO, Maguire GB, Edwards SJ, *et al.* Effect of pH on growth rate, oxygen consumption rate, and histopathology of gill and kidney tissue for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* donovan and blacklip abalone, *Haliotis rubra* leach. *Aquaculture*, 1999, 160(3–4): 259–272
- He M, Lai QF, Yao ZL, *et al.* Effects of pH and temperature on carbon budget of *Sinonovacula constricta*. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, 36(4): 1014–1019 [何苗, 来琦芳, 么宗利, 等. pH、温度对缢蛏碳收支的影响. *生态学杂志*, 2017, 36(4): 1014–1019]
- Huang RL, Zheng Z, Zhang GF. Gene co-expression network analysis of *Pinctada fucata martensii* under the stress of ocean acidification and heat. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(2): 536–549 [黄荣莲, 郑哲, 张国范. 合浦珠母贝海洋酸化和温度胁迫下基因共表达网络分析. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(2): 536–549]
- Jiao HF, Zheng D, Yan QN, *et al.* Effects of water temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Saccostrea cucullata*. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(2): 692–699 [焦海峰, 郑丹, 严巧娜, 等. 温度、盐度及交互作用对僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)呼吸排泄的影响. *生态学报*, 2017, 37(2): 692–699]

- Kurihara H, Asai T, Kato S, *et al.* Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Biology*, 2009, 4(3): 225–233
- Lannig G, Eilers S, Pörtner HO, *et al.* Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* changes in metabolic pathways and thermal response. *Marine Drugs*, 2010, 8(8): 2318–2339
- Li XY. Effects of salinity on metabolism of triploid and diploid oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Dalian University*, 2014, 35(3): 88–91 [李晓艳. 盐度对三倍体和二倍体太平洋牡蛎代谢影响的比较. *大连大学学报*, 2014, 35(3): 88–91]
- Li Y, Xue SY, Li JQ, *et al.* Effect of Cu^{2+} stress on physiology biochemistry and histopathological structure of *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1531–1540 [李阳, 薛素燕, 李加琦, 等. Cu^{2+} 胁迫对魁蚶生理生化和组织结构的影响. *水产学报*, 2018, 42(10): 1531–1540]
- Liu W, He M. Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(2): 206–211
- Mao YZ, Zhou CY, Zhu L, *et al.* Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 642–652
- Michaelidis B, Ouzounis C, Paleras A, *et al.* Effects of long-term moderate hypercapnia on acid base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress*, 2005, 293(1): 109–118
- Miles H, Widdicombe S, Spicer JJ, *et al.* Effects of anthropogenic seawater acidification on acid-base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(1): 89–96
- Navarro JM, Torres R, Acuña K, *et al.* Impact of mediumterm exposure to elevated $p\text{CO}_2$ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1242–1248
- Parker LM, Ross PL, O'Connor WA. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biology*, 2009, 15 (9): 2123–2136
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, *et al.* Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology*, 2013, 2(2): 651–92
- Ruan FT, Gao S, Li L, *et al.* Gonad development and biochemical composition in the ark shell *Scapharca broughtonii* from coast of Shandong Peninsula. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 47–55 [阮飞腾, 高森, 李莉, 等. 山东沿海魁蚶繁殖周期与生化成分的周年变化. *水产学报*, 2014, 38(1): 47–55]
- Talmage SC, Gobler CJ. Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic bivalves. *PloS One*, 2011, 6(10): e26941
- Tang QS, Chen ZD, Yu KF, *et al.* The effects of ocean acidification on marine organisms and ecosystem. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(14): 1307–1314 [唐启升, 陈镇东, 余克服, 等. 海洋酸化及其与海洋生物及生态系统的关系. *科学通报*, 2013, 58(14): 1307–1314]
- Thomsen J, Melzner F. Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 2010, 157(12): 2667–2676
- Wang XD. The response and adaptation mechanism of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to ocean acidification. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017 [王秀丹. 长牡蛎对海洋酸化的响应与适应机制研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所) 博士研究生学位论文, 2017]
- Wang YJ, Li LS, Li QZ, *et al.* Research progress on eco-physiological responses of shellfish under ocean acidification and global warming. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(13): 3499–3508 [王有基, 李丽莎, 李琼珍, 等. 海洋酸化和全球变暖对贝类生理生态的影响研究进展. *生态学报*, 2014, 34(13): 3499–3508]
- Widdows J, Bayne BL. Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1971, 51(4): 827–843
- Xue SY, Wang JY, Li JQ, *et al.* Effects of temperature on energy metabolism and antioxidant enzyme activities of *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 573–583 [薛素燕, 王金叶, 李加琦, 等. 温度对魁蚶能量代谢及抗氧化酶活性的影响. *水产学报*, 2019, 43(3): 573–583]
- Yang JQ, Jiang M, Li L, *et al.* Effects of salinity and pH on the filtration rate and ingestion rate of *Meretrix meretrix*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 87–93 [杨杰青, 蒋玫, 李磊, 等. 盐度、pH对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率和摄食率的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 87–93]
- Zhang J, Zhang ZK, Zhang YF. Ocean acidification and its impacts on marine ecosystem. *Marine Geology Frontiers*, 2012, 28(2): 1–9

Effects of Short-Term Acidification on Feeding, Respiratory Metabolism, and Energy Budget of *Scapharca broughtonii*

XUE Suyan^{1,2}, LI Jiaqi^{1,2}, LI Yang¹, DING Jingkun¹,
XU Han¹, ZHANG Wenwen¹, MAO Yuze^{1,2}^①, 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)

Abstract Ocean acidification is one of the major changes in marine ecosystem in this century. This has a negative effect on the fertilization, development, growth, and survival of marine mollusks. Presently, physiological effects of ocean acidification on some economic shellfish are not clear. To study the effects of ocean acidification on the physiological ecology of economic shellfish is of great significance for environmental science, ecology, and aquaculture. The feeding, respiratory metabolism, and energy budget of *Scapharca broughtonii* at different pH levels (pH 8.2~7.6) were studied in the laboratory. The results showed that the feeding and defecation rates of *S. broughtonii* were significantly ($P<0.05$) affected by pH, and there was a declining trend on the feeding and defecation rates with a decrease in pH value. The oxygen consumption rate was also significantly ($P<0.05$) affected by pH, showing an obvious downward trend with decreasing pH value. There was an initial decrease in ammonia excretion rate, which then increased with a decrease in pH value. O : N ratio at low pH value was lower than that of normal seawater, indicating that low pH value could inhibit the respiratory metabolism of *S. broughtonii* to some extent. The energy budget at different pH values indicated that energy ingestion, respiratory consumption, fecal energy loss, and energy absorbed in the growth process all decreased with a decrease in pH value. Interestingly, energy loss during excretion decreased first and then increased. According to energy budget equation, we found that pH had a significant effect on energy distribution of *S. broughtonii* ($P<0.05$). As the pH value decreases, the proportion of energy consumed during respiration and excretion increases, while the proportion involved in excrement and growth decreases. Under low pH conditions, *S. broughtonii* will make appropriate physiological adjustments to reduce the feeding rate and increase the metabolic rate, resulting in a decrease in energy, which leads to a decrease in energy deposition in the growth process. This study suggested that the feeding and metabolism of *S. broughtonii* decreased significantly under short-term acidification, which may be a synergistic effect of increased cell energy demand and nitrogen loss.

Key words *Scapharca broughtonii*; pH; Feeding; Respiratory metabolism; Energy budget

① Corresponding author: MAO Yuze, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190625001

http://www.yykxjz.cn/

房景辉, 蒋增杰, 蔺凡, 高亚平, 方建光, 张鹏, 郭智俐, 杜美荣, 孟珊. 桑沟湾海带标准化养殖模式的优势探析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 134–140

Fang JH, Jiang ZJ, Lin F, Gao YP, Fang JG, Zhang P, Guo ZL, Du MR, Meng S. Analysis on the advantages of standard kelp long line culture in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 134–140

桑沟湾海带标准化养殖模式的优势探析*

房景辉^{1①} 蒋增杰¹ 蔺凡¹ 高亚平¹ 方建光¹
张鹏² 郭智俐² 杜美荣¹ 孟珊^{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 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. 山东大学(威海)海洋学院 威海 264209; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 针对桑沟湾养殖海区海带(*Laminaria japonica*)的超容量养殖现象,研究了该海区中标准化养殖模式和传统养殖模式的海带生长差异。结果显示,在标准化养殖模式下,海带长、宽、平均厚度、湿重、投影面积和特定生长率均高于传统养殖模式,单棵海带重量显著提高,且海带的碳、氮和蛋白质含量明显高于传统养殖模式,海带品质大大提升。养殖后期,标准化养殖海区养殖海带垂直投影面积之和与对应养殖海区面积之比为 6.33,而传统养殖模式的比值为 9.15;标准化养殖海区海带所处水层下方的光照强度显著高于传统养殖区,海带所处水层的海流流速也高于传统养殖区。研究表明,桑沟湾海带标准化养殖模式使海带养殖密度降低,海带生长速度和品质均得以提高;在标准化养殖模式下,海带重叠较小,接受的光照比传统养殖模式充足;较快的海流使标准化养殖海区营养盐更新速度更快,这两方面可能是导致 2 种养殖模式下海带生长和品质产生差异的原因。

关键词 海带; 标准化养殖; 养殖容量; 生长; 桑沟湾

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0016-07

桑沟湾位于山东半岛东部,平均水深约 8 m,总面积约为 13333 hm²,是我国著名的水产养殖海湾,也是我国重要的海带(*Laminaria japonica*)养殖海域。自 20 世纪 60 年代末开始,桑沟湾便开始进行海带养殖,随后贻贝、扇贝和牡蛎养殖业发展起来,与海带养殖业一同成为桑沟湾水产养殖的主要养殖产业,但海带养殖仍处于主体地位(方建光等, 1996)。多年来,

为满足国内外的市场需求,该海湾筏式养殖面积不断扩大,养殖范围已扩展到海湾外 20 m 水深处,同时,养殖密度居高不下。由于海湾半封闭的特点,大面积筏式养殖限制了水流交换,水交换速率下降(何宇晴等, 2016),湾内营养盐结构已经发生改变,磷成为海带生长的限制性营养盐(刘慧, 2002; 李瑞环, 2014; 徐东会等, 2017)。

* 十三五“蓝色粮仓科技创新”国家重点研发计划项目(2019YFD0900803)、国家自然科学基金面上项目(41876185)、国家贝类产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)和科技部政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE0118300)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2019YFD0900803), General Program of National Natural Science Foundation of China (41876185), Capacity Evaluation and Management Post of National Shellfish Industry Technology System (CARS-49), and Key Project of International Science and Technology Innovation Cooperation Among Governments of the Ministry of Science and Technology (2017YFE0118300)].

①通讯作者: 房景辉, 副研究员, E-mail: hui861@163.com

收稿日期: 2019-06-25, 收修改稿日期: 2019-07-13

海洋科学中应用容纳量的概念始于 20 世纪 30 年代, 养殖容量是容纳量概念应用于水产养殖业的一个生态学特例(唐启升, 1996), 为单位水体内在保护环境、节约资源和保证应有效益各方面都符合可持续发展基本要求的最大养殖量(方建光等, 1996; 董双林等, 1998)。20 世纪 90 年代中期, 方建光等(1996)评估了桑沟湾海带养殖容量, 显示湾内海带单位养殖量已经超过理论养殖量。而当前该湾海带的养殖规模已远远超过当时, 超容量养殖现象加剧(史洁, 2009), 导致海带养殖问题频发、劳动力成本高、综合经济效益低、产品质量差, 不利于该湾海带养殖业的可持续发展。

桑沟湾海带的传统养殖模式主要根据养殖从业者的经验确定, 已沿用多年。该模式筏架间距较小, 海带养殖密度较大, 参数设置不能根据桑沟湾环境条件的变化做出改变。针对桑沟湾海带养殖存在的问题, 本课题组构建了海带筏式养殖标准化模式与技术看方案。经过 2015~2016、2016~2017 年的养殖示范, 养殖效果突出, 大大降低了海带养殖的劳动力、物资成本, 产品品质显著提高, 经济效益显著。在桑沟湾超容量养殖海区进行海带养殖, 标准化与传统养殖方式相比效果迥异, 针对这一现象, 课题组在 2017~2018 年再次实施标准化养殖示范, 建立标准化养殖示范区, 以毗邻的传统养殖区为对照, 比较养殖周期内 2 种养殖方式海带的生长情况; 通过测定海带的投影面积、海带所处深度的光照强度、养殖区海流流速等指标, 分析 2 种不同养殖模式条件下海带生长差异的原因, 初步探究超容量养殖条件下的海带生长差异机制, 为海带筏式养殖提供技术支撑和参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验海域与筏架布局

实验海域选择在桑沟湾南侧的东楮岛养殖海域, 标准化养殖区 40 hm², 对照养殖海区 40 hm², 2 个养殖区相距约 50 m。

将筏架间距由传统养殖方式的 4.7 m 增大到 5.3 m; 改变了浮漂颜色并增大了浮漂规格, 将原来的黑色 28 cm 直径的浮漂改为橘红色直径为 30 cm 的浮漂, 减少了每条筏架放置的浮漂数量; 使用“八字扣”固定海带苗绳, 方便海带苗投放和收获; 标准化养殖模式海带绳间距约 1.15 m, 传统养殖模式海带绳间距约为 0.85 m; 每条长度约 100 m 的筏架, 标准化养殖模式海带绳约 87 绳, 传统养殖模式海带绳数量约 115 绳; 标准化养殖模式海带每绳 32 棵, 传统养殖模式每绳海带 35 棵。通过计算, 标准化养殖模式

海带的密度降低为传统养殖方式的 62.9%。

1.2 实验设计

传统养殖区与标准化养殖区的海带样品, 从挂苗到收获共采集 5 次, 分别为 2017 年 12 月 20 日、2018 年 1 月 19 日、2018 年 3 月 2 日、2018 年 4 月 12 日和 2018 年 4 月 26 日, 分别在传统和标准化海带养殖区内随机选取采样点, 从海带苗绳靠绳一端向内连续采集 8~10 棵。现场测量并记录长、宽、湿重、垂直投影面积等。第 1、2 次取样由于海带较小, 整棵带回实验室冷冻保存、分析; 实验后期, 因为海带较大, 每棵海带从假根部往上分下、中、上 3 段等重取样合计 300~500 g, 带回实验室冷冻保存、分析。

海带养殖后期, 于 2018 年 2 月 10 日~4 月 12 日, 在传统养殖区与标准化养殖区中心位置各悬挂自容式温度照度计(HOBO, UA-002-64, 美国)3 台, 悬挂于海带苗绳靠绳一端下方 70 cm 深处, 设置每 15 min 记录 1 次光照强度, 用于测定透过海带养殖水层的光照强度。海带养殖后期(2018 年 4 月 12 日~5 月 9 日), 在 2 个养殖海区各投放 1 台 ADCP(Nortek, Aquadopp Profiler 1 MHz, 挪威)测定养殖区剖面海流, 测定 1 个潮周期。

1.3 样品分析与测定

1.3.1 海带垂直投影面积测定 本研究建立了海带垂直投影面积计算方法, 将每棵海带样品平铺于 1.5 m×1.5 m 的白板上, 用相机在白板中心上方约 2.5 m 处垂直向下拍照, 使用 Adobe Photoshop CS6 软件进行图片分析, 计算海带的垂直投影面积。

1.3.2 海带含水率与碳、氮含量测定 在 70℃ 条件下, 使用电热鼓风干燥箱将海带样品烘干至恒重, 使用电子天平称量干重。使用研磨机将海带研磨成粉末, 密封保存, 并使用元素分析仪(Elementer Vario EL III)分析其碳、氮含量。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 特定生长率 本实验分 5 个阶段计算海带特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d), 2017 年 12 月 20 日~2018 年 1 月 19 日、2018 年 1 月 19 日~3 月 2 日、2018 年 3 月 2 日~4 月 12 日、2018 年 4 月 12 日~26 日和 2017 年 12 月 20 日~2018 年 4 月 26 日的 SGR 分别记为 SGR_A、SGR_B、SGR_C、SGR_D、SGR_T。特定生长率计算如下:

$$SGR(\%/d) = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{d} \times 100\% \quad (1)$$

式中, W_f 为阶段海带末重(g), W_i 为阶段海带初重(g), d 为阶段养殖天数。

1.4.2 单位面积内海带垂直投影面积与养殖海区面积比(P)

$$P = \frac{\text{海带垂直投影总面积}}{\text{养殖海区面积}} \quad (2)$$

1.4.3 海带平均厚度 定义海带体积与海带垂直投影面积的比为海带平均厚度:

$$D = \frac{m/\rho}{S} \quad (3)$$

式中, D 为海带厚度(cm), m 为海带湿重(g), 以排水法测定的 ρ 为海带密度(g/cm³), S 为海带垂直投影面积(cm²)。标准化养殖海带厚度与传统养殖海带厚度差异百分比(R)为:

$$R = \frac{D_{\text{标准化}} - D_{\text{传统}}}{D_{\text{传统}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, R 为海带厚度差异百分比(%), $D_{\text{标准化}}$ 为标准化养殖模式下的海带厚度(cm), $D_{\text{传统}}$ 为传统养殖模式下的海带厚度(cm)。

1.4.4 数据统计与分析 使用 Excel 2010 软件对海带垂直投影面积与湿重关系进行曲线拟合, 将 2018 年 2 月 8 日~4 月 11 日标准化养殖区与传统养殖区每天的光照强度进行累计, 分别对 3 个测量点的日累计光照强度取均值做折线图进行比较。使用 SPSS 进行统计分析, 其中, 标准化养殖模式与传统养殖模式海

带长、宽、湿重、投影面积、含水率、碳含量、氮含量、光照强度差异使用独立样本 T 检验进行差异显著性分析; 海带垂直投影面积与湿重关系使用回归分析进行曲线估计。

2 结果

2.1 特定生长率

从整个过程来看, 与传统养殖模式的海带相比, 标准化养殖模式海带的生长指标多数较高(表 1)。至 2018 年 4 月 12 日, 标准化与传统养殖模式下海带的长、宽和湿重均差异显著($P < 0.05$), 至 2018 年 4 月 26 日, 虽然 2 种养殖模式海带生长差异减小, 但标准化养殖海带的各项生长指标仍大于传统养殖模式。

标准化养殖模式下的 SGR_A 和 SGR_C 高于传统养殖模式, 传统养殖模式下的 SGR_B 和 SGR_D 高于标准化养殖模式。从整个养殖周期来看, 标准化养殖模式的 SGR_T 略高于传统养殖模式(表 2)。

2.2 垂直投影面积

2 种养殖模式的海带垂直投影面积变化趋势与生长指标相似, 到 2018 年 4 月 12 日, 标准化与传统养殖模式下的垂直投影面积差异显著($P < 0.05$), 实验结束时, 标准化养殖模式的海带垂直投影面积仍然较大(表 1)。

表 1 标准化与传统养殖模式下海带长、宽、湿重和垂直投影面积(平均值±标准差)

Tab.1 Length, width, wet weight, vertical projection area of kelp under standard and traditional long line culture (Mean±SD)

时间 Date Year-Month-Day	筏式养殖模式 Long line culture mode	长 Length (cm)	宽 Width (cm)	湿重 Wet weight (g)	垂直投影面积 Vertical projection area (cm ²)
2017-12-20	初始值 Initial	43±14	7±2	8±5	115±87
2018-01-09	标准化 Standard	211±20 ^b	35±8 ^b	352±124 ^b	3867±1105 ^b
	传统 Traditional	186±49 ^a	31±6 ^a	282±167 ^a	3134±1809 ^a
2018-03-02	标准化 Standard	264±25 ^a	43±6 ^b	693±157 ^a	6560±1285 ^a
	传统 Traditional	289±50 ^b	41±2 ^a	709±172 ^b	7026±1601 ^b
2018-04-12	标准化 Standard	363±59 ^b	43±6 ^b	1520±339 ^b	12018±2706 ^b
	传统 Traditional	274±60 ^a	38±5 ^a	916±259 ^a	7284±1941 ^a
2018-04-26	标准化 Standard	348±31	44±5	1592±300	12054±2011
	传统 Traditional	313±60	45±6	1388±416	10678±2905

注: 不同字母表示相同时间标准化养殖模式与传统养殖模式的相应指标存在显著性差异($P < 0.05$)。下同

Note: Data with different letters were significantly different between standard and traditional modes at the same time ($P < 0.05$). The same as below

在标准化和传统养殖模式下, 海带垂直投影面积与湿重均呈现显著的线性关系(标准化: $R^2=0.95$, $P < 0.01$; 传统: $R^2=0.95$, $P < 0.01$; 图 1)。由公式(2)可得, 至 2018 年 4 月 26 日, 传统养殖模式下单位养

殖面积内海带垂直投影总面积是养殖海区面积的 9.15 倍, 标准化养殖模式下的海带投影总面积是养殖海区面积的 6.33 倍, 传统养殖模式下的海带垂直投影总面积显著高于标准化养殖模式($P < 0.05$)。

表 2 标准化和传统养殖模式不同生长阶段海带的特定生长率(%/d)

Tab.2 Comparison of specific growth rate (SGR, %/d) of kelp at different stages between standard and traditional long line culture

筏式养殖模式 Long line culture mode	SGR _A	SGR _B	SGR _C	SGR _D	SGR _T
标准化 Standard	12.83	1.61	1.92	0.30	4.22
传统 Traditional	12.10	2.19	0.60	2.97	4.11

注: 表中 SGR_T 为 2017 年 12 月 20 日~2018 年 4 月 26 日期间(整个实验期)的特定生长率。SGR_A 为 2017 年 12 月 20 日~2018 年 1 月 19 日期间的特定生长率, SGR_B 为 2018 年 1 月 19 日~3 月 2 日期间的特定生长率, SGR_C 为 2018 年 3 月 2 日~4 月 12 日期间的特定生长率, SGR_D 为 2018 年 4 月 12 日~26 日期间的特定生长率

Note: SGR_T stands for the specific growth rate (SGR) of 2017.12.20~2018.4.26. SGR_A stands for the SGR of 2017.12.20~2018.1.19. SGR_B stands for the SGR of 2018.1.19~3.2. SGR_C stands for the SGR of 2018.3.2~4.12. SGR_D stands for the SGR of 2018.4.12~26

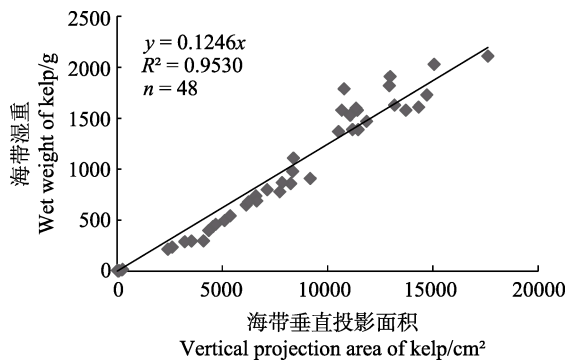


图 1 标准化养殖模式下的海带湿重与垂直投影面积的线性回归关系

Fig.1 Relationship between wet weight and vertical projection area of kelp in standard long line culture

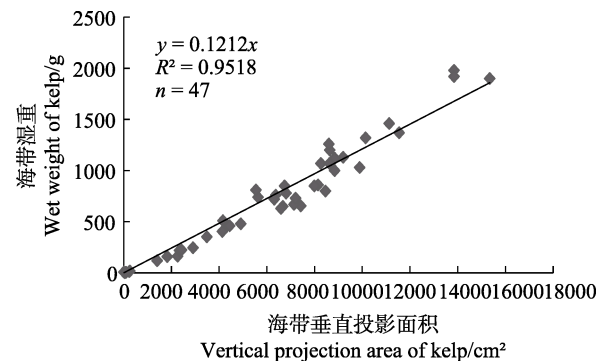


图 2 传统养殖模式下的海带湿重与垂直投影面积的线性回归关系

Fig.2 Relationship between wet weight and vertical projection area of kelp in traditional long line culture

2.3 藻体成分组成

2.3.1 水分 2018 年 1 月 19 日和 3 月 2 日, 标准化养殖模式下的海带含水率分别为 91.9%和 89.1%, 传统养殖模式下分别为 93.3%和 90.4%; 2018 年 4 月 12 日和 4 月 26 日, 标准化养殖模式下的海带含水率分别为 89.6%和 89.6%, 传统养殖模式下分别为 89.3%和 88.5%。养殖前期, 传统养殖模式的海带含水率略高, 而养殖后期, 标准化养殖模式的海带含水率略高, 但不同时期 2 种模式养殖海带的含水率差异均不显著 ($P>0.05$)。

2.3.2 碳、氮和蛋白质含量 从表 3 可以看出, 2018 年 3 月 2 日标准化养殖模式海带氮和蛋白质含量略低于传统养殖模式, 其他采样时间, 标准化养殖模式海带的氮和蛋白质含量均略高于传统养殖模式, 至 4 月 26 日, 标准化养殖模式海带的氮和蛋白质含量比传统养殖模式高 16.1% ($P<0.05$)。

2.4 光照强度

在 2 个养殖海区的 3 个照度计监测的约 12000 个光照强度数据中, 标准化养殖海区有 354 个数据超过 8000 lx, 211 个数据超过 10000 lx, 105 个数据超过

表 3 标准化和传统养殖模式不同生长阶段海带的碳、氮和蛋白质含量(%)(平均值±标准差)

Tab.3 Carbon, nitrogen and protein contents in kelp at different stages under standard and traditional long line culture (%) (Mean±SD)

筏式养殖模式 Long line culture mode	成分 Composition	日期 Date				
		2017-12-20	2018-01-19	2018-03-02	2018-04-12	2018-04-26
标准化 Standard	碳 Carbon	20.73±1.85	22.82±3.55	25.21±1.75	21.67±2.42	23.98±2.76
	氮 Nitrogen	2.21±0.30	2.11±0.33 ^b	1.36±0.18 ^a	1.10±0.17	0.98±0.09 ^b
	蛋白质 Protein	13.80±1.90	13.19±2.08 ^b	8.49±1.09 ^a	6.88±1.04	6.14±0.56 ^b
传统 Traditional	碳 Carbon	20.73±1.85	21.22±2.49	24.67±1.71	21.35±1.99	25.90±2.02
	氮 Nitrogen	2.21±0.30	1.78±0.26 ^a	1.61±0.12 ^b	0.97±0.20	0.85±0.12 ^a
	蛋白质 Protein	13.80±1.90	11.13±1.60 ^a	10.06±0.75 ^b	6.04±1.23	5.29±0.77 ^a

12000 lx, 55 个数据超过 14000 lx, 只有 1 个数据超过 22000 lx; 而在传统养殖海区仅有 5 个数据超过 8000 lx, 1 个数据超过 14000 lx。从图 3 可以看出, 标准化养殖海区日累计光照强度明显大于传统养殖模式。在整个监测时段内, 标准化养殖海区 3 个照度计平均日累计光照强度总和为 4422370 lx, 传统养殖海区 3 个照度计平均日累计光照强度总和仅为 2146402 lx, 相差 1 倍以上。

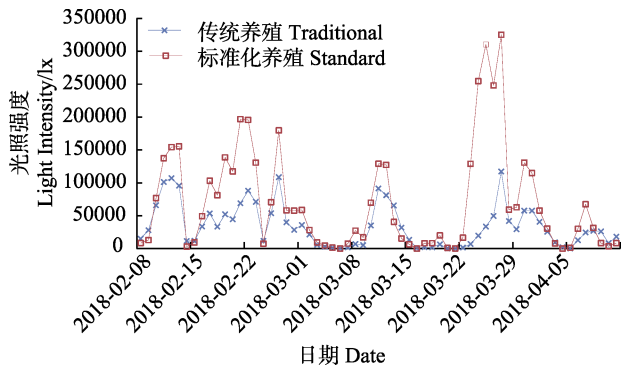


图 3 标准化与传统养殖模式日累计光照强度
Fig.3 Sum of light intensity between the standard and traditional long line culture

2.5 海流流速

原计划测定 2 个养殖海区同一潮周期的海流流速, 由于仪器故障所获数据仅能比较大潮期 4 d (4 月 26~29 日) 的海流流速。结果显示, 标准化养殖海区海带所处水层海流平均流速为 13.8 cm/s, 而传统养殖海区为 11.5 cm/s, 标准化养殖海区比传统养殖海区快 20.0% (图 4)。从图 5 可以看出, 传统养殖海区海流流速多处于 0.4 m/s 以内, 而标准化养殖海区海流流速在 0.2~0.6 m/s 范围内, 出现频率明显高于传统养殖海区。

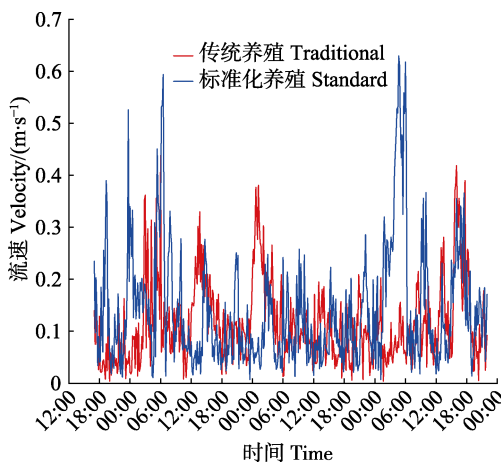


图 4 不同养殖模式海带所处水层的海流流速
Fig.4 The currents in the water layer where the kelp located in the long line culture areas

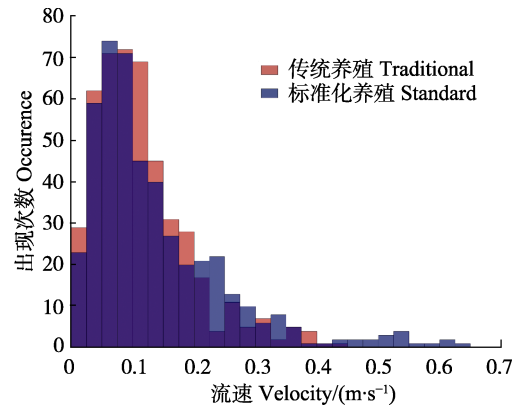


图 5 不同养殖模式海带所处水层的海流流速分布
Fig.5 The currents distribution in the water layer where the kelp located in the long line culture areas

3 讨论

3.1 不同养殖模式海带生长差异原因分析

研究表明, 影响海带生长的因素较多, 诸多因素中温度、光照、营养盐、海流流速等与海带的生长关系尤为密切(吴荣军等, 2009)。海带生长最适温度为 10℃~20℃, 温度低于 10℃或高于 20℃时, 海带生长滞缓(张起信, 1994)。桑沟湾湾口温度低于湾内温度, 春季表层平均水温为 14.76℃, 夏季为 24.02℃, 秋季为 17.90℃, 冬季为 5.61℃(刘慧, 2002), 秋、冬和春季是海带生长的主要时期, 除冬季水温偏低外, 其余时段均处于海带的生长期, 且温度的差异不是影响海带产量的决定性因素(李爱杰等, 1986)。为减少温度差异对研究结果的影响, 本研究标准化养殖海区与传统养殖海区相邻约 50 m, 2 个区域海带所处水层的温度无显著差异。因此, 温度不是导致本研究 2 种养殖模式海带产生生长差异的原因。

光照强度可影响海带的生长, 处于厚成期、成熟期、衰老期的海带光照强度控制在 14000~22000 lx 之间最为适宜(张起信, 1994), 特别是在厚成期, 海带对光照的需求较大。但是, 过高的光照强度也会对大型藻类生长产生胁迫作用, 造成生长减缓(张清芳等, 2017; 梁洲瑞等, 2011)。本研究中, 在养殖中后期, 经 2 个多月光照强度监测发现, 海带养殖水层光照强度极少超过 22000 lx, 不存在强光胁迫的问题。而光照强度不足却是传统养殖模式存在的明显问题, 该模式中海带所处水层的光照强度很少超过 8000 lx。通过对海带垂直投影面积测算, 海带垂直投影总面积与筏架面积的比例越大, 说明海带重叠面积越大, 海带相互遮挡阳光越严重。本研究光照强度测量数据显示, 标准化养殖模式下的海带所处水层的光照强度远

远高于传统养殖模式,且从 2 种养殖模式下总投影面积与筏架总面积的比例关系对比中可知,传统养殖与标准化养殖中海带接受光照强度的差异是导致其生长出现显著差异的重要因素。

以 N、P、Si、Fe、Mn 为重要限制元素的营养盐是限制海带生长的重要因素(刘慧, 2002),充足的营养盐等生源要素是保障大型藻类生长的必要条件,在营养盐限制的条件下,其更新速度或者说海流流速可能会对海带生长产生重要影响(张定民等, 1986)。从海流数据可以看出, 2 种养殖模式的养殖海带所处水层海流流速存在明显差异,传统养殖区营养盐更新要比标准化养殖区慢。另外,海流流速决定了海带在水层中所处的位置及方向,较快的流速可以使海带处于较浅水层,并处于平铺状态,能够较好地接受光照。本研究结果与张定民等(1986)的研究结果相似,该研究发现,海流流速 53 cm/s(监测点的最大流速)是海带生长的最佳流速,当流速小于 53 cm/s 时,海带生长速度随着流速减小而降低。本研究中,标准化养殖海区海带所处水层最大海流流速均在 65 cm/s 以内,而传统养殖模式海区海带所处水层最大海流流速均在 45 cm/s 以内。因此,不同养殖模式海带所处水层的海流流速差异也是造成海带生长差别的重要因素。

3.2 标准化海带养殖模式优势分析

本研究通过测量对比筏式养殖海带标准化养殖模式与传统养殖模式生长参数(长、宽、平均厚度、湿重等)发现,标准化养殖模式的海带特定生长率略高于传统养殖模式,实验结束时,标准化养殖海区海带规格显著高于传统养殖模式海区,且从含水率可以看出,实验结束时,标准化养殖模式海带成熟度不如传统养殖模式,前者具有更长的生长期,收获时的规格更大。从碳、氮组成来看,标准化养殖模式下的海带碳、氮元素的含量均高于传统养殖模式,说明标准化养殖模式下的海带蛋白质含量显著提高,海带品质提高。因此,与常规养殖方式相比,标准化养殖区海带的养殖密度降低了 30%以上,单位养殖海区耗费的养殖物资显著降低,同时,降低了劳动力投入和成本;养殖的海带产品品质显著提高,干海带产品价格要比传统养殖模式下的干海带平均价格高,综合以上因素,标准化养殖模式所带来的综合经济效益显著提高。

参 考 文 献

Dong SL, Li DS, Pan KH. On the carrying capacity of mariculture. *Journal of Ocean University of Qingdao (Natural Science)*, 1998, 28(2): 86–91 [董双林, 李德尚, 潘

克厚. 论海水养殖的养殖容量. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 1998, 28(2): 86–91]

Fang JG, Sun HL, Kuang SH, *et al.* Assessing the carrying capacity of Sanggou Bay for culture of kelp *Laminaria japonica*. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 7–17 [方建光, 孙慧玲, 匡世焕, 等. 桑沟湾海带养殖容量的研究. *海洋水产研究*, 1996, 17(2): 7–17]

Fang JG, Sun HL, Kuang SH, *et al.* Mariculture status and optimizing measurements for the culture of scallop *Chlamys farreri* and kelp *Laminaria japonica* in Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 95–102 [方建光, 孙慧玲, 匡世焕, 等. 桑沟湾海水养殖现状评估及优化措施. *海洋水产研究*, 1996, 17(2): 95–102]

He YQ, Huang DJ, Zeng DY, *et al.* Effect of suspended kelp culture on vertical structure of tidal current in Sanggou Bay, China. *Journal of Marine Science*, 2016, 34(4): 20–27 [何宇晴, 黄大吉, 曾定勇, 等. 桑沟湾筏式海带养殖对潮流垂直结构的影响. *海洋学研究*, 2016, 34(4): 20–27]

Li AJ, Sun ST. Studies on the seasonal variations in some chemical components and the catalase activity of *Laminaria japonica* aresch. *Journal of Fisheries of China*, 1986(4): 128–133 [李爱杰, 孙守田. 海带若干化学成分及过氧化氢酶活力的季节变化的研究. *水产学报*, 1986(4): 128–133]

Li RH. Nutrient dynamics under the impact of eco-aquaculture – A case study in Sanggou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [李瑞环. 生态养殖活动下营养盐动力学研究—以桑沟湾为例. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]

Liang ZR, Wang FJ, Sun XT, *et al.* Effects of light intensity, temperature and salinity on newborn branches of *Sargassum thunbergii* evaluated with chlorophyll fluorescence assay. *Marine Sciences*, 2011, 35(12): 21–27 [梁洲瑞, 王飞久, 孙修涛, 等. 利用叶绿素荧光技术揭示光照、温度和盐度对鼠尾藻嫩芽的影响. *海洋科学*, 2011, 35(12): 21–27]

Liu H. Studies on limiting nutrients of Laizhou Bay and Sanggou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2002 [刘慧. 莱州湾和桑沟湾限制性营养盐的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2002]

Shi J. Numerical study on the influences of physical processes on the aquaculture carrying capacity in a semi-enclosed bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [史洁. 物理过程对半封闭海湾养殖容量影响的数值研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]

Tang QS. On the carrying capacity and its study. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 1–6 [唐启升. 关于容纳量及其研究. *海洋水产研究*, 1996, 17(2): 1–6]

Wu RJ, Zhang XL, Zhu MY, *et al.* A model for the growth of haidai (*Laminaria japonica*) in aquaculture. *China Fisheries, Marine Science Bulletin*, 2009, 28(2): 34–40 [吴荣军, 张学雷, 朱明远, 等. 养殖海带的生长模型研究. *海洋通报*, 2009, 28(2): 34–40]

Xu DH, Chen BJ, Jiang T, *et al.* Temporal and spatial variation

- characteristics of water nutrients and eutrophication evaluation in aquaculture water areas of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 1–11 [徐东会, 陈碧鹃, 江涛, 等. 桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征及富营养化评价. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 1–11]
- Zhang DM, Miao GR, Yang QM. Research on the relationship between the coastal current and *Laminaria japonica* raising. An experiment of comparison between the current speed and *Laminaria japonica* growth. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1986, 16(4): 180–186 [张定民, 缪国荣, 杨清明. 沿岸流与海带养殖关系的研究 II、流速对海带生长的影响. *山东海洋学院学报*, 1986, 16(4): 180–186]
- Zhang QF, Feng YQ, Wen JY, *et al.* The effects of light intensity and nitrogen on the physiology of the red macroalgae *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1065–1071 [张清芳, 冯颖琪, 温金燕, 等. 光照强度和氮营养盐浓度对龙须菜生理代谢的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1065–1071]
- Zhang QX. The relationship between growth and light of kelp *Laminaria japonica*. *China Fisheries*, 1994(6): 34–35 [张起信. 海带生长与光照的关系. *中国水产*, 1994(6): 34–35]

(编辑 冯小花)

Analysis on the Advantages of Standard Kelp Long Line Culture in Sanggou Bay

FANG Jinghui¹Ⓐ, JIANG Zengjie¹, LIN Fan¹, GAO Yaping¹, FANG Jianguang¹, ZHANG Peng², GUO Zhili², DU Meirong¹, MENG Shan^{1,3}

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

2. Marine College, Shandong University (Weihai), Weihai 264209; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In the 1990s, kelp (*Laminaria japonica*) aquaculture was over capacity in Sanggou Bay; however, the area used for kelp aquaculture has almost doubled since then. Consequently, the levels and proportion of nutrients has changed since the end of last century. In order to address this problem, we previously established standard long line culture to reduce kelp density. After two years, profit had increased significantly; however, the reasons why kelp growth improved in the standard long line culture area compared to the traditional area remained unknown. This study was carried out to elucidate the advantages of standard kelp long line culture in Sanggou Bay. There were two 40 hm² experimental areas: a standard kelp long line culture area and a traditional long line culture area. The distance between the two areas was approximately 50 m. The growth and composition of kelp, light density, and current in both areas were measured throughout the experiment. The length, width, average thickness, wet weight, projected area, and specific growth rate of kelp were higher in the standard long line culture area than in the traditional long line culture area, with kelp weight significantly higher in the standard area. The carbon, nitrogen, and protein content of the kelp in the standard long line culture area was significantly higher than that in the traditional culture area, and the quality of the kelp product was greatly improved. During the later stages of cultivation, the ratio of the sum of the projection area of cultured kelp in the standard culture area to the corresponding cultured sea area was 6.33, while that of the traditional area was 9.15. The light density of the water layer beneath the kelp in the standard area was significantly higher than that in the traditional area, and the current speed was also higher in the standard area than in the traditional culture area. Our results showed that kelp overlap decreased in the standard area and that total light density was higher in the standard area than in the traditional area. Moreover, the increased current in the standard area carried more nutrients to the kelp. These may be the factors resulting in differences between the two methods of kelp culture.

Key words *Laminaria japonica*; Standard aquaculture; Carrying capacity; Growth; Sanggou Bay

Ⓐ Corresponding author: FANG Jinghui, E-mail: hui861@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190628003

http://www.yykxjz.cn/

魏家慧, 李晓蕾, 马德英, 汪文俊, 梁洲瑞, 李国梁, 刘福利, 孙修涛, 王飞久. 盐度及钒酸钠胁迫对红毛菜光合生理的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 141-149

Wei JH, Li XL, Ma DY, Wang WJ, Liang ZR, Li GL, Liu FL, Sun XT, Wang FJ. Effects of salinity and Na_3VO_4 stress on photosynthetic physiology of *Bangia*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 141-149

盐度及钒酸钠胁迫对红毛菜光合生理的影响*

魏家慧^{1,2} 李晓蕾² 马德英² 汪文俊^{2,3①} 梁洲瑞^{2,3}
李国梁^{1,2} 刘福利^{2,3} 孙修涛^{2,3} 王飞久²

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

摘要 利用叶绿素荧光技术和液相氧电极技术, 研究了盐度与钒酸钠胁迫对红毛菜(*Bangia fuscopurpurea*, 海水种)和暗紫红毛菜(*Bangia atropurpurea*, 淡水种)光合作用的影响。结果显示, 红毛菜和暗紫红毛菜分别在低盐、高盐下胁迫 1 h, PS II 原初光能转化效率(F_v/F_m)均快速下降, 且下降幅度与胁迫程度正相关; 第 3 天开始, 盐度 0 和 8 对红毛菜 F_v/F_m 具有明显抑制效应, 盐度 16 和 24 组与对照组相当; 暗紫红毛菜各高盐胁迫组的 F_v/F_m 从第 1 天开始显著低于对照组, 但到后期(6~7 d)与对照组间无显著差异。盐度胁迫对 2 种红毛菜的表现光合速率(P_n)影响显著, 尤其到后期(3 d 后), 多数实验组 P_n 均显著降低。红毛菜的呼吸耗氧速率(R_d)在胁迫早期的变化与 F_v/F_m 一致, 呈先下降后快速恢复到对照组水平; 暗紫红毛菜随胁迫时间的延长, 胁迫组 R_d 呈上升趋势, 显著高于对照组。高浓度(200~500 $\mu\text{mol/L}$)钒酸钠胁迫 3 d 后可显著抑制红毛菜 F_v/F_m , 暗紫红毛菜的 F_v/F_m 在钒酸钠胁迫 1 d 后呈下降趋势, 且下降幅度与钒酸钠胁迫程度正相关。整体上, 随着钒酸钠浓度增加, 低盐、高盐胁迫分别加重红毛菜和暗紫红毛菜的 F_v/F_m 和 P_n 的抑制效应。而 R_d 随胁迫程度的增加而升高, 在暗紫红毛菜中尤为明显。研究表明, 红毛菜和暗紫红毛菜对盐度胁迫可作出快速响应, 其呼吸作用的增强及对质膜- H^+ -ATPase 的调控, 可能在应对盐度胁迫时发挥重要作用, 而较长时间盐度胁迫对 2 种红毛菜的光合作用均产生不可逆影响。

关键词 红毛菜; 盐度; 钒酸钠; PS II 原初光能转化效率; 表现光合速率; 呼吸耗氧速率
中图分类号 S968.43 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0017-09

红毛菜属(*Bangia lyngbye*)分布广泛, 几乎遍布亚寒带及亚热带等地(Woolcott *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003; 汪文俊等, 2008), 兼具海水和淡水种类。红毛菜(*Bangia fuscopurpurea*)为典型海水种, 一般生长在

风浪较大的高潮带岩石上; 暗紫红毛菜(*Bangia atropurpurea*)为淡水种, 也是目前发现的唯一一个淡水红毛菜科(Bangiaceae)藻类(Wang *et al.*, 2018)。红毛菜具有较高的营养、药用和生态价值(黄文凤等, 1998;

* 国家自然科学基金项目(31672630)、国家重点研发计划(2018YFD0901500)、山东省农业良种工程(南种北繁)项目(2017LZN013)和现代农业产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672630), National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901500), Shandong Agricultural Good Seed (South to North) Project (2017LZN013), and China Agriculture Research System (CARS-50)]. 魏家慧, E-mail: 997427166@qq.com

① 通讯作者: 汪文俊, 研究员, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-06-28, 收修改稿日期: 2019-07-29

马家海等, 2002; 王翔宇等, 2011), 已成为继海带、紫菜、龙须菜之后在福建莆田养殖的代表性经济海藻之一。

不同于潮间带其他海藻(如紫菜), 红毛菜属红藻在数亿年演化过程中完成了海水种到淡水种的进化(Butterfield, 2000), 证明红毛菜拥有一套特殊的盐度适应机制。前期研究发现, 红毛菜在低盐胁迫初期, 质膜-H⁺-ATPase 基因的表达量呈快速上升趋势, 提示该酶在红毛菜响应盐度变化过程中起着关键的调节作用(曹原, 2018; Wang *et al.*, 2019)。质膜-H⁺-ATPase 是植物细胞质膜上最重要的酶类, 在植物抗逆过程中发挥积极作用。NaCl 处理使耐盐小麦根质膜-H⁺-ATPase 活性升高(Yang *et al.*, 2003)。盐胁迫过程中, 耐盐性芦苇愈伤组织质膜-H⁺-ATPase 蛋白量与对照组相比明显增多(Zhao *et al.*, 2004)。钒酸钠是质膜-H⁺-ATPase 的专一抑制剂, 在调控植物质膜-H⁺-ATPase 活性方面应用较为广泛。王小治等(2010)研究发现, 钒酸盐可显著抑制玉米根质膜-H⁺-ATPase 活性。朱志明等(2017)研究表明, 钒酸钠能显著抑制宁夏枸杞根系在盐胁迫下质膜-H⁺-ATPase 的活性, 从而改变细胞内外离子流向。

叶绿素荧光技术是研究植物光合作用和逆境生理的重要工具之一(Schreiber *et al.*, 1995)。目前, 叶绿素荧光技术在紫菜(姚春燕等, 2011; Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018)、鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)(梁洲瑞等, 2011)、铜藻(*Sargassum horneri*) (张玉荣等, 2009)等藻类胁迫机制研究中已有较多应用。PS II 原初光能转化效率(F_v/F_m)反映植物在充足的暗适应后, 所有 PS II 反应中心均处于开放状态时的量子产量, 是衡量植物光合完整性的指标之一(张守仁, 1999)。当植物遭遇外界胁迫时, F_v/F_m 值存在不同程度的下降, 表明 PS II 反应中心受到了不同程度的损伤。液相氧电极技术可以准确测得海藻实时的表观光合速率(P_n)及呼吸耗氧速率(R_d), 目前, 已广泛应用于藻类光合生理领域(姚海芹等, 2016; 张曼等, 2010; 马兴宇等, 2014)。

本研究采用叶绿素荧光技术和液相氧电极技术, 研究了红毛菜光合系统和质膜-H⁺-ATPase 对盐胁迫的响应, 旨在为揭示红毛菜盐胁迫响应机制、培育红毛菜抗逆优质品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及培养条件

暗紫红毛菜于2019年5月采自山西阳泉娘子关

(37°6'N、113°5'E), 红毛菜于2018年3月采自山东东营港(118°6'N、38°1'E)。取回后立即冲洗、晾干, 以去除表面附生杂藻及污泥, 灭菌海水和淡水分别作为红毛菜与暗紫红毛菜的培养液, 放入光照培养箱内暂养。暂养条件: 温度为15℃, 光照为40 μmol/(m²·s), 光周期为12 L: 12 D。培养液中添加2 mg/L NO₃⁻-N, 1 mg/L PO₄³⁻-P。培养适应3 d后进行盐胁迫实验。

1.2 实验方法

1.2.1 盐度对光合作用的影响 盐度对红毛菜和暗紫红毛菜 F_v/F_m 值的影响: 设置 5 个盐度组(括号中为相应处理的符号表示, 下同): 32(S₃₂)、24(S₂₄)、16(S₁₆)、8(S₈)和 0(S₀), 每组 3 个平行。培养 1 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 后, 测定 F_v/F_m (Eggert *et al.*, 2007)。测定方法: 取少量红毛菜于暗盒中, 对藻体进行 20 min 暗适应, 打开 IMAGING-PAM (WALZ, 德国), 设置测量光和光化光并选取待测位点, 进行测定。

盐度对红毛菜和暗紫红毛菜表观光合速率、呼吸耗氧速率值的影响: 盐度设置同上。培养 6 h、1 d、3 d、5 d、7 d 后, 用液相氧电极(Hansatech Oxygraph, 英国)测定样品的表观光合速率(P_n)和呼吸耗氧速率(R_d)。反应介质为灭菌海水和淡水, 光源为 500 W 碘钨灯, 通过控制灯的远近将光强控制在 40 μmol/(m²·s)。每个条件下反应稳定 5 min, 每次测试时间控制在 10 min 内, 取较为平滑曲线计算。由氧电极自带软件得出实验数据, 每个梯度设 3 次平行。

1.2.2 钒酸钠对 F_v/F_m 值的影响 设置 4 个钒酸钠浓度(括号中为相应处理的符号, 下同): 0(V₀)、50(V₅₀)、200(V₂₀₀)和 500 μmol/L(V₅₀₀), 每组实验设置 3 个生物学重复。培养 1 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 后, 测定红毛菜的 F_v/F_m 值。

1.2.3 盐度和钒酸钠对光合作用的影响 盐度和钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜 F_v/F_m 值的影响: 钒酸钠及盐度设置同上, 分别测定不同钒酸钠浓度处理液中, 各盐度胁迫下 2 种红毛菜的 F_v/F_m , 操作同上。

盐度和钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜表观光合、呼吸耗氧速率值的影响: 钒酸钠浓度为 500 μmol/L, 盐度设置及操作同上。

1.3 数据处理

采用 Excel 软件进行数据整理分析并绘制图形, 采用 SPSS 18.0 软件分别进行 *t* 检验、单因子方差

(One-way ANOVA)分析以及 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 盐度对红毛菜和暗紫红毛菜光合作用的影响

2.1.1 盐度对红毛菜和暗紫红毛菜 F_v/F_m 的影响

从图 1A 可以看出, 红毛菜在低盐胁迫 1h 时后, 各胁迫组 F_v/F_m 与对照组(S_{32})相比显著下降($P < 0.05$)。12 h 时, 各组间 F_v/F_m 无显著差异。一直到第 7 天, S_{16} 和 S_{24} 组 F_v/F_m 与对照组相比无显著差异, S_0 组 F_v/F_m 在 12 h~7 d 的胁迫期内呈直线下降趋势。在处

理过程中, S_8 组 F_v/F_m 出现较大波动, 1~3 d 线性下降, 低于对照组($P < 0.05$), 第 4 天时, 恢复到与对照组相当, 第 4~5 天又呈线性下降。

从图 1B 可以看出, 暗紫红毛菜在高盐胁迫 1 h 时, 各胁迫组 F_v/F_m 与对照组(S_0)均呈显著差异($P < 0.05$), 且与高盐胁迫程度正相关。6 h 时, 胁迫组 F_v/F_m 快速回升, 12 h 时, 与对照组相当。1~3 d 时, 各胁迫组与对照组相比, F_v/F_m 均显著下降。4~5 d 时, S_{32} 与 S_{24} 组出现较大波动, 第 5 天时, S_{32} 组显著低于对照组($P < 0.05$)。第 7 天时, 只有 S_{24} 组显著低于对照组($P < 0.05$), 其余各组均与对照组无显著差异($P > 0.05$)。

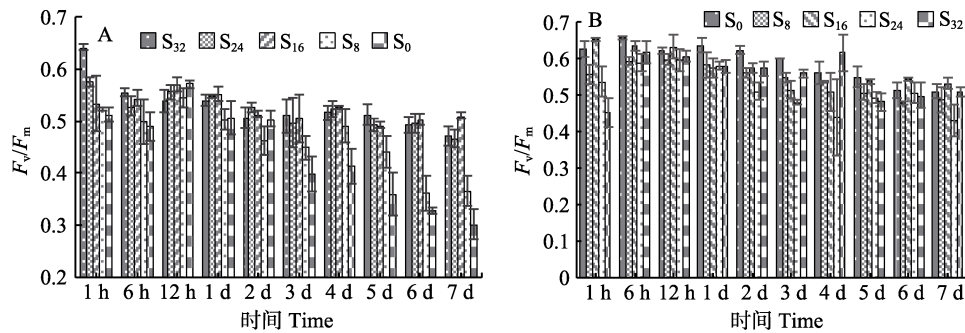


图 1 不同盐度处理后的红毛菜(A)和暗紫红毛菜(B)的 F_v/F_m
Fig.1 The F_v/F_m of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different salinities

2.1.2 盐度对红毛菜和暗紫红毛菜表观光合速率的影响

从图 2A 可以看出, 与对照组相比, 低盐胁迫使红毛菜 P_n 显著降低($P < 0.05$)。6 h 时, 各盐度组均显著低于对照组($P < 0.05$), 且 S_{24} 组显著低于其他各组($P < 0.05$); 第 1 天, S_{32} 、 S_{24} 、 S_{16} 和 S_8 胁迫组 P_n 上升($P < 0.05$), 第 3 天又显著下降($P < 0.05$); 在 6 h~3 d 中, S_0 组 P_n 呈线性下降($P < 0.05$), 而后在第 5 天时上升, 但仍低于对照组($P < 0.05$); 5~7 d 时, 各盐度组间 P_n 较稳定。

从图 2B 可以看出, 暗紫红毛菜中, 对照组 P_n 一直维持在较稳定水平。6 h 时, S_{16} 、 S_{24} 和 S_{32} 胁迫组 P_n 显著低于对照组($P < 0.05$), 且组间差异不显著($P > 0.05$), S_8 组明显高于对照组($P < 0.05$); 1 d 时, S_{16} 、 S_{24} 和 S_{32} 组 P_n 显著上升($P < 0.05$); 3~5 d 时又降低($P < 0.05$), 后维持较稳定水平, 显著低于对照组($P < 0.05$); 第 7 天时, S_{24} 组显著上升($P < 0.05$), 且各盐度胁迫组 P_n 显著低于对照组($P < 0.05$)。

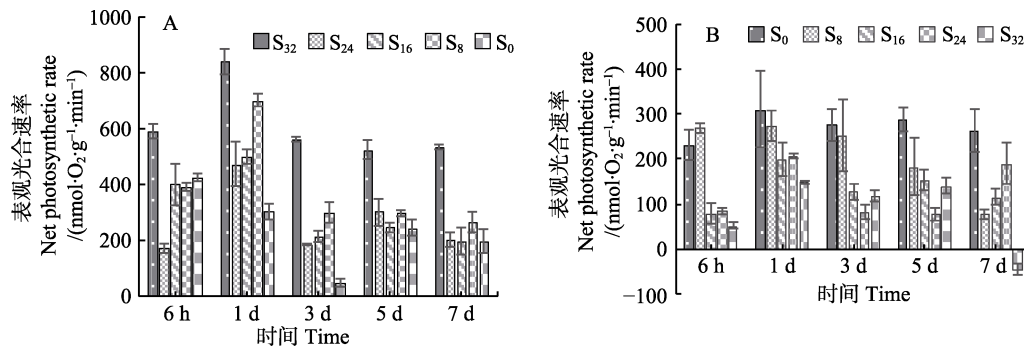


图 2 盐度对红毛菜(A)和暗紫红毛菜(B)表观光合速率的影响
Fig.2 The net photosynthetic rate of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different salinities

2.1.3 盐度对红毛菜和暗紫红毛菜呼吸耗氧速率的影响 从图 3A 可以看出, 红毛菜在胁迫 6 h 时, S_{16} 、 S_8 和 S_0 组显著低于对照组($P<0.05$); 1 d 时, 各盐胁迫组 R_d 上升, 仅 S_8 组显著低于对照组($P<0.05$); 5~7 d 时, 各胁迫组 R_d 显著低于对照组($P<0.05$)。

从图 3B 可以看出, 暗紫红毛菜在 6 h~1 d 时, S_8 、 S_{24} 与 S_{32} 组 R_d 显著低于对照组($P<0.05$), S_{16} 组与对照组相当; 3 d 时, S_{16} 组 R_d 降低, 显著低于对照组($P<0.05$); 3 d 时, 其余 3 组 R_d 上升; 到第 7 天时, 除 S_{16} 组与对照组无显著差异外, 其他胁迫组均显著

高于对照组($P<0.05$)。

2.2 钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜 F_v/F_m 的影响

从图 4A 可以看出, 红毛菜藻体培养 6 h, 对照组 (V_0) 相比, 仅 V_{200} 组 F_v/F_m 显著下降($P<0.05$), 3~7 d 时, V_{200} 与 V_{500} 组下降显著($P<0.05$)。前期, V_{50} 组与对照组无显著差异, 从第 6 天开始, V_{50} 组的 F_v/F_m 显著高于对照组。暗紫红毛菜(图 4B)除第 12 小时外, 各胁迫组与对照组相比, F_v/F_m 均显著下降($P<0.05$)。早期 (1~12 h), 各钒酸钠组之间无显著差异, 但从第 5 天开始, F_v/F_m 下降幅度与钒酸钠浓度成正比。

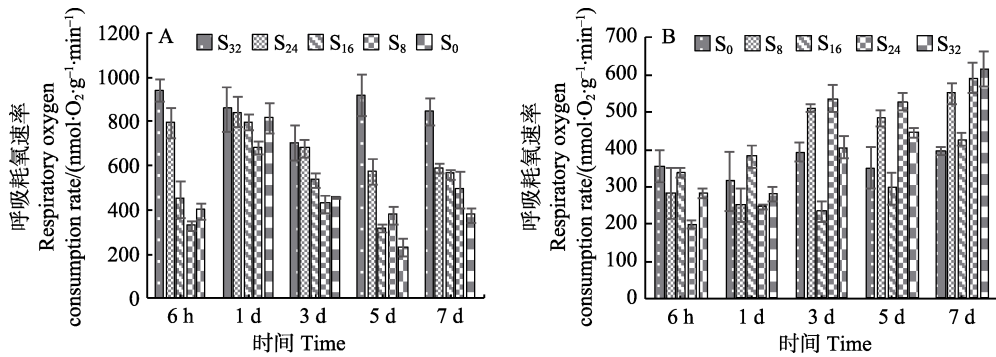


图 3 盐度对红毛菜(A)和暗紫红毛菜(B)呼吸耗氧速率的影响

Fig.3 The respiratory oxygen consumption rate of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different salinities

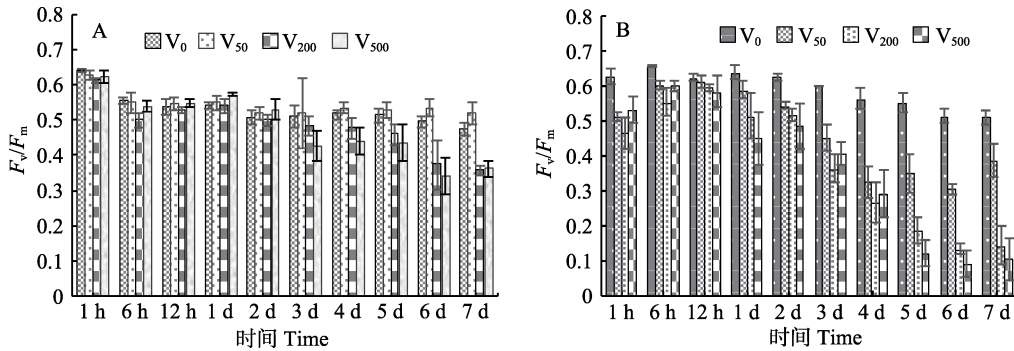


图 4 不同浓度钒酸钠处理后的红毛菜(A)和暗紫毛菜(B) F_v/F_m 值

Fig.4 The F_v/F_m of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different Na_3VO_4 concentrations

2.3 盐度和钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜光合作用的影响

2.3.1 盐度和钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜 F_v/F_m 的影响 从图 5A~图 5D 可以看出, 红毛菜在低盐胁迫下, 早期(1~12 h)钒酸钠组的 F_v/F_m 与对照组相比, 差异不显著($P>0.05$), 有些钒酸钠浓度组比对照组高 ($P<0.05$)。随低盐胁迫程度的增加, 高钒酸钠浓度组对 F_v/F_m 影响显著($P<0.05$), 在 S_{24} 、 S_{16} 和 S_8 组胁迫下(图 5A~图 5C), 实验后期(4~7 d), V_{200} 和 V_{500} 钒酸钠胁迫组 F_v/F_m 下降明显, 均显著低于对照组 ($P<0.05$); V_{50} 组总体上与对照组差异不显著; S_0 组

中(图 5D), 随胁迫时间的延长(3~7 d), V_{50} 和 V_{200} 组 F_v/F_m 显著高于对照组($P<0.05$), 且与钒酸钠浓度正相关, 而 V_{500} 组下降趋势明显($P<0.05$)。

从图 5E~图 5H 可以看出, 暗紫红毛菜在 1 h 时, 除 S_{16} 组, 其他高盐胁迫组、高浓度钒酸钠(V_{200} 和/或 V_{500})组, F_v/F_m 显著高于对照组。6~12 h 时, 高盐胁迫组 F_v/F_m 总体上明显上升, 随后, F_v/F_m 呈不同程度下降: S_{16} 和 S_8 组中(图 5E~图 5F), 从第 3 天或第 4 天开始, 各钒酸钠组 F_v/F_m 明显下降, 显著低于对照组($P<0.05$), 且高浓度钒酸钠组的下降幅度显著增大($V_{200} \approx V_{500} < V_{50}$); S_{24} 组中(图 5G), 2~3 d 时, V_{500}

组显著高于对照, 5 d 后, 所有钒酸钠组 F_v/F_m 均显著低于对照组($P<0.05$), 但不同钒酸钠浓度组间不成线性关系; S_{32} 中(图 5H), 从第 1 天开始, 各钒酸钠

组与对照组相比差异不显著; 第 4 天, 各钒酸钠组显著低于对照组, 随后, 仅 V_{500} 组显著低于对照组, V_{50} 和 V_{200} 组与对照组间无显著差异($P<0.05$)。

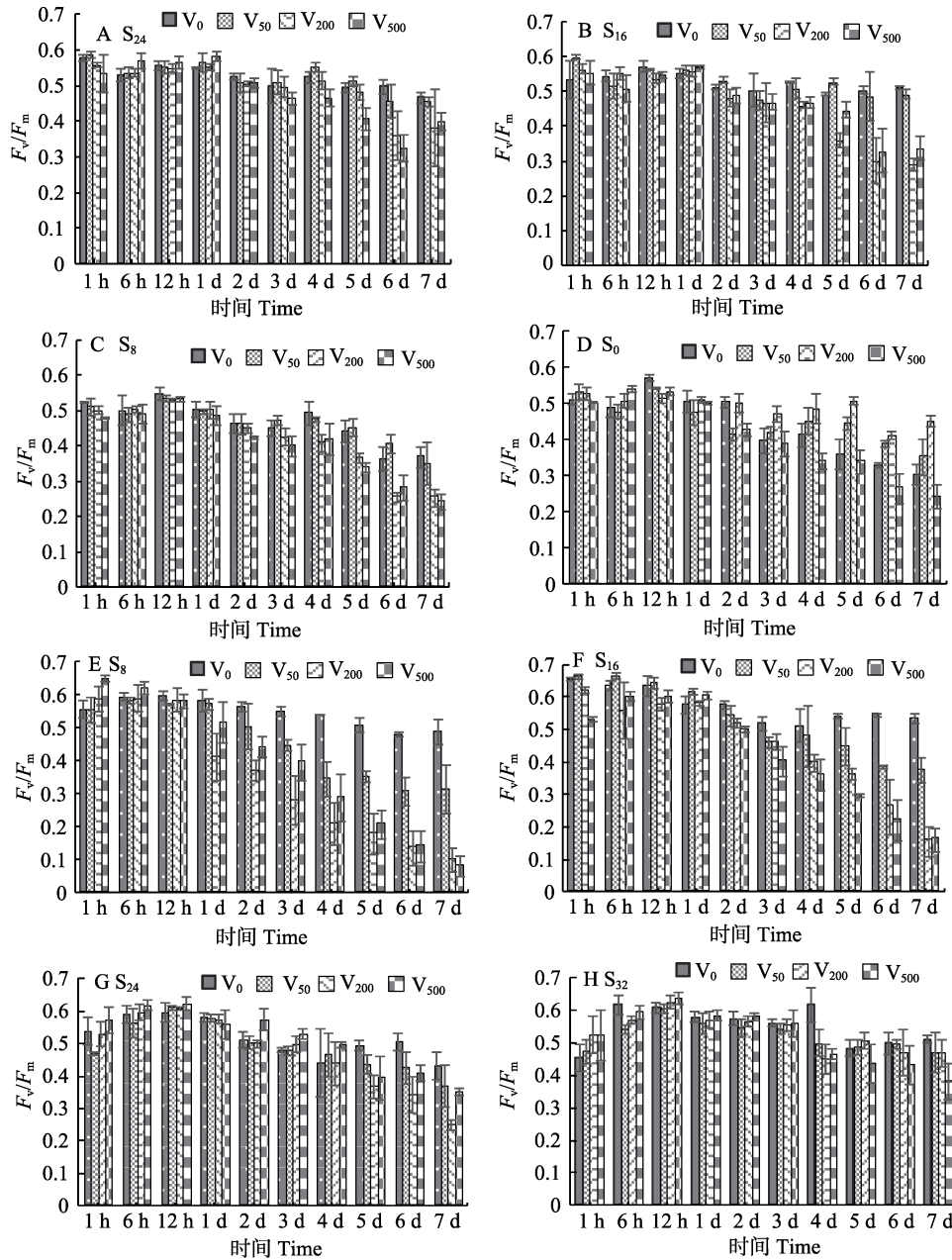


图 5 不同盐度和钒酸钠处理后红毛茛(A~D)和暗紫红毛茛(E~H)的 F_v/F_m

Fig.5 The F_v/F_m of *B.fuscopurpurea* (A~D) and *B.atropurpurea* (E~H) at different Na_3VO_4 concentrations and salinities

2.3.2 盐度和钒酸钠对红毛茛和暗紫红毛茛表观光合速率的影响 从图 6A 可以看出, 红毛茛在 500 $\mu\text{mol/L}$ 钒酸钠胁迫 6 h 时, S_{24} 和 S_{16} 组显著低于对照组(S_{32}) ($P<0.05$), 其他 2 组显著高于对照组 ($P<0.05$); 第 1 天时, S_{24} 、 S_{16} 和 S_8 组 P_n 显著上升, 高于对照组($P<0.05$); 3~7 d 时, S_8 组与对照组相当,

甚至高于对照组; 第 7 天时, 仅 S_0 组显著低于对照组及其他胁迫组($P<0.05$)。

从图 6B 可以看出, 暗紫红毛茛在实验过程中, 对照组 P_n 波动较大, 呈先上升后下降的趋势。6 h 时, S_8 组与对照组相当, 其他高盐胁迫组均显著低于对照组($P<0.05$); 1 d 时, S_0 、 S_8 、 S_{16} 和 S_{24} 组 P_n 显著上

升($P<0.05$), 1~3 d时, 各胁迫组 P_n 较稳定, 显著低于对照组($P<0.05$); 第5天, 各胁迫组显著高于对照

组($P<0.05$); 7 d时, S_{16} 和 S_{32} 组与对照组相当, 均为负值。

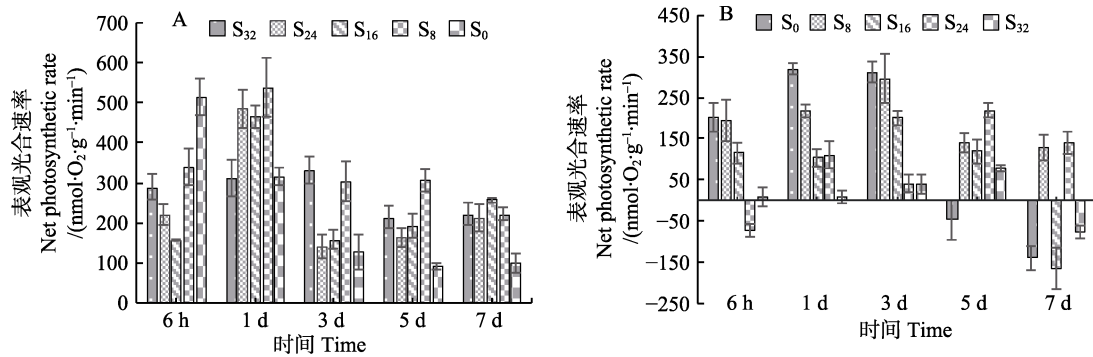


图6 盐度、钒酸钠对红毛菜(A)和暗紫红毛菜(B)表观光合速率的影响

Fig.6 The net photosynthetic rate of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different salinities with Na_3VO_4

2.3.3 盐度和钒酸钠对红毛菜和暗紫红毛菜呼吸耗氧速率的影响 在 $500 \mu\text{mol/L}$ 钒酸钠中, 红毛菜(图7A)在6h时, S_{24} 组 R_d 高于对照组, 其他低盐组与对照组相当或略低于对照组; 1 d时, S_{24} 和 S_{16} 组显著高于对照组($P<0.05$); 3 d时, S_0 组 R_d 上升显著, 高于对照组($P<0.05$)。5 d时, 低盐(S_{16} 、 S_8 和 S_0 组)胁迫组均显著下降, 明显低于对照组($P<0.05$)。培养第7天时, 除 S_{24} 组高于对照组外, 其他各组间差异不显著。

从图7B可以看出, 暗紫红毛菜在6h时, 各胁迫组 R_d 值显著高于对照组(100%淡水) ($P<0.05$); 1 d时, 对照组 R_d 略有上升, 除 S_{32} 组外, 其余胁迫组 R_d 显著低于对照组($P<0.05$); 3 d时, S_{24} 和 S_{32} 组 R_d 直线上升, 显著高于对照组及其他2组($P<0.05$); 5~7 d时, 对照组 R_d 值较稳定, 除 S_{16} 组外, 其他胁迫组均显著高于对照组($P<0.05$), 且第7天时, 胁迫组间差异不显著。

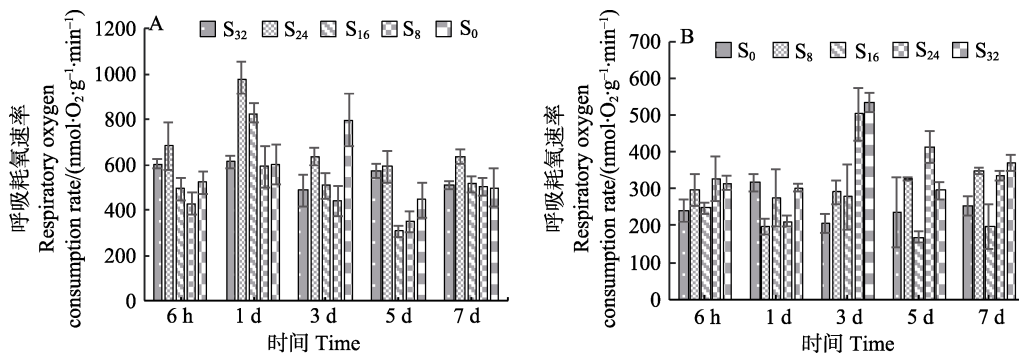


图7 盐度、钒酸钠对红毛菜(A)和暗紫红毛菜(B)呼吸耗氧速率的影响

Fig.7 The respiratory oxygen consumption rate of *B. fuscopurpurea* (A) and *B. atropurpurea* (B) at different salinities with Na_3VO_4

3 讨论

叶绿素荧光参数可反应光合作用的强弱(Anderson *et al.*, 1987), 可以作为生物遭遇外界胁迫时的环境传感器(Pfannschmidt, 2003; Bräutigam *et al.*, 2010)。本研究发现, 红毛菜在低盐、暗紫红毛菜在高盐胁迫下, F_v/F_m 均快速下降(1 h), 下降幅度与胁迫程度正相关。随胁迫时间的延长, 低盐胁迫(S_0 和 S_8 组)对红毛菜的 F_v/F_m 具有明显抑制效应, 其他胁迫组与对照组相当; 在暗紫红毛菜中, 各高盐胁迫组 F_v/F_m 从第1天开始显

著低于对照组, 但到后期(6~7 d), 全海水培养与对照组(S_0)相比没有差异, 可见高度低盐胁迫对红毛菜光合作用影响较大, 暗紫红毛菜对海水有较强适应能力。

当植物应对逆境胁迫时, 最先作出反应的是质膜及其功能蛋白(Gong *et al.*, 2002)。质膜- H^+ -ATPase 在细胞离子稳态的建立和维持过程中起着巨大作用, 其活性的变化是植物受伤害的原初位点。钒酸盐常被用作质膜- H^+ -ATPase 的特异性抑制剂(Cantley *et al.*, 1977、1978), 其作用位点位于 ATPase 的磷酸酶结构域(Serrano, 1989; De Michelis *et al.*, 1986)。彭建新等

(2000)研究发现, 钒酸钠可以显著抑制杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 细胞的光合放氧速率, 使其生长速率明显降低(魏亮等, 2006)。同时, 钒酸盐可显著降低甜土植物 (*Glycophytes*) 与盐生植物 (*Halophytes*) 的 F_v/F_m (Percey *et al.*, 2016)。质膜-H⁺-ATPase 基因在红毛菜遭受胁迫时, 表达量明显上升(曹原, 2018)。本研究中, S₀ 组的红毛菜与 S₃₂ 处理组的暗紫红毛菜, 在钒酸钠胁迫下, F_v/F_m 值的变化与其他组明显不同(图 1)。从研究结果来看, 50~200 μmol/L 钒酸钠提高了红毛菜对低盐胁迫的耐受性, 钒酸钠本身是一种钠盐, 而 Na⁺ 是藻类应对盐胁迫时的关键离子(Balnokin *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1999), 在淡水中加入适量钒酸钠, 提高了环境中的 Na⁺ 浓度, 从而缓解了低盐胁迫效应。同理, 向淡水中添加钒酸钠增加了 Na⁺ 浓度, 导致暗紫红毛菜在对照组(S₀)中的 F_v/F_m 随钒酸钠浓度的增加直线下降。而在高盐胁迫下的暗紫红毛菜, 启动了一系列高盐胁迫响应机制, 此时, 加入中等程度的钒酸钠, 对其在高盐环境下的影响反而不显著。

基于盐胁迫下红毛菜 F_v/F_m 以及盐胁迫下海水红毛菜质膜-H⁺-ATPase 基因的表达特征, 进一步检测了采用质膜-H⁺-ATPase 的特异性抑制剂钒酸钠处理后, 红毛菜的光合作用与呼吸作用的变化情况。结果显示, 红毛菜在低盐胁迫下, P_n 与 R_d 总体低于对照组, 可能是盐胁迫导致植物叶绿素降解, 从而降低叶绿体对光能的吸收, 影响光能在 2 个光系统间的合理分配, 从而降低光合速率(Aro *et al.*, 1993; 惠红霞等, 2004)。实验后期, 红毛菜各胁迫组 P_n 与 R_d 较为恒定, 组间差异不显著; 暗紫红毛菜各胁迫组 R_d 在 1~7 d 中均有不同程度的上升(图 3)。可能原因是呼吸作用为植物生命活动提供能量, 而植物通过调节自身生理状态来适应或抵抗盐胁迫等一系列过程需要消耗大量能量, 因此, 盐胁迫下暗紫红毛菜的呼吸强度增加。

在添加 500 μmol/L 钒酸钠后, 2 种红毛菜 P_n 与 R_d 在实验前期均出现不同幅度上升, 随后, 各组有不同程度下降, 与 F_v/F_m 结果类似。红毛菜在中等程度盐胁迫下, 早期 P_n 甚至高于对照组, 可能是因为 Na⁺ 缓解了红毛菜的低盐胁迫效应; 随胁迫时间的延长, 各胁迫组 P_n 显著下降, 第 7 天时, 仅 S₀ 组显著低于其他各组。 R_d 则波动较大(图 7), 实验后期, 各组总体处于同一水平。而暗紫红毛菜在 500 μmol/L 钒酸钠胁迫下, 对照组 P_n 从第 5 天开始直线下降, 胁迫组 R_d 在第 3 天时, 上升幅度与低盐胁迫程度基本呈正相关, 后期 P_n 与 R_d 均出现胁迫组高出对照组现象。说明红毛菜在正常环境中, 钒酸钠抑制了质膜-H⁺-ATPase 活性, 从而降低了藻体光合呼吸速率。当红

毛菜或暗紫红毛菜应对低盐或高盐胁迫时, 出现少数胁迫组 P_n 或 R_d 升高现象, 原因可能是逆境促使质膜-H⁺-ATPase 基因表达上调, 质膜-H⁺-ATPase 活性上升, 超出钒酸钠可调控范围, 对此有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- Anderson JM, Evans PK, Goodchild DJ. Immunological cross-reactivity between the light-harvesting chlorophyll a/b-proteins of a marine green alga and spinach. *Physiologia Plantarum*, 1987, 70(4): 597-602
- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM. Photoinhibition and D1 protein degeradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiology*, 1993, 103(3): 835-843
- Balnokin Y, Popova L, Gimmler H. Further evidence for an ATP-driven sodium pump in the marine alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis*. *Journal of Plant Physiology*, 1997, 150(3): 264-270
- Bräutigam K, Dietzel L, Kleine T, *et al.* Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, 21(1): 2715-32
- Butterfield NJ. *Bangiomorpha pubescens* n. gen. n. sp.: Implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology*, 2000, 26(3): 386-404
- Cantley LCJ, Cantley LG, Josephson L. A characterization of vanadate interactions with the (Na, K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(20): 7361-7368
- Cantley LCJ, Josephson L, Warner R, *et al.* Vanadate is a potent (Na, K) -ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252(21): 7421-7423
- Cao Y. Study on genetic breeding and functional gene in *Bangiaceae*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [曹原. 红毛菜科红藻的遗传育种与功能基因研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- De Michelis MI, Spanswick RM. H-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology*, 1986, 81(2): 542-547
- Eggert A, Nitschke U, West JA, *et al.* Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 343(2): 176-186
- Gong YH, Gao JF. Recent approach of functional proteins in plant plasma membrane (PM) under drought stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(3): 682-692
- Huang WF, Huang JM, Dong FQ, *et al.* Value and characteristics of the nutrient elements *Bangia fuscopurpurea*. *Marine Fisheries Research*, 1998, 19(2): 57-61 [黄文凤, 黄建明, 董飞强, 等. 红毛菜的营养成分特征和价值. 海洋水产研究, 1998, 19(2): 57-61]
- Hui HX, Xu X, Li SM. Possible mechanism of inhibition on photosynthesis of *Lycium barbarum* under salt stress.

- Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(1): 5–9 [惠红霞, 许兴, 李守明. 盐胁迫抑制枸杞光合作用的可能机理. 生态学杂志, 2004, 23(1): 5–9]
- Li XL, Wang WJ, Liu FL, *et al.* Periodical drying or no drying during aquaculture affects the desiccation tolerance of a sublittoral *Pyropia yezoensis* strain. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(1): 1–9
- Liang ZR, Wang FJ, Sun XT, *et al.* Effects of light intensity, temperature and salinity on newborn branches of *Sargassum thunbergii* evaluated with chlorophyll fluorescence assay. Marine Sciences, 2011, 35(12): 21–27 [梁洲瑞, 王飞久, 孙修涛, 等. 利用叶绿素荧光技术揭示光照、温度和盐度对鼠尾藻嫩芽的影响. 海洋科学, 2011, 35(12): 21–27]
- Ma JH, Li SJ, Ji HH, *et al.* An analysis of amino acids and fatty acids in *Bangia*. Chinese Journal of Marine Drugs, 2002, 21(5): 40–42 [马家海, 李水军, 纪焕红, 等. 红毛菜的氨基酸和脂肪酸分析. 中国海洋药物, 2002, 21(5): 40–42]
- Ma XY, Liu FL, Liang ZR, *et al.* Effects of pH and salinity stress on photosynthesis and antioxidant system of *Sargassum thunbergii*. Journal of Shanghai Fisheries University, 2014, 23(2): 208–214 [马兴宇, 刘福利, 梁洲瑞, 等. pH 与盐度胁迫对鼠尾藻光合作用及抗氧化系统的影响. 上海海洋大学学报, 2014, 23(2): 208–214]
- Müller KM, Cole KM, Sheath RG. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: Chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. Phycologia, 2003, 42(3): 209–219
- Pfannschmidt T. Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. Trends in Plant Science, 2003, 8(1): 33–41
- Percey WJ, Mcminn A, Bose J, *et al.* Salinity effects on chloroplast PS II performance in glycophytes and halophytes1. Functional Plant Biology, 2016, 43(11): 1003–1015
- Peng JX, Wang GQ, Qian YQ, *et al.* Studies on photosynthetic properties of *Dunaliella salina* cells. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(1): 42–47 [彭建新, 王国强, 钱月琴, 等. 盐生杜氏藻细胞光合特性的研究. 水生生物学报, 2000, 24(1): 42–47]
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Ecological Studies, 1995, 100: 49–70
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, *et al.* A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. Journal of Experimental Botany, 1999, 50 (Special issue): 1023–1036
- Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1989, 40: 61–94
- Wang WJ, Shen ZG, Sun XT, *et al.* Photosynthetic response of *Bangia fuscopurpurea* (Bangiales, Rhodophyta) towards dehydration and hyposalinity. Biologia, 2018, 73(4): 1–5
- Wang WJ, Shen ZG, Sun XT, *et al.* De novo transcriptomics analysis revealed a global reprogramming towards dehydration and hyposalinity in *Bangia fuscopurpurea*, gametophytes (Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, 2019, 31(1): 637–651
- Wang WJ, Sun XT, Liu FL, *et al.* Effect of abiotic stress on the gametophyte of *Pyropia katadae* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, 2016, 28(1): 469–479
- Wang WJ, Wang GC, Xu P, *et al.* Biology of *Bangia* I. Life history and sexual reproduction. Marine Sciences, 2008, 32(4): 92–97 [汪文俊, 王广策, 许璞, 等. 红毛菜生物学研究进展 I. 生活史和有性生殖研究. 海洋科学, 2008, 32(4): 92–97]
- Wang XY, Zhan DM, Li MZ, *et al.* Preliminary studies on the nitrogen and phosphorus absorption capability of macroalgae. Marine Fisheries Research, 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]
- Wei L, Deng TT, Liu Y, *et al.* The Effects on Na⁺-export mechanisms in plasma membrane of *Dunaliella salina* caused by LiCl and orthovanadate. Journal of Sichuan University (Natural Science), 2006, 43(3): 677–681 [魏亮, 邓婷婷, 刘谊, 等. 钒酸钠和氯化锂对盐藻质膜排钠系统的影响. 四川大学学报(自然科学版), 2006, 43(3): 677–681]
- Woolcott GW, King RJ. *Porphyra* and *Bangia* (Bangiaceae, Rhodophyta) in warm temperate waters of eastern Australia: Morphological and molecular analyses. Phycological Research, 1998, 46(2): 111–123
- Wang XZ, Qian XQ, Shan YH, *et al.* Inhibitory effect of vanadate on plasma membrane H⁺-ATPase activity of corn roots. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science), 2010, 31(1): 65–69 [王小治, 钱晓晴, 单玉华, 等. 钒酸盐对玉米根质膜 H⁺-ATPase 的抑制机理研究. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2010, 31(1): 65–69]
- 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]
- Yao CY, Jiang HX, Zhu JY, *et al.* Effects of temperature stress on chlorophyll fluorescence characteristics of conchocelis in *Porphyra*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011(1): 277–282 [姚春燕, 姜红霞, 朱建一, 等. 温度胁迫对紫菜丝状体叶绿素荧光特性的影响. 江苏农业科学, 2011(1): 277–282]
- Yang YL, Zhang F, Zhang LX, *et al.* Effect of NaCl on the activity of the plasma membrane ATPase from wheat roots. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003, 23(3): 401–405
- Zhang SR. A discussion on Chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance. Chinese Bulletin of Botany, 1999, 16(4): 444–448 [张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 1999, 16(4): 444–448]
- Zhang M, Zeng B, Zhang Y, *et al.* Temperature affects the relation between photosynthetic electron transport and oxygen

evolution of algae. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(24): 7087–7091 [张曼, 曾波, 张怡, 等. 温度变化对藻类光合电子传递与光合放氧关系的影响. *生态学报*, 2010, 30(24): 7087–7091]

Zhang YR, Liu F, Shan TF, *et al.* Stress resistance of young seedlings of *Sargassum horneri* to a variety of temperatures, irradiances and salinities revealed by chlorophyll fluorescence measurements. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(2): 1–9 [张玉荣, 刘峰, 单体锋, 等. 利用叶绿素荧光技术揭示人工培育的铜藻幼苗对胁迫温度、光照和盐度的反应.

南方水产科学, 2009, 5(2): 1–9]

Zhao LQ, Zhang F, Guo JK, *et al.* Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology*, 2004, 134(2): 849–857

Zhu ZM, Mao GL, Xu X, *et al.* Effect of salt stress and inhibitor on uptake and transportation of Na^+ and K^+ in the root of Ningxia *Lycium barbarum* L. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, 35(6): 140–145 [朱志明, 毛桂莲, 许兴, 等. 盐胁迫下宁夏枸杞根系 Na^+ 、 K^+ 平衡及抑制剂对其影响的研究. *干旱地区农业研究*, 2017, 35(6): 140–145]

(编辑 陈 辉)

Effects of Salinity and Na_3VO_4 Stress on Photosynthetic Physiology of *Bangia*

WEI Jiahui^{1,2}, LI Xiaolei², MA Deying², WANG Wenjun^{2,3①}, LIANG Zhouhui^{2,3},
LI Guoliang^{1,2}, LIU Fuli^{2,3}, SUN Xiutao^{2,3}, WANG Feijiu²

(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)

Abstract The effect of salinity and Na_3VO_4 on photosynthesis of *Bangia fuscopurpurea* and *Bangia atropurpurea* was investigated, respectively, to investigate the photosynthetic physiology of *Bangia*, using chlorophyll II fluorescence and photosynthetic oxygen evolution measurements. The main results were as follows: The conversion efficiency of primary light energy of PS II (F_v/F_m) of *B. fuscopurpurea* declined rapidly in salinity conditions lower than natural seawater while that of *B. atropurpurea* declined in salinity higher than freshwater, and the decrease was positively related to the level of stress. The F_v/F_m of *B. fuscopurpurea* was significantly inhibited under salinity 0 and 8 after 3 days of hyposaline treatment. No significant difference was seen among the different hyposalinity-stressed groups of *B. fuscopurpurea*. The F_v/F_m of *B. atropurpurea* under hypersaline stress was significantly lower than that of the control from the first day, and recovered to control levels after 6 or 7 days of hypersaline treatment. Saline stress had significant effects on net photosynthetic rate (P_n) in both *Bangia* species. Respiratory oxygen consumption rate (R_d) decreased at the early stage and then rapidly recovered to the level of the control on the first day. After 1 day, R_d of the hyposalinity-stressed *B. fuscopurpurea* groups was significantly lower than the control. As the hypersalinity continued, R_d of the stressed *B. atropurpurea* increased and became significantly higher than the control. After 3 days, the F_v/F_m of *B. fuscopurpurea* decreased significantly under treatment with 200–500 $\mu\text{mol/L}$ Na_3VO_4 . The decrease of F_v/F_m in *B. atropurpurea* with Na_3VO_4 treatment was positively correlated with Na_3VO_4 concentration. In general, with an increase in Na_3VO_4 concentration, the salinity stress had significant inhibitory effect on the F_v/F_m and P_n of *Bangia*. R_d of both *B. fuscopurpurea* and *B. atropurpurea* increased with stress, an effect that was more obvious in *B. atropurpurea*. The present results reveal that both marine and freshwater *Bangia* respond quickly to saline stress. The enhancement of R_d and regulation of plasma membrane- H^+ -ATPase may play an important role in response to saline stress. Long-term saline stress had irreversible harmful effects on photosynthesis in *Bangia*.

Key words *Bangia*; Salinity; Sodium orthovanadate; Conversion efficiency of primary light energy of PS II; Net photosynthetic rate; Respiratory oxygen consumption rate

① Corresponding author: WANG Wenjun, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190416001

http://www.yykxjz.cn/

周丹, 苏泳霖, 钟如卓, 郭志诚, 邬婧, 郑哲, 王庆恒. 光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆及其在全组织和卵母细胞中的表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 150–159

Zhou D, Su YL, Zhong RZ, Guo ZC, Wu J, Zheng Z, Wang QH. Molecular cloning and expression analysis of *HSP90* of peanut worm *Sipunculus nudus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 150–159

光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆 及其在全组织和卵母细胞中的表达分析*



周 丹 苏泳霖 钟如卓 郭志诚 邬 婧 郑 哲^① 王庆恒

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

摘要 热休克蛋白 *Hsp90* 在蛋白质正确折叠、胞内物质运输、细胞增殖调控、配子发生等过程中发挥重要的作用。本研究利用 RACE 技术克隆获得了光裸星虫热休克蛋白 *Hsp90* (*SnHsp90*) cDNA 全长序列。*SnHsp90* 全长 3110 bp, 其中, 3'UTR 为 582 bp, 5'UTR 为 72 bp, 开放阅读框为 2456 bp, 编码 818 个氨基酸。序列分析结果显示, *SnHsp90* 蛋白具有 1 个信号肽, 存在 B 型 *Hsp90* 的 3 个标签序列 FLREL、IGQFGVGFYS、LPLNVSRE 以及保守模块 GxxGxG, 表明 *SnHsp90* 属于 *Hsp90B* 亚族。与其他物种的 *Hsp90* 氨基酸序列比对发现, *SnHsp90* 与鸭嘴海豆芽(*Lingula anatine*) *Hsp90* 相似度最高, 为 77.72%。三维结构建模发现, *Hsp90* 在不同物种之间的空间构象具有较高保守性。系统进化树分析显示, *SnHsp90* 先与小头虫(*Capitella teleta*)、水蛭(*Helobdella robusta*)等环节动物的 *Hsp90* 聚为一支, 再与鸭嘴海豆芽等其他无脊椎动物聚为一大支, 而脊椎动物聚为另一大支, 表明 *SnHsp90* 与小头虫 *Hsp90* 亲缘关系最近。RT-PCR 结果显示, *SnHsp90* 在光裸星虫的体壁、收吻肌、肾管等组织中均有表达。*SnHsp90* 也可在卵母细胞不同发育时期表达, 其中, 在卵黄旺盛合成前期(Egg2)和外排卵母细胞期(Egg6)显著高表达($P < 0.05$), 暗示, *SnHsp90* 可能参与到光裸星虫卵母细胞的蛋白质正确折叠、卵黄合成与环境抗逆等过程。研究结果为进一步探究光裸星虫卵母细胞发育的分子机制积累了基础资料。

关键词 光裸星虫; 热休克蛋白 *Hsp90*; 基因克隆; 表达分析; 卵母细胞

中图分类号 Q959.19 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0018-10

热休克蛋白(Heat shock proteins, Hsps)是目前研究最为广泛的应激蛋白之一, 可在各种环境胁迫下诱导大量表达; 在正常环境条件下, 细胞内也存在丰富的 Hsps; 根据分子量大小, Hsps 可以分为 *Hsp110s*、*Hsp90s*、*Hsp70s*、*Hsp60s* 和小分子量 Hsps 等多个家

族(Lindquist *et al*, 1988)。其中, *Hsp90* 是一类进化上高度保守的重要细胞内伴侣蛋白, 在正常情况约占细胞溶质蛋白总量的 1%~2%(Lai *et al*, 1984), 具有辅助蛋白质正确折叠、胞内物质运输、细胞增殖调控等重要功能(McClellan *et al*, 2007)。此外, *Hsp90* 在配子

* 广东省科技计划(2016A020209010; 2017A030303075)和广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目(CXXL2018049)共同资助 [This work was supported by Science and Technology Plan of Guangdong Province (2016A020209010; 2017A030303075), and Guangdong Ocean University Undergraduates Innovation and Entrepreneurship Training Program (CXXL2018049)]. 周 丹, E-mail: 1334285134@qq.com

^① 通讯作者: 郑 哲, E-mail: haidazhengzhe@163.com

收稿日期: 2019-04-16, 收修改稿日期: 2019-06-04

发生中也具有重要功能。例如, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞的 *Hsp90* 可通过磷酸化稳定 c-Mos 蛋白, 并依赖丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径影响成熟促进因子(Maturation-promoting Factor, MPF)的合成(朱建安, 2007)。在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)卵母细胞中, *Hsp90* 与雌激素受体(Estrogen receptor, ER)共同作用, 激活或增强卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)等靶基因的转录(Wu *et al.*, 2008)。

光裸星虫(*Sipunculus nudus*)又名裸体方格星虫, 俗称沙虫, 主要栖息于暖水性海滨潮间带, 在我国华南沿海资源量较为丰富(李凤鲁等, 1990; Li *et al.*, 2017), 其味道鲜美, 含有大量谷氨酸、天冬氨酸等呈味氨基酸, 具有很高的市场价值(罗少杰等, 2016)。近年来, 光裸星虫逐渐成为广东湛江、广西北海等北部湾沿岸地区养殖新热点, 但苗种短缺制约了产业发展。目前, 关于光裸星虫繁殖生物学研究主要在形态学方面, 尚未开展分子机制研究。如, 王庆恒等(2017)报道了光裸星虫卵子发生的超微结构, 建立了卵母细胞粒径、超微结构和发育阶段的对应关系; 张家炜等(2018a)观察了光裸星虫胚胎和幼体发育的超微结构。光裸星虫体腔液中有大量生殖细胞游离发育, 但直接解剖获取的卵母细胞不具备受精能力。解析卵母细胞成熟机制, 有助于建立卵母细胞体外促熟技术, 从而提高光裸星虫苗种产量, 促进产业发展。作者所在课题组已构建了不同发育阶段卵子的转录组文库, 分析表明, *Hsp90* 在卵母细胞中表达量较高, 可能在卵母细胞发育过程中起着重要作用(未发表)。

本研究通过 RACE 技术获得 *SnHsp90* 的 cDNA 全长, 并对其序列结构、不同组织及不同卵子发育时期的表达模式进行分析, 以探究 *SnHsp90* 在光裸星虫卵母细胞发育中的作用, 为认识光裸星虫卵母细胞发育的分子机制积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用光裸星虫于 2018 年 6 月采集自广东省湛江市草潭镇潮间带, 取钻沙有力、体壁无伤的雌性虫体用于实验, 体重为(12.92±1.68) g。

灭菌海水清洗虫体表面砂砾后, 用 2 ml 注射器抽取少量体腔液, 镜检分辨雌雄。取 30 尾雌虫, 每尾抽取 2 ml 体腔液, 分别置于 5 ml 离心管中冰浴静置 5 min, 卵母细胞沉降到管底, 上层悬浮液中则含有各类血细胞、卵原细胞等。弃悬浮液, 在沉淀中加入 RNA Later 吹打混匀, 冰浴静置 5 min, 弃上清液,

再次加入 RNA Later 吹打混匀。将获得的卵母细胞悬浮液全部置于 50 ml 烧杯中混合, 逐次使用 100、150 和 300 目的细胞筛进行分级分离, 结合王庆恒等(2017)工作, 获得的各级卵母细胞的直径及发育时期分别为: Egg1 (<48 μm, 卵黄形成初期)、Egg2 (48~108 μm, 卵黄旺盛合成前期)、Egg3 (108~150 μm, 卵黄旺盛合成后期)和 Egg4 (>150 μm, 成熟期)(图 1)。

解剖雌虫, 如果肾管充盈, 即用过滤海水清洗肾管表面, 将肾管游离端轻轻放入 2 ml 离心管中, 用解剖针刺破肾管收集卵母细胞, 加入 RNA Later 吹打混匀。本研究共获得 30 尾雌虫肾管中的卵母细胞, 混合后作为样品 Egg5 (肾管发育时期)。另取 30 尾雌虫, 阴干刺激后放入过滤海水中促使排卵, 用 100 目筛绢网捞取水体中的外排卵母细胞, 加入 RNA Later 吹打混匀作为样品 Egg6 (外排卵母细胞)。

解剖取 9 尾雌虫取体壁(M)、肠道(I)、收吻肌(Rm)、肾管(Ne)组织以及体腔液细胞(Co), 液氮速冻, 并转移至-80℃冰箱保存, 用于 RNA 提取。

1.2 *SnHsp90* 基因全长 cDNA 克隆

总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成参照赖卓欣等(2019)的方法进行。根据本课题组前期光裸星虫转录组数据中 *Hsp90* 的部分序列, 利用 Primer premier 6.0 软件设计引物(表 1)。

采用巢式 PCR 扩增 *SnHsp90* 3'UTR 和 5'UTR, PCR 产物利用 1%琼脂糖电泳检测, 产物与载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化至 DH5α 感受态细胞, 并在固体氨苄选择培养基上培养 12 h。挑取阳性单克隆菌落进行 PCR 检测, 合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 *SnHsp90* 序列分析

利用 DNAMAN 8 对测序结果进行拼接, 获得 *SnHsp90* 全长。采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)预测 *SnHsp90* 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)以及蛋白质氨基酸序列。利用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行理化性质及二级结构预测。ProtComp 9.0(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>)进行蛋白亚细胞定位。NCBI Blast 在线分析工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性、一致性分析。Phyler2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyler2/html/page.cgi?id=index>)预测蛋白三级结构。smart 进行保守结构域预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。MEME (<http://meme-suite.org/index.html>)进行 motif 挖掘。使用 Mega X 构建生物系统进化树。

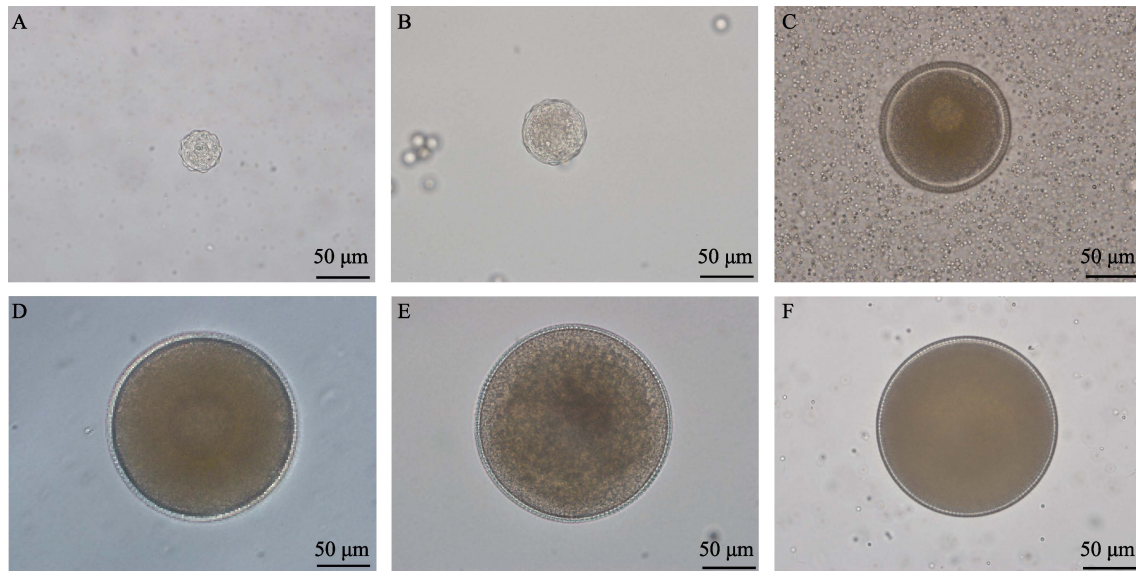


图1 光裸星虫不同时期卵母细胞形态

Fig.1 Oocytes of *S. nudus* at different developmental stages

A: 卵黄形成初期(Egg1); B: 卵黄旺盛合成前期(Egg2); C: 卵黄旺盛合成后期(Egg3);

D: 成熟期(Egg4); E: 肾管发育时期 (Egg5); F: 外排卵母细胞(Egg6)。图8同

A: Oocyte in beginning of yolk synthesis; B: Oocyte in early stage of vigorous yolk synthesis; C: Oocyte in late stage of vigorous yolk synthesis; D: Oocyte in mature stage; E: Oocytes in the nephridioduct; F: Excretive oocyte. The same as Fig.8

表1 *SnHsp90* 基因克隆及荧光定量的引物序列Tab.1 Primer sequence used in the cloning and real-time PCR of *SnHsp90* gene

引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
5'-outer	CTCCTTCTGCTCCTCCTCATC	5'RACE
5'-inner	GCTCTTCTGTTGCTGATAATGC	5'RACE
3'-outer	ACTCTCCGCTCTGGCTACT	3'RACE
3'-inner	GGAAGAGGAGGCTGGAGATG	3'RACE
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落 PCR Colony PCR
M13-R	AGCGATAACAATTTACACAGGA	菌落 PCR Colony PCR
qPCR-S	CTCTGATGACCTGCCACTGAA	荧光定量 Fluorescent quantitation
qPCR-A	TGTGCTCCTGCTTCTCCTTC	荧光定量 Fluorescent quantitation
60S-S	GACGAGACCAAGGCTACCAT	荧光定量(内参) Fluorescent quantitation (internal reference)
60S-A	TCAACAGAGACACGAGGAAGT	荧光定量(内参) Fluorescent quantitation (internal reference)

1.4 *SnHsp90* 差异表达分析

分别以 *TBP*(张家炜等, 2018b)和 *60s-L7*(筛选过程未发表)基因作为内参基因, 检测 *SnHsp90* 在成体不同组织及在不同发育时期卵母细胞的表达水平。反应体系: 上下游引物各 0.4 μ l, SYBR[®] Select Master Mix 5 μ l, cDNA 模板 0.4 μ l, 灭菌水 3.8 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *SnHsp90* 的相对表达量。通过 IBM SPSS Statistics 22 进行显著性分析(置信水平取 95%)。

2 结果与分析

2.1 *SnHsp90* 基因克隆及氨基酸序列

本研究利用 RACE 技术克隆获得光裸星虫 *SnHsp90* 基因 cDNA 序列, 全长 3110 bp, 其中, 5' UTR 为 72 bp; 3' UTR 为 582 bp, 开放式阅读框(ORF)长度为 2456 bp, 编码 818 个氨基酸。*SnHsp90* 同时具有 B 型 Hsp90(Hsp90B)的 3 个特征序列(FLREL、IGQFGVGFYS、LPLNVSRE)以及保守模块“GxxGxG”(图 2)。

```

1   cat gggacacaaact gggcagt gt t ggt gt ggaat t t cagacaggact ct gt ccgcact ccgagaaaaagaccATG
1   M
76  TCTCGAAATATCTTTCTAGGTCTCTAGGATTAGTATTATTAACAGCCTTGGCAGCAGAGAAGATGTACAG
2   S R K Y L F L G L L G L V L L T A L A A A E D V Q
151 ACAGACGAAGCGGACGCTGTAGTAGGAAGCATTGGTAAAAGCAGGGATGCTTCAAAAACAGACGATGAAGCA
27  T D E A D A V V E E D I G K S R D A S K T D D E A
226 GTACAAAGGGAGGAGGAAGCAATAAATAGATGGCTTAGTGTAGCCCAATGAAAGAATACGAGATAAAGCT
52  V Q R E E E A I K L D G L S V A Q M K E L R D K A
301 GAAAAACATACATTCCAAGCTGAAGTTGATCGTATGACGAAACTCATCAACTCTTTATATAAGAATAAGGAG
77  E K H T F Q A E V D R M T K L I I N S L Y K [N K E]
376 ATCTTCTTGAGAGAGTTGATATCCAACGCATCAGATGCTCTTGACAAGATTAGATTTTGTCTCTGACAGACA
102 I F L R E L I S N A S D A L D K I R F L S L T D K
451 AGTCGATTATCAGCAACAGAAGAGCTCTCTATAAAAATTAAGGCAGACAAGACAATCATGCTTCTGCATGTCATT
127 S A L S A T E E L S I K I K A D K D N H V L H V I
526 GATACTGGTATTGGCATGACCAAAGGGACCTTGTAAAT AACCTTGGTACCATCGCAAAATCTGGTACCAGTGA
152 D T G I G M T K R D L V N N L G T I A K S G T S E
601 TTCCTTCAGAACTTGGAAATGCTGCATCATCCAGGAGAGCAGTGTCTGATGGACAGTTGGTGTGGCTTT
177 F L Q K L G N A A S S Q E S S D L I G Q F G V G F
676 TACTTCTCTTCTTGTGGCCGACCGTGTGGTGTGACTTCCAAGCACAATGACGATGAGCAACACATCTGGGAG
202 Y S S F L V A D R V V V T S K H N D D E Q H I W E
751 TCTGACCCAACCTCTCTGTGACCCAGGATCCCGTGGCAACACCCTCGCCCTGGGAACCCAGATCAGCCTG
227 S D A N S F S V T Q D P R R G N T L G L G T Q I S L
826 CACCTGAAGGAGGAGGCCACGACTTCTGGAACAGCATACCATCAAGGAACCTGGTACAGAAGTACAGCCAGTTC
252 H L K E E A H D F L E Q H T I K E L V Q K Y S Q F
901 ATCAACTTCAACATCTACCTCTGGACAGCAAGACTGAGACAGTCGAGGACCTCTGGATGAGGAGGAGCAGAAG
277 I N F N I Y L W D S K T E T V E E P L D E E E Q K
976 GAGGCTGAGGAAGAT AAGTGGAGGATGAT AAAGAAGATGAGGATGATGAGGATGGAAAGGTTGAGGAGGAGG
302 E A E E D K V E D D K E D E D D E D G K V E E E E
1051 GACAAACAAAGACCAAGAAAGTGGAGAAGACTGTGTGGACTGGTCTCTGTCAACGACAAACAACTCTGG
327 D K P K T K K V E K T V W D W V L V N D N K P L W
1126 ACCAGAAAGCCAGCTGACATTACAGATGATGAATACAGTGAATTCTACAATTCATCACACGTGACCATGATGAG
352 T R K P A D I T D D E Y S E F Y N S F T R D H D E
1201 CCTTTGGCCAAGCCACTTCACAGCTGAGGGAGAAGTGAATTCAGTCTATCCTGTTATCCCAAGACCTCA
377 P L A K T H F T A E G E V T F K S I L F I P K T S
1276 CCCTCCGACATGTTCCACCCTACGGCAAGAAGACTGATATGATCAAGTGTACGTGCGACGTGTCTTACACC
402 P S D M F H H Y G K K T D M I K M Y V R R V F I T
1351 GACAACCTCGAAGACATGATGCCAAGTACCTTTCTTTTGTCTGGAGTGGTGACTCTGATGACCTGCCACTG
427 D N F E D M M P K Y L S F V R G V L D S D D L P L
1426 AAGCTTCTCGTGAGACCTGCAGCAGCACAACCTTCTCAAGGTGATCAAGAAGAACTCGTCCGCAAGACACT
452 N V S R E T L Q Q H K L L K V I K K K L V R K T L
1501 GACATGATCAAGAAATCGCTAAGGATGAGTACGAGAAGTCTGGAAGGAATTGAGCACAACATCAAACTGGT
477 D M I K K I A K D E Y E K F W K E F S T N I K L G
1576 GTTATCGAGGATCACTCCAACAGAAGTCTGCAAAAAGTCTGCGTTTCTTCTCTCAAACCTAGAGAGCGAG
502 V I E D H S N R T R L A K L L R F F S S S E S E
1651 ACCACATCCTTGCTGAATATGTTGAGCGCATGAAGGAGAAGCAGGAGCACATCTATTCATCGCCGGCAGATCC
527 T T S L A E Y V E R M K E K Q E H I Y F I A G T C
1726 CGCGAGGAGTTCGACAGTCTCCATTTGTGAAACGCTCTCCTGAAGAAGGGTACGAGGTGCTGTACCTTGTGAA
552 R E E V E Q S P P V E R L L K K G Y E V L Y L V E
1801 GCCGTGATGAGTACACCATCCAGGCTCTGCCAGAATGAAGAAAGAAATCCAGAATGTCGCCAAGGAGGGA
577 A V D E Y T I Q A L P E Y E G K K F Q N V A K E G
1876 CTCAAGCTAGACCAGTCTGAGAAGGCCAAGGAGGAAGGAAAGCTCTGGAGAAGGACTTGAAACCCCTGCTTAAC
602 L K L D Q S E K A K E R K E A L E K D F E P L L N
1951 TGGATGAAGGATGATGCCCTGAAGCAAGATCGAGAAGGCCACCATTTCTGAGCGTCTGTCCACCTCACCATGT
627 W M K D D A L K D K I E K A T I S E R L S T S P C
2026 GCTCTGGTCCGACGCTGATGGATGGTCTGGCAACATGGAGCGCATCATGAAGTCCCAGGCTTACCAGAAGGCT
625 A L V A S S Y G W S G N M E R I M K S Q A Y Q K A
2101 AATGATCCATCCAGTCACTATGCCACCCAAAAGAAAGACTTGGTGAAGCCACGCCACCTCTCATCAAG
677 N D P S Q S F Y A T Q K K T L E L N P R H P L I K
2176 GAGCTGAAACAGCGTGTGAAACCAACAAGGAAGATCAAACCACAAAAGACTAGCCGCTCTGCTTTTCGAGACG
702 E L K Q R V E T N K E D Q T T K D L A V L L F E T
2251 GCAACTCTCCGCTCTGGCTACTCCCTGAAGGATACTGCTGACTTTCGGGAGGAGATTGAGAAAATGATGCGAATC
727 A T L R S G Y S L K D T A D F A E R I E K M R A I
2326 AGCCTGGACATCTCTTGTGAGAAGGTTGAGGATGAGCCTGAGGACGAGGAGTGTGAGGAGGCTGAGGAG
752 S L D I S L D E K V E D E P E D E E V A E A E E
2401 GAAGCTGATGAGGAGGAAGGAGGCTGGAGATGCTTCTGCTGCTGAAGAGACCCCTGAAAAACAAGAGGATAAA
777 E A D E E E E E A G D A S A A E E T P E K Q E D K
2476 ACAGAGCAGAACTGCTCAAGAGGAAGACACACCACCCATACGGAAGTGTGaaatcatgaatctggaatttt
802 T E A E T A Q E E D T P P H T E L *
2551 ttaaat aat t gggat aat at agaatt taaaat act aaaaat ggt at t at gcgcaaacct gcgggagt ct gat aacc
2626 accaaaggacggaat t g t a c t t a g t g t g t c a c t t a a a c a a t g c c a g a c g a g t c a a c g t c g a t a g c g t c t t g g
2701 agaat gat ggt ggc at t a a a a g g a t a t g t t t t a c t g c a c t c a a a a g t g a a t t t g c t g c t g g a g c a c t c a g
2776 t t c a t g t t c a t g g a t g g t c g c a c a c c t t g t t a a g t a t a c a g a c a t t c t c a c g a g c g a t a t a t g t g c t a a g t
2851 c a t t g t g c a c g t g t c a g t t a c t a g t a a g g a t a t c a g a t t t t c a t c a t t c a c a t t c c t a a t g t c g t c c g a t t g
2926 t a a t a t g t c t g t a g c c a g g g a c t t g t g t c t g t t a t c a g t g c t g t a t a t g t g t a t g a t c t g t g t t t a
3001 t g g a t g a t a c g t a a g t a c a g g g t c a t a c a t t g a c t c a c t a g a g a a t a t t a a g t t t g t a a t a a a c t c t a g a
3076 aaaccgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 *SnHsp90* cDNA 序列全长及推导的氨基酸序列

Fig.2 The full length and deduced amino acid sequence of *SnHsp90* cDNA

黄色背景为 Hsp90B 蛋白家族的特征序列; GxxGxG 以红色字体突出; 5'和 3' UTR 用小写字母表示; 编码区以及推导的氨基酸序列用大写字母表示; 信号肽以灰色阴影突出; HATPase_c 结构域以黑框框出; Hsp90 结构域以蓝色字体突出

The yellow background is the characteristic sequence of the Hsp90B protein family; the GxxGxG motif is highlighted in red; 5' UTR and 3' UTR are indicated with small letters; open reading fragment and the deduced amino acid sequences are indicated with capital letters; the signal peptide is highlighted by a gray shadow; the HATPase_c domain is outlined in black box; the Hsp90 domain is highlighted in blue

2.2 SnHsp90 蛋白质理化分析

利用 ProtParam 预测得到 SnHsp90 的理论分子量为 93.839 kDa, 等电点为 4.75, 负电荷残基 178 个, 正电荷残基 114 个。结果显示, 其脂溶指数(Aliphatic index)为 77.98, 总平均亲水性(Grand average of hydropathy, GRAVY)为-0.752, 属于亲水性蛋白。使用 SOPMA 软件对 SnHsp90 二级结构进行预测, 发现 α 螺旋、 β 转角和延伸链分别占整体的 55.87%、4.28% 和 12.59%。细胞亚定位预测结果显示, SnHsp90 定位于内质网上。结构域分析显示, 不同物种的 Hsp90 都含有信号肽、组氨酸激酶结构域(HATPase-c Domain)和热休克蛋白结构域(Hsp90 Domain)(图 3), 可见 Hsp90 蛋白在结构域上具有高度保守性。

2.3 Hsp90 蛋白序列分析

对来源于鸭嘴海豆芽(*Lingula anatine*, XP_023932276.1)、小头虫(*Capitella teleta*, ELU00023.1)、福寿螺(*Pomacea canaliculated*, XP_025107756.1)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, BAF63637.1)、水蛭(*Helobdella robusta*, XP_009019107.1)、猫头鹰帽贝(*Lottia gigantean*, XP_009065664.1)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*, OWF41993.1)、白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*, XP_019627224.1)、棘冠海星(*Acanthaster planci*, XP_022100344.1)、斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*, XP_004567801.1)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP_003443932.1)、杂色鲮(*Cyprinodon variegatus*, XP_015232211.1)、隆头蛛

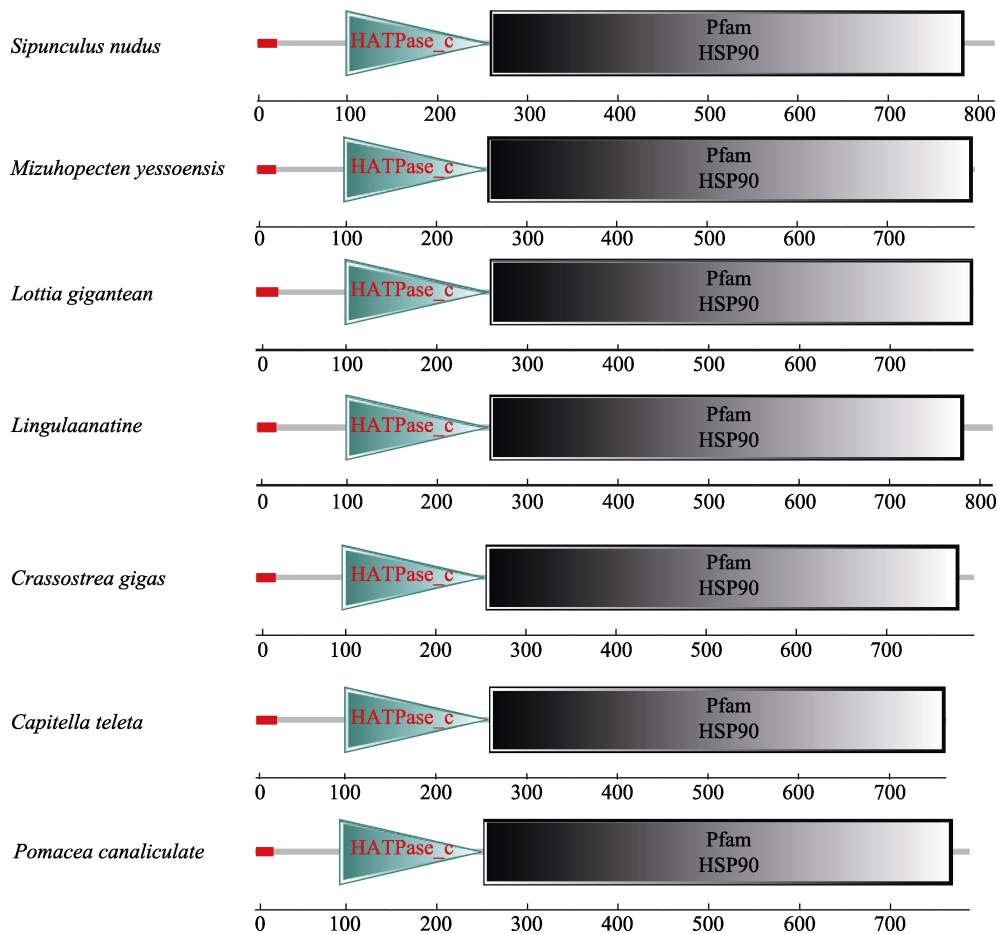


图3 不同物种 Hsp90 蛋白的结构域

Fig.3 The domains of of Hsp90 proteins of different species

红色部分为信号肽; 绿色三角 HATPase_c 结构域; 黑色矩形为 Hsp90 结构域; 各物种 *hsp90* 基因序列登录号: 虾夷扇贝 OWF41993.1; 猫头鹰帽贝 XP_009065664.1; 鸭嘴海豆芽 XP_023932276.1; 太平洋牡蛎 BAF63637.1; 小头虫 ELU00023.1; 福寿螺 XP_025107756.1

Red section is signal peptide; green triangle is HATPase_c domain; black rectangle is Hsp90 domain; The *hsp90* GenBank accession numbers of each species are following: *Mizuhopecten yessoensis*, OWF41993.1; *Lottia gigantean*, XP_009065664.1; *Lingula anatine*, XP_023932276.1; *Crassostrea gigas*, BAF63637.1; *Capitella teleta*, ELU00023.1; *Pomacea canaliculated*, XP_025107756.1

(*Stegodyphus mimosarum*, KFM57735.1)、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*, XP_020311813.1)、大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*, XP_020790709.1) 的 Hsp90 蛋白与光裸星虫 Hsp90 序列进行 motif 分析, 结果表明, 各物种 Hsp90 蛋白序列保守性较高(图 4)。

其中, 光裸星虫 Hsp90 与鸭嘴海豆芽的相似性最高, 为 77.72%; 与大弹涂鱼的相似性最低, 为 69.18%。对不同物种的 Hsp90 蛋白序列进行 Motif 分析, 发现这些物种均具有 Motif (1~10), 且相对位置一致, 进一步表明 Hsp90 蛋白在序列上的保守性。

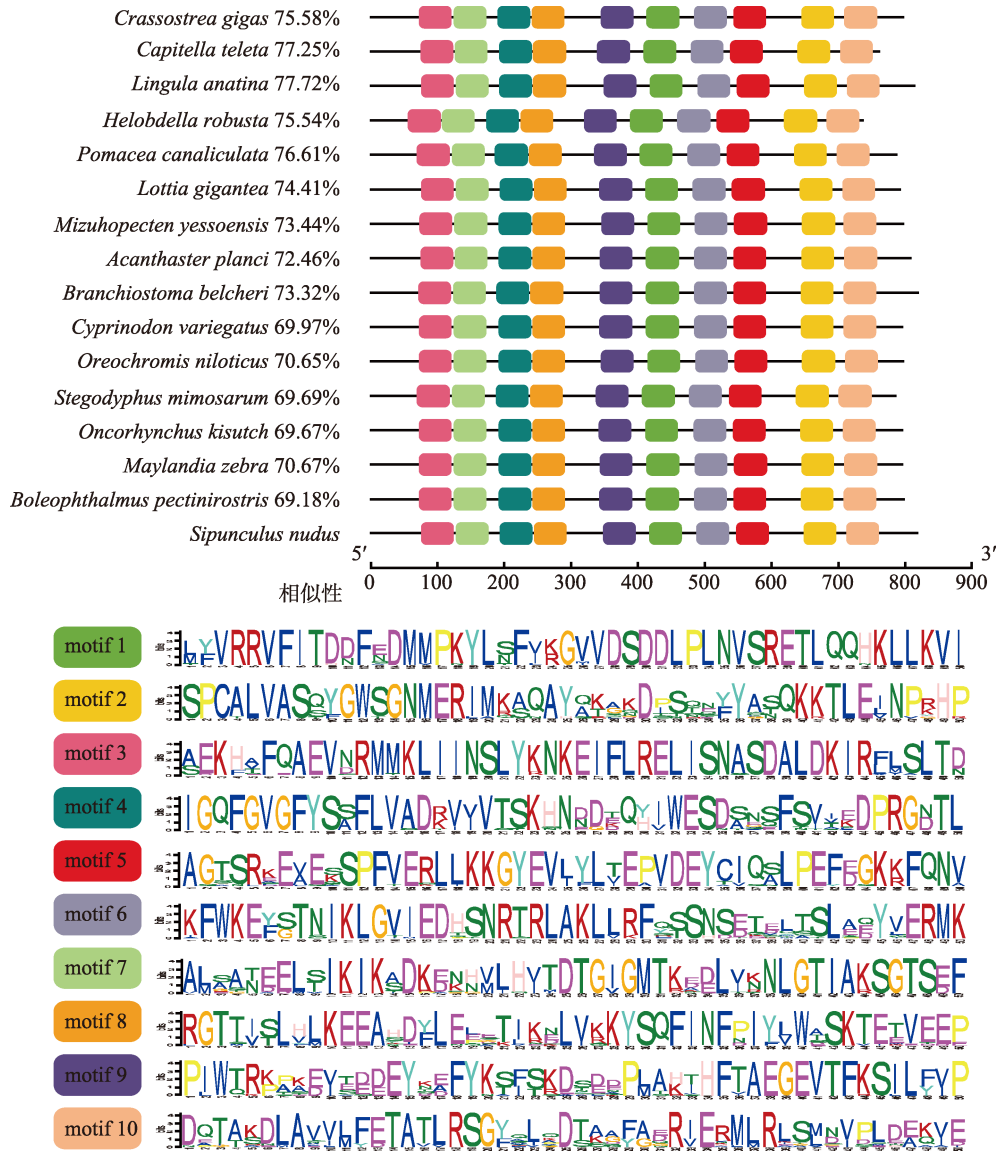


图 4 Hsp90 氨基酸序列 Motif 分析

Fig.4 Motif analysis of amino acid sequence of Hsp90

对来自小头虫、鸭嘴海豆芽、水蛭的 Hsp90 和 SnHsp90 进行三级结构预测, 结果发现, 光裸星虫与鸭嘴海豆芽、小头虫、水蛭 Hsp90 在三级结果上相似性很高(图 5), 说明 Hsp90 蛋白的三级结构非常保守。

2.4 SnHsp90 系统发育分析

利用最大似然法(Maximum likelihood), 选择光裸星虫、太平洋牡蛎、福寿螺、猫头鹰帽贝、虾夷扇

贝、鸭嘴海豆芽、小头虫、水蛭、白氏文昌鱼、杂色鳉、尼罗罗非鱼、斑马拟丽鱼、大弹涂鱼以及银大马哈鱼的 Hsp90 蛋白序列构建系统进化发育树。结果显示, Hsp90 系统发育树可分为无脊椎动物和脊椎动物两大支, 在无脊椎动物中, 光裸星虫 Hsp90 与水蛭、小头虫等环节动物聚为一支, 再与鸭嘴海豆芽、太平洋牡蛎、虾夷扇贝等软体动物聚为一支(图 6)。系统发育树聚类结果与传统分类学结果一致。

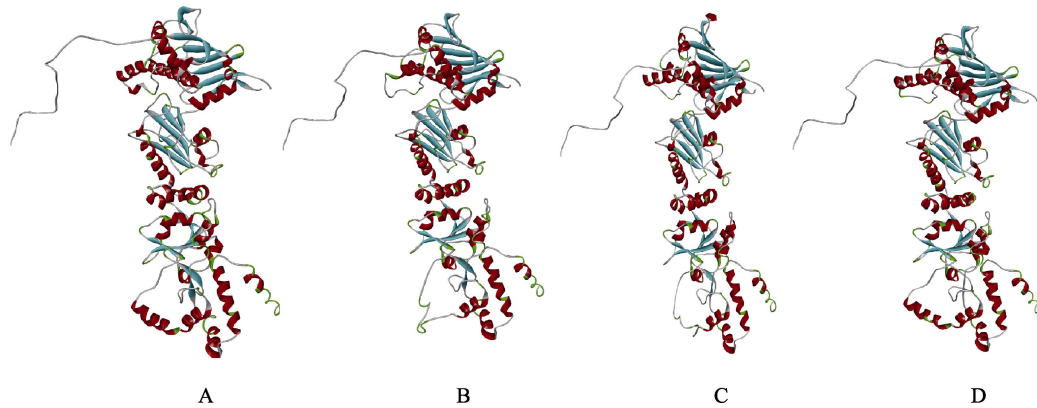


图5 光裸星虫(A)、鸭嘴海豆芽(B)、小头虫(C)和水蛭(D)Hsp90 蛋白分子结构

Fig.5 The spatial structure of Hsp90 protein molecules of *S. nudus* (A), *L. anatina* (B), *C. teleta*(C) and *H. robusta* (D)

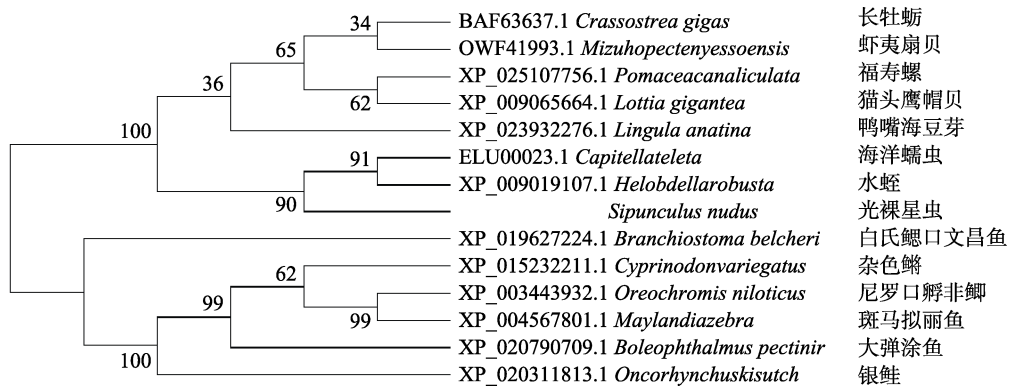


图6 Hsp90 蛋白质聚类分析

Fig.6 Protein cluster analysis of Hsp90

2.5 SnHsp90 表达模式分析

利用 qRT-PCR 对 *SnHsp90* 进行不同组织的表达模式分析,结果显示, *SnHsp90* 在光裸星虫的各个组

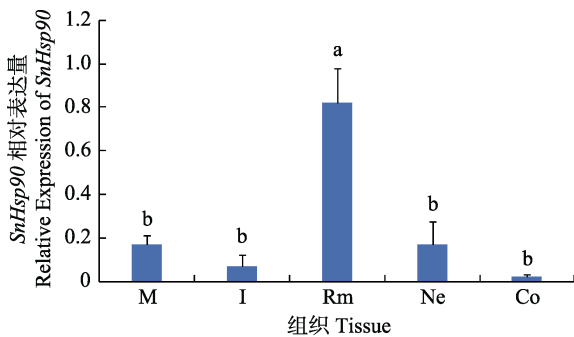


图7 光裸星虫 *SnHsp90* 在不同组织中的相对表达量

Fig.7 Relative expression of *SnHsp90* in different tissues

M: 体壁; I: 肠; Rm: 收吻肌; Ne: 肾管; Co: 体腔液细胞。

不同字母代表差异性显著($P<0.05$), 下同

M: Body wall; I: Intestine; Rm: Rhynchonellida muscle; Ne: Nephridioduct; Co: Coelomic cell. Different letters mean significant difference ($P<0.05$). The same as below

织中均有表达,且收吻肌中表达量最高,差异显著($P<0.05$) (图7)。

如图8所示, *SnHsp90* 在不同发育时期卵母细胞中均有表达。其中,在 Egg6 的表达量显著高于其他时期($P<0.05$), Egg2 表达量显著高于 Egg1 和 Egg3~5 ($P<0.05$)。

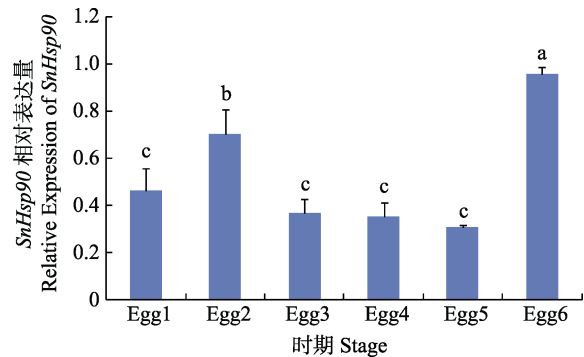


图8 *SnHsp90* 在不同时期卵母细胞中的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *SnHsp90* in oocytes at different periods

3 讨论

生殖细胞发生是水产动物繁殖生物学研究的重要内容。近年来,通过构建不同发育时期性腺的转录组文库,已发掘了大量与水产动物繁殖相关的关键基因。例如,袁静(2013)比较分析了 5~180 日龄尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)性腺转录组,发现雌雄性腺特异表达的基因分别为 69 个和 259 个。林睿涓(2017)利用七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*)性腺转录组文库,筛选出 12 个与性别决定、性腺发育和性激素调控相关的重要功能基因。本课题组前期构建了光裸星虫卵母细胞的转录组文库,分析发现 *Hsp90* 在各时期卵母细胞均具有较高的表达水平(未发表),暗示着其在卵母细胞或胚胎发育中承担着重要作用。本研究通过分析 *SnHsp90* 的序列特征及表达模式,探索其在卵母细胞发育中可能具有的功能。

Hsp90 家族可分为 *Hsp90A*、*Hsp90B*、TNF 受体相关因子(TNF receptor associated factors, TRAP)、*Hsp90C*、高温蛋白 G (High-temperature protein G, HTPG) 5 个亚家族,其中, *Hsp90B* 定位于真核生物内质网中,含有信号肽结构,序列上同时存在“FLREL”、“IGQFGVGFYS”及“LPLNVSRE”3 个标签序列(Chen *et al*, 2006)。本研究利用 RACE 方法克隆获得 *SnHsp90* cDNA 全长序列,显示 *SnHsp90* 具有信号肽结构,且存在 *Hsp90B* 亚家族的上述 3 个特征序列标签,可见本研究克隆所得的 *SnHsp90* 属于 *Hsp90B* 亚家族。一般来说, *Hsp90B* 亚家族的 C 末端具有内质网定位序列“KDEL”。然而,有研究指出,该序列在 *Hsp90B* 中并不保守,其 K 位点和 D 位点会发生一定的变化(Gupta, 1995; Chen *et al*, 2006)。这与本研究发现的 *SnHsp90* 氨基酸序列 C 末端序列为“HTEL”的结果一致。

对软体动物、棘皮动物、脊椎动物等 16 个物种进行 motif 搜索,发现不同物种间搜索出来的 motif 类型、数目以及排列顺序上均一致;光裸星虫、鸭嘴海豆芽、小头虫和水蛭同源 *Hsp90* 在三维结构上高度相似。以上结果均说明了 *Hsp90* 在二级和三级序列上均具有较高的保守性。

Hsp90B 也称为葡萄糖调节的蛋白(Glucose regulated protein 94 kDa, Grp94) (Gupta, 1995; Chen *et al*, 2006),作为分子伴侣时,有助于蛋白质的正确折叠以及防止错误折叠蛋白的积累(Young *et al*, 2001; Mamipour *et al*, 2017; Krüger *et al*, 2019);参与免疫球蛋白、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和某些整合蛋白(Integrin)的折叠、组装和转运等过程(Melnick

et al, 1992; Yang *et al*, 2007)。本研究中, *SnHsp90* 在收吻肌、体壁、肠等组织中均有表达,提示该基因广泛参与了各组织的生理活动。在收吻肌的参与下,光裸星虫的吻可快速伸缩进行摄食和钻穴。在频繁的强大伸缩过程中,收吻肌的细胞可能发生损伤,*SnHsp90* 在收吻肌中的表达量显著高于其他组织,推测与细胞的损伤修复有关。

卵母细胞发育过程中,核糖体、内质网、高尔基体等细胞器大量增殖,积累大量酶、蛋白质、mRNA 等物质。本研究显示, *SnHsp90* 在光裸星虫各时期卵母细胞中均有较高表达,有利于快速合成蛋白的正确折叠,与卵母细胞旺盛的转录和翻译活动相一致。有研究显示, *Hsp90* 可与 Greatwall 激酶结合,影响生殖细胞的细胞周期进程(Yamamoto *et al*, 2014)。在刀额新对虾中, *Hsp90* 与雌激素受体结合,介导雌激素信号转导过程,开启靶基因如卵黄蛋白原的转录(Wu *et al*, 2008)。光裸星虫卵母细胞 Egg2 处于卵黄旺盛合成前期,卵黄快速积累(王庆恒等, 2017),本研究显示,光裸星虫 *SnHsp90* 在该时期显著高表达($P<0.05$),暗示 *SnHsp90* 的表达可能与卵黄合成之间存在相关性,与刀额新对虾的研究结果相似。

Hsp90 在水生生物应激和抗逆过程中具有重要作用。例如, *Hsp90B* 在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)耐盐群体的细胞中表达上调,可能在盐度耐受方面起作用(Sithtisarn *et al*, 2017);三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)具有 2 个 *Hsp90* 基因,对胁迫条件可产生不同的响应,例如,热处理导致 *Hsp90-1* 的表达量显著上调,而 *Hsp90-2* 则显著下调(Zhang *et al*, 2009);氨氮胁迫下,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)鳃、肝胰腺、肌肉和血细胞的 *Hsp90* 表达量均在短时间内明显上调,有利于防止分子氨对组织细胞的损伤(王芸等, 2013)。本研究中, Egg6 是经肾管排放到水体中的卵母细胞,需要应对体内外渗透压、pH、离子浓度等环境因子的重大改变, *SnHsp90* 在 Egg6 时期表达量最高,暗示 *SnHsp90* 的高表达可能与卵母细胞应对环境变化密切相关。

参 考 文 献

- Chen B, Zhong D, Antónia M. Comparative genomics and evolution of the *Hsp90* family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*, 2006, 7(1): 156–156
- Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12(6): 1063–1073

- Krüger K, Thomas R, Carsten Z, *et al.* Role of heat shock proteins 70/90 in exercise physiology, exercise immunology and their diagnostic potential in sports. *Journal of Applied Physiology*, 2019, 126(4): 916–927
- Lai BT, Chin NW, Stanek AE, *et al.* Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology*, 1984, 4(12): 2802–2810
- Lai ZX, Liu Y, Wang QH, *et al.* cDNA cloning of FBP gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 106–114 [赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) FBP 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 106–114]
- Li FL, Kong QL, Shi GT, *et al.* Studies on the genus *Sipunculus* (Sipuncula) of the China coasts. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1990, 20(1): 93–99 [李凤鲁, 孔庆兰, 史贵田, 等. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究. *青岛海洋大学学报*, 1990, 20(1): 93–99]
- Li J, Xie X, Zhu C, *et al.* Edible peanut worm (*Sipunculus nudus*) in the Beibu Gulf: Resource, aquaculture, ecological impact and counterplan. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(5): 823–830
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22(3): 631–677
- Lin RJ. Gonad transcriptome of discus fish (*Symphysodon haraldi*) and expression of *vasa* gene. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [林睿涓. 七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*)性腺转录组分析及 *vasa* 基因的时空表达. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Luo SJ, Yang CY, Wang QH, *et al.* Nutrition components analysis and evaluation on four wild populations of peanut worm *Sipunculus nudus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(1): 25–30 [罗少杰, 杨创业, 王庆恒, 等. 光裸星虫 4 个野生群体的营养成分分析与品质评价. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(1): 25–30]
- Mamipour M, Yousefi M, Hasanzadeh M. An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 367–375
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, *et al.* Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*, 2007, 131(1): 121–135
- Melnick J, Aviel S, Argon Y. The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(30): 21303–21306
- Sithtisarn S, Yokthongwattana K, Mahong B, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* control and a salinity-tolerant strain revealed a differential protein expression pattern. *Planta*, 2017, 246(5): 843–856
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effects of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang QH, Zhang JW, Hao RJ, *et al.* Ultrastructure of oogenesis in coelomic fluid of *Sipunculus nudus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 57–66 [王庆恒, 张家炜, 郝瑞娟, 等. 光裸星虫体腔液中卵母细胞发生的超微结构. *海洋与湖沼*, 2017, 48(1): 57–66]
- Wu LT, Chu KH. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: Evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(5): 952–959
- Yamamoto TM, Wang L, Fisher LA, *et al.* Regulation of Greatwall kinase by protein stabilization and nuclear localization. *Cell Cycle*, 2014, 13(22): 3565–3575
- Yang Y, Liu B, Dai J, *et al.* Heat shock protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 2007, 26(2): 215–226
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, 2001, 154(2): 267–273
- Yuan J. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and bioinformatic analysis of *Fox* gene family. Master's Thesis of Southwest University, 2013 [袁静. 尼罗罗非鱼性腺发育过程的转录组学研究及 *Fox* 家族生物信息学分析. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Zhang JW, Hao RJ, Wang QH, *et al.* Microscopic and ultrastructural observations of embryonic and larval development in *Sipunculus nudus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018a, 25(5): 976–987 [张家炜, 郝瑞娟, 王庆恒, 等. 光裸星虫胚胎和幼体发育的显微和超微结构. *中国水产科学*, 2018a, 25(5): 976–987]
- Zhang JW, Zheng Z, Wang QH, *et al.* Screening of reference genes for real-time PCR in whole tissue from *Sipunculus nudus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018b, 38(1): 7–13 [张家炜, 郑哲, 王庆恒, 等. 光裸星虫全组织荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选. *广东海洋大学学报*, 2018b, 38(1): 7–13]
- Zhang XY, Zhang MZ, Zheng CJ, *et al.* Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 150(4): 465–473
- Zhu JA. The effects of injecting c-mos siRNA on maturation, fertilization and development of porcine oocyte. Institute of Biotechnology Ilan University, 2007 [朱建安. 注射 c-mos siRNA 对猪卵母细胞成熟, 受精及发育的影响. 宜兰大学生物技术研究所, 2007]

Molecular Cloning and Expression Analysis of *HSP90* of Peanut Worm *Sipunculus nudus*

ZHOU Dan, SU Yonglin, ZHONG Ruzhuo, GUO Zhicheng,
WU Jing, ZHENG Zhe^①, WANG Qingheng
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

Abstract Heat shock protein 90 (Hsp90) plays important roles in correct protein folding, intracellular material transport, cell proliferation regulation, and gametogenesis. In this study, the full-length cDNA of *Hsp90* (*SnHsp90*) of *Sipunculus nudus* was cloned using RACE technology. The results showed that *SnHsp90* is 3110 bp in length, including a 3' UTR of 582 bp and a 5' UTR of 72 bp. The open reading frame is 2456 bp in length and it encodes 818 amino acids. Sequence analysis showed that SnHsp90 has a signal peptide, with three tag sequences FLREL, IGQFGVGFYS, and LPLNVSRE and a conserved module, GxGxG, of type B Hsp90, thereby indicating that SnHsp90 belongs to the Hsp90B subgroup. Compared with other species, SnHsp90 showed the highest similarity (77.72%) with the Hsp90 of duck-billed bean sprouts. Three-dimensional structural modeling showed that the spatial conformation of Hsp90 among different species is highly conserved. Phylogenetic tree analysis showed that SnHsp90 was clustered into one branch of Hsp90 of annelids such as *Capitella teleta* and *Helobdella robusta*. The Hsp90 of all invertebrates was clustered into one branch, whereas that of the vertebrates was clustered into another branch, thus suggesting that SnHsp90 is closely related to the Hsp90 of *Capitella teleta*. RT-PCR results showed that *SnHsp90* was expressed in different tissues of *S. nudus*, such as those of the body wall, muscles, and kidney tubes. *SnHsp90* can also be expressed at different developmental stages of oocytes, and it is significantly expressed in Egg2 (oocyte in early stage of vigorous yolk synthesis) and Egg6 (excretive oocyte) ($P < 0.05$). This result suggests the involvement of SnHsp90 in correct protein folding, yolk synthesis, and environmental stress resistance of *S. nudus*. The above results provide a basis for further exploration of the developmental mechanism of *Sipunculus nudus* oocytes.

Key words *Sipunculus nudus*; Oocyte; *HSP90*; Gene cloning; Expression analysis

① Corresponding author: ZHENG Zhe, E-mail: haidazhengzhe@163.com

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20190426001

http://www.yykxjz.cn/

李倩, 李贵阳, 李杰, 莫照兰. 利用 mini-Tn10 转座子文库筛选鳗弧菌 M3 表型发生变化的基因. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 160–167
Li Q, Li GY, Li J, Mo ZL. Construction of a mini-Tn10 transposon library to identify genes associated with several phenotypes of *Vibrio anguillarum* M3. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 160–167

利用 mini-Tn10 转座子文库筛选 鳗弧菌 M3 表型发生变化的基因



李倩¹ 李贵阳² 李杰² 莫照兰^{1,2①}

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

摘要 为了寻找影响鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)表型变化的基因,本研究使用转座子 mini-Tn10 (pLOF/Kana)构建了鳗弧菌 M3 突变株文库,筛选影响表型变化的菌株及相关基因,证明这些表型变化的突变子与毒力存在一定的相关性。对 M3 突变文库的 1152 突变子进行筛选,获得泳动能力改变的突变子 1 个(编号为 6G_1),酪蛋白酶活性发生改变的突变子 3 个(编号为 5A_11、7B_12 和 7E_12),明胶酶活性发生改变的突变子 1 个(编号为 7H_1),以及菌膜形成能力发生显著变化的突变子 3 个(编号为 5E_2、6A_2 和 6E_12)。对转座子插入位点进一步分析显示,一个磷酸二酯酶相关基因突变引起泳动能力增强($P<0.05$), *leuD*、*rseB* 和 *thiQ* 突变引起酪蛋白酶活性显著减弱($P<0.05$), *potD* 突变引起明胶蛋白酶活性显著减弱($P<0.05$), *leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 的突变引起菌膜形成能力明显减弱($P<0.05$)。对这些表型变化的突变子进行毒力感染,发现野生型 M3 是 6G_1 突变子的半数致死剂量(Lethal dose 50%, LD₅₀)的 2.04 倍,该突变子毒力相对增强。5A_11、7B_12 和 7E_12 的突变子 LD₅₀ 分别为野生型 M3 的 2.96、3.25 和 3.36 倍。7H_1 的 LD₅₀ 是野生型 M3 的 1.25 倍,5E_2、6A_2 和 6E_12 的 LD₅₀ 分别为野生型 M3 的 3.34、4.08 和 1.84 倍,这些突变子毒力相对减弱。本研究结果为进一步阐明鳗弧菌的发病机制提供了理论基础。

关键词 鳗弧菌; mini-Tn10 转座子; 突变文库; 表型; 基因

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0019-08

鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)广泛存在于大洋、河口等环境,也是多种海洋生物的正常菌群之一,一些致病性菌株可感染多种鱼类,引起出血性败血症(Austin *et al.*, 2007; 丁山等, 2018)。鳗弧菌致病包括粘附、侵袭、体内增殖、产生毒素等一系列过程,而

这些过程又与细菌产生的各种致病因子有关(Frans *et al.*, 2011)。已知的致病因子包括外膜蛋白、鞭毛、蛋白酶、脂多糖和溶血素等(Norqvist *et al.*, 1990; Austin *et al.*, 1995; Hirono *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1996)。鞭毛参与鳗弧菌的运动,当细菌失去运动能力或运动

* 国家重点研发计划(2018YFC0311300)、国家自然科学基金——山东省人民政府联合基金(U1706205)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017008)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311300), NFSC-Shandong Joint Fund (U1706205), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017008), and Aoshan Technology Innovation Program (2015ASKJ02)]. 李倩, E-mail: 840373607@qq.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-04-26, 收修改稿日期: 2019-07-02

能力下降时, 其感染宿主细胞的能力明显减弱 (Ormonde *et al*, 2000)。很多胞外蛋白酶是病原菌的主要致病因子, 它们可以水解组织细胞, 增强其通透性, 产生细胞毒性, 最终造成组织损伤等 (Naka *et al*, 2011)。鳗弧菌的金属蛋白酶基因 *priV* 发生突变时, 其对宿主红细胞的溶血活性下降、毒力减弱 (Mo *et al*, 2010)。Stewart 等 (2001) 研究表明, 几乎所有的细菌都可以形成菌膜, 为细菌提供物理和化学屏障, 营造一种相对稳定的状态。菌膜使鳗弧菌能够对消毒剂、抗生素等不利环境具有一定的耐受力, 使其保持持续感染和耐药性 (Hall-Stoodley *et al*, 2004; Lindell *et al*, 2012)。一些基因参与调控鳗弧菌菌膜和毒力的形成, 如 *luxR* 能够抑制胞外蛋白的产生、调控菌膜的形成, 进而参与细菌毒力和耐药性的调控 (Croatto *et al*, 2002)。可见, 鳗弧菌在运动、胞外蛋白酶产生、菌膜形成等表型方面的变化与细菌的致病性相关。

转座子 mini-Tn10 是一种微型转座子, 已被广泛应用于多种细菌基因的功能研究, 如用于鉴定炭疽杆菌 (*Anthrax bacillus*) 未知的调控因子及代谢途径研究 (Wilson *et al*, 2007), 用于鉴定影响苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 细菌素产生的基因 (Kamoun *et al*, 2009)。为找到影响鳗弧菌表型变化的基因, 本研究使用转座子 mini-Tn10 (pLOF/Kana) 构建鳗弧菌 M3 突变菌株文库, 筛选影响表型变化的菌株及相关基因, 为进一步研究鳗弧菌的致病机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、实验鱼、引物和培养条件

鳗弧菌 M3 (Amp^R) 由本实验室保存, 用胰大豆蛋白胨培养基 (TSA 和 TSB) 培养, 培养条件为 28℃, 静置或 150 r/min 摇床培养。

大肠杆菌 (*Escherich coli*) CC118 (pLOF/Kana, Kana^R, Amp^R) 和大肠杆菌 SM10 (Kana^R) 由集美大学鄢庆枇教授惠赠, 用含卡那霉素 (Kana) 100 μg/ml 的 LB 液体培养基培养, 培养条件为 37℃、静置或 150 r/min 摇床培养。

斑马鱼 (*Barchydanio rerio var*), 体长为 3~4 cm, 购于青岛市南山花鸟虫鱼市场。实验前暂养于 15 L 水族箱中 1 周, 正常换水、喂食, 养殖水温为 22℃。

TCBS 固体培养基 (含 Kana 600 μg/ml) 用于筛选带有 Kana 抗性的鳗弧菌突变子。

1.2 鳗弧菌 M3 mini-Tn10 转座子文库构建

突变文库的构建参照 Herrero 等 (1990) 方法并适当改进。供体菌 *E.coli* SM10 (pLOF/ Kana) 在 LB [氨苄青霉素 (Amp), 50 μg/ml; Kana, 100 μg/ml] 培养基中 37℃ 震荡培养过夜, 受体菌 (鳗弧菌) M3 在 TSB 培养基中 28℃ 震荡培养过夜。分别离心, 收集供体菌和受体菌, 用新鲜培养基洗涤, 并重悬菌体, 供体菌与受体菌按 1:4 的比例混合均匀, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤混合菌液, 取出滤膜置于 TSA 平板上, 28℃ 培养 4 h 后, 用 1 ml TSB 培养基洗脱滤膜上的细菌, 取 50 μl 涂布 TCBS+Kana 平板, 28℃ 培养 24 h。从 TCBS+Kana 平板上挑取单菌落, -80℃ 保存于 96 孔板中。

1.3 突变子表型检测

对鳗弧菌转座子突变文库进行泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力等表型检测。具体方法: 将鳗弧菌 M3 及其突变文库菌株在 TSB 过夜培养, 调节菌液为 OD_{540 nm}=0.5, 取 2 μl 菌液分别点种于含 0.35% 琼脂、含 1% 酪蛋白、含 1% 明胶的 TSA 平板上, 每组设 3 个重复。28℃ 静置培养 24 h 后, 分别测量平板上细菌的泳动圈直径 (Schaber *et al*, 2004)、酪蛋白酶产生直径 (Wilhelm *et al*, 2007)、明胶酶产生直径 (Zhou *et al*, 2013)。

应用结晶紫染色法检测突变菌株菌膜形成能力 (Lazarevic *et al*, 2005)。取 OD_{540 nm} 为 0.5 的菌液 150 μl 加入 96 孔板中, 以 TSB 作为空白对照。在 28℃ 静置培养 24 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, 浓度 0.2 mol/L, pH 7.0) 洗涤 5 次后, 用包音氏固定液 (Bouin's stationary liquid) 固定, 37℃ 下静置培养 1 h, 用 PBS 缓冲液清洗除去残留物, 置于 37℃ 恒温培养箱完全干燥后, 加入结晶紫染色、蒸馏水清洗, 加入乙醇溶解吸附结晶紫, 然后, 测定其在 OD_{595 nm} 的吸光度。

1.4 转座子插入突变子的数量及基因的确定

根据 Lee 等 (2008) 的方法确定转座子插入突变子的数量, 具体步骤: 鳗弧菌 M3 *rpoB* 基因为单拷贝基因, 选取其作为内参基因, *neoR* 基因为转座子特有, 选取其为目的基因, 根据引物 *rpoB*-for/rev、*neo*-for/rev (表 1) 扩增 *rpoB* 和 *neoR* 片段。连接 *rpoB* 片段和 *neoR* 片段, 构建重组载体质粒, 根据该质粒计算 DNA 拷贝数, 并以该重组质粒为模板, *rpoB*-SYBR-for/rev、*neoR*-SYBR-for/rev 为引物, 制作标准曲线, 得到扩增效率 *E* 值 (*E*_{*rpoB*} 和 *E*_{*neoR*}), 再以突变子 DNA 为模板, 进行相对定量 PCR, 得到 Δ*C*_{*rpoB*} 和

ΔC_{neoR} , 由公式计算转座子插入个数。

$$\text{转座子插入个数} = \frac{(1 + E_{neoR})^{-\Delta C_{neoR}}}{(1 + E_{rpoB})^{-\Delta C_{rpoB}}}$$

式中, ΔC_{neoR} 为扩增 *neoR* 基因时, 突变子株 DNA 为模板的 C_t 与重组质粒为模板的 C_t 差值。 ΔC_{rpoB} 为扩增 *rpoB* 基因时, 突变子株 DNA 为模板的 C_t 与重组质粒为模板的 C_t 差值。

根据 Xie 等(2011)的方法适当改进, 确定转座子插入基因, 具体步骤: 根据转座子 mini-Tn10 中 *neoR* 基因序列进行特异性引物设计, 具体引物序列见表 1。

对筛选出的 8 株菌株进行基因步移(Genome walking)扩增。以 8 株突变子菌株基因组 DNA 为模板, 使用外引物 neo-Rrev-0a 和 M3-1-1 进行第 1 轮 PCR; 取适量的第 1 轮 PCR 产物反应液稀释 50 倍后, 使用内引物 neoR-rev-1a 和 M3-1 进行第 2 轮 PCR; 取适量的第 2 轮 PCR 产物反应液稀释 50 倍后, 使用内引物 neoR-rev-b1 和 M3-1 进行第 3 轮 PCR 反应。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 确认目的条带后, 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的片段、连接至载体, 送上海派森诺生物技术有限公司测序, 测序结果与已公布的 M3 基因组信息在 NCBI 上进行比对。

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

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
M3-1	TGGGACACTCGGGATAGTGG
M3-1-1	TGGGACACTCGGGATAGTGNNNNNGGAA
neoR-rev0a	GGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCA
neoR-rev1a	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGATTACGCTCGTCATCAA
neoR-rev-b1	ACCGTTATTCGTGATTGC
rpoB-for	GCGTAGGTCTGTGCGTGTTG
rpoB-rev	GGATAAGCGAAGCGGCGATTG
rpoB-SYBR -for	CGTGTTGTTGATGGTGTGGTACTGA
rpoB-SYBR -rev	GGATAAGCGAAGCGGCGATTGATACG
neoR-for	GGCAATCAGGTGCGACAATCTAT
neoR-rev	CCGACTCGTCCAACATCAATACAA
neoR-SYBR-for	ATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGG
neoR-SYBR-rev	GGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAAC

1.5 突变子毒力检测

利用斑马鱼作为实验动物, 检测突变子的毒力变化, 根据杨茂成(1990)的方法, 鳗弧菌野生型 M3 及 8 株突变菌株作为感染组, 无菌生理盐水作为对照组, 设置细菌浓度梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 和 10^5 CFU/ml, TSA 平板检测活菌数。每个梯度 10 尾鱼, 每尾鱼注射 10 μ l 菌液, 进行肌肉注射攻毒, 记录感染后斑马鱼的死亡情况, 采用改进的寇氏法计算细菌对斑马鱼的半数致死量 (Lethal dose 50%, LD₅₀)。

1.6 数据分析

细菌的泳动圈直径、酪蛋白酶产生直径、明胶酶产生直径和成膜能力的吸光度采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD)表示, 并使用 SPSS 软件对这些数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 鳗弧菌 M3 mini-Tn10 转座子文库的构建和筛选

利用 mini Tn10 转座子构建鳗弧菌 M3 的突变文库, 得到 1152 株突变子。对突变子进行泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力的检测, 发现与野生型 M3 相比, 突变子株 6G_1 的泳动能力明显增强 ($P < 0.05$) (图 1), 5A_11、7B_12、7E_12 的酪蛋白酶活性显著减弱 ($P < 0.05$) (图 2), 7H_1 的明胶酶活性显著减弱 ($P < 0.05$) (图 3), 5E_2、6A_2、6E_12 的菌膜形成能力显著减弱 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.2 转座子插入突变子的数量及基因的确定

选取筛选的 8 株菌, 利用实时 PCR 相对定量标准曲线法和 ΔC_t 法确定了转座子插入个数(表 2)。通过

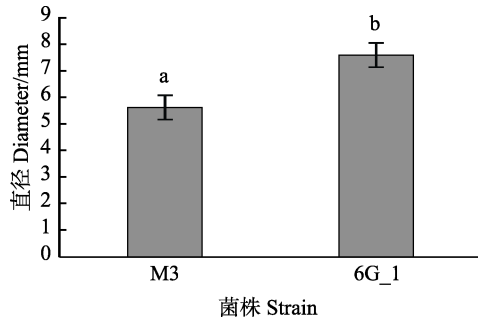


图 1 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子泳动能力检测
Fig.1 Detection of swimming ability of *V. anguillarum* M3 transposon library

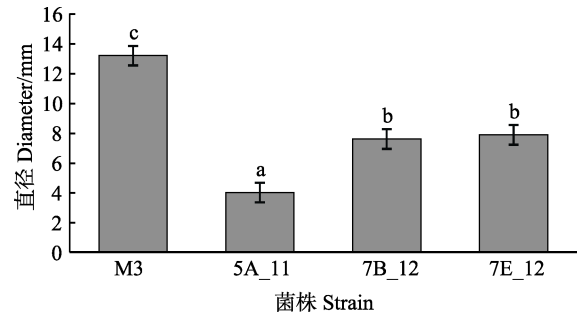


图 2 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子酪蛋白酶活性检测
Fig.2 Detection of casein activity of *V. anguillarum* M3 transposon library

不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 下同
Data with different letters are significantly different among different groups ($P < 0.05$), the same as below

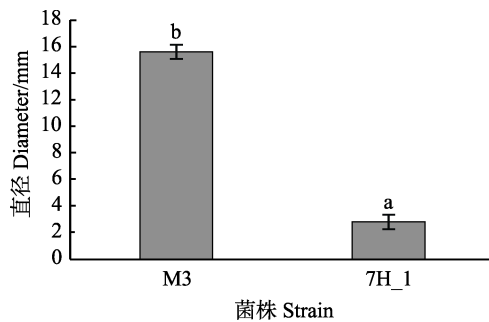


图 3 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子明胶酶活性检测
Fig.3 Detection of luciferase activity of *V. anguillarum* M3 transposon library

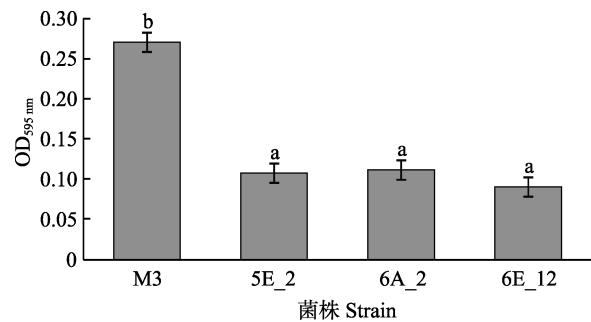


图 4 鳗弧菌 M3 转座子文库突变子菌膜形成能力检测
Fig.4 Detection of membrane formation ability of *V. anguillarum* M3 transposon library

表 2 目的基因 *neoR* 和内参基因 *rpoB* 的扩增效率及 ΔC_t 值
Tab.2 Amplification efficiency and ΔC_t of target gene *neoR* and reference gene *rpoB*

菌株 Strain	扩增效率 E_{rpoB}	扩增效率 E_{neoR}	$\Delta C_{t_{rpoB}}$	$\Delta C_{t_{neoR}}$	转座子插入个数 Inserts number
5E_2			8.53	8.37	1
5A_11			14.60	15.63	1
6A_2			7.85	8.06	1
6E_12	97%	93%	9.23	8.10	2
6G_1			9.19	9.59	1
7B_12			10.41	10.51	1
7E_12			7.80	7.48	1
7H_1			9.22	8.94	1

基因步移扩增法获得转座子插入位点, 将得到的序列与 M3 全基因组序列进行比对, 得到插入基因在 M3 基因组上的位置信息和编码蛋白信息(图 5, 表 3)。*leuD*、*rseB*、*thiQ*、*ilvH*、*grpB* 位于 M3 染色体 I 上, 1 个磷酸二酯酶相关基因和 *potD* 位于染色体 II 上。其中, 磷酸二酯酶相关基因影响 M3 的运动能力, *leuD*、*rseB*、*thiQ* 影响 M3 酪蛋白酶产生, *potD* 影响 M3 明胶蛋白

酶产生, *leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 影响 M3 的菌膜形成能力。

2.3 突变子毒力检测

肌肉注射攻毒实验结果见表 4。由表 4 可知, 突变子 6G_1 的 LD_{50} 为 5.439×10^4 CFU/尾, 野生型 M3 是该突变子的 2.04 倍, 突变子 5A_11、7B_12 和 7E_12 的 LD_{50} 分别为 3.29×10^5 、 3.734×10^5 、和 3.734×10^5 CFU/尾, 分

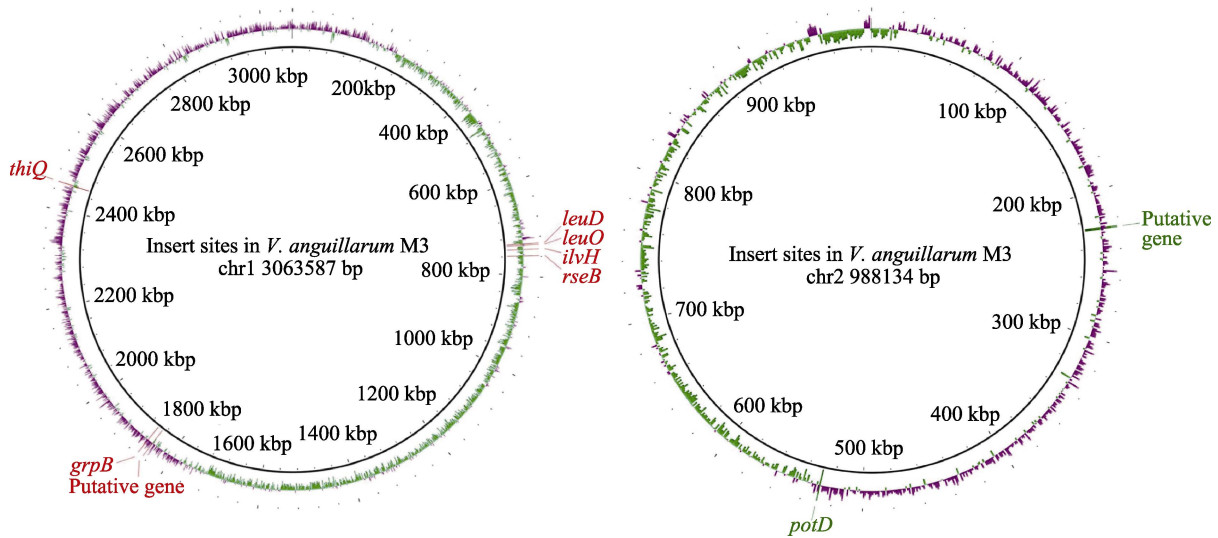


图 5 转座子插入位点及基因

Fig.5 Transposon insertion sites and genes

表 3 转座子插入位点信息

Tab.3 Information of transposon insertion site

菌株 Strain	表型 Phenotype	基因 Gene	基因产物 Gene product	预测功能 Predict function
5A_11	酪蛋白酶活性降低	<i>leuD</i>	异丙基苹果酸异构酶	影响细胞壁合成, 钾离子吸收, c-di-AMP 水平, 细菌的存活能力
7B_12		<i>rseB</i>	一种直链蛋白	调控外膜完整性, 调节 Sigma E 因子转录
7E_12		<i>thiQ</i>	硫胺素 ABC 转运 ATP 结合蛋白	蛋白 TbpA、ThiP 和 TPP 运输系统的一部分
7H_1	明胶酶活性降低	<i>potD</i>	蛋白 PotD 是与底物结合的细胞质组分	转运亚精胺和腐胺
5E_2	菌膜形成能力降低	<i>leuO</i>	2-异丙基苹果酸异构酶	调节群体感应, 参与各种基因的表达, 影响生物膜的形成
6A_2		<i>ilvH</i>	乙酰乳酸合酶	催化从丙酮酸到 2-乙酰乳酸的合成
6E_12		基因名称不明确	核苷合成蛋白	促进 GTP 的合成, 用于天门冬氨酸、天门冬酰胺、酪氨酸和组氨酸的合成
		<i>grpB</i>	2-甲基异柠檬酸裂解酶	促进 2-甲基异柠檬酸酯催化丙酮酸和琥珀酸酯的形成
6G_1	泳动性增强	基因名称不明确	磷酸二酯酶	水解细胞内第二信使(环磷酸腺苷 cAMP 或环磷酸鸟苷 cGMP)

别为野生型 M3 的 2.96、3.25 和 3.36 倍。7H_1 的 LD_{50} 为 1.374×10^5 CFU/尾, 是野生型 M3 的 1.25 倍, 5E_2、6A_2 和 6E_12 的 LD_{50} 分别为 3.716×10^5 、 4.453×10^5 和 2.052×10^5 CFU/尾, 分别为野生型 M3 的 3.34、4.08 和 1.84 倍。

3 讨论

本研究利用 mini-Tn10 转座子构建了鳃弧菌 M3 的突变文库, 筛选得到影响细菌泳动、酪蛋白酶活性、明胶酶活性、菌膜形成能力的突变子菌株, 通过基因

步移和序列比对, 找到影响上述表型的相关基因。结果显示, 1 个磷酸二酯酶相关基因的突变引起泳动能力增强 ($P < 0.05$), 毒力相对增强, *leuD*、*rseB*、*thiQ* 的突变引起酪蛋白酶活性明显减弱 ($P < 0.05$), *potD* 的突变引起明胶蛋白酶活性显著减弱 ($P < 0.05$), *leuO*、*ilvH* 和 *grpB* 的突变引起菌膜形成能力明显减弱 ($P < 0.05$) 且这些菌株毒力相对减弱。研究表明, 细菌毒力产生主要包括铁摄取系统、外膜蛋白、胞外蛋白酶、脂多糖和溶血素等 (Weber *et al.*, 2009; Naka *et al.*, 2011)。O'Toole 等 (1996) 研究发现, 鳃弧菌鞭毛被破坏后, 泳

表 4 鳃弧菌 M3 野生型及其突变子株攻毒实验结果
Tab.4 Experimental results of virulence of *V. anguillarum* M3 wild type and its mutants

菌株 Strain	半数致死量 LD ₅₀ (CFU/尾)
M3	1.111×10 ⁵
6G_1	5.439×10 ⁴
5A_11	3.290×10 ⁵
7B_12	3.611×10 ⁵
7E_12	3.611×10 ⁵
7H_1	1.374×10 ⁵
5E_2	3.716×10 ⁵
6A_2	4.453×10 ⁵
6E_12	2.052×10 ⁵

动能力减弱的菌株毒力较野生型减弱了几百倍,表明趋化运动是鞭毛对鳃弧菌毒力的一种必需功能。Hao 等(2013)研究表明,鳃弧菌 *rpoN* 基因缺失突变株因为其各种表型缺陷和调控能力丧失,致使鳃弧菌在宿主体内存活能力下降,致病力减弱,证实了表型和毒力存在相关性。

磷酸二酯酶(PDES)具有水解细胞内第二信使(环磷酸腺苷 cAMP 或环磷酸鸟苷 cGMP)的功能,降解细胞内 cAMP 或 cGMP,从而终结这些第二信使所传导的生化作用(田慧等,2003)。Fahmin 等(2017)研究显示, PDES、二腺苷酸环化酶(DACS)和 c-di-AMP 合成酶构成环二腺苷单磷酸(c-di-AMP),PDES 和 DACS 协同调节 c-di-AMP 的稳态, PDES 的缺失可导致革兰氏阳性细菌的细胞壁发生改变、钾离子吸收失调、c-di-AMP 水平改变、细菌的存活率下降。c-di-AMP 在不同的细菌体内具有不同的作用,可以影响生物膜的形成、毒力因子的表达、运动性和碳代谢(Corrigan *et al.*, 2013),但其调控细菌表型和毒力的机制尚不清楚(Pham *et al.*, 2016; Corrigan *et al.*, 2013)。本研究中,由于转座子插入,使鳃弧菌的 1 个 PDES 失活,有可能影响了细菌细胞壁离子代谢和生物膜形成,而导致细菌运动能力改变,具体的影响机制还需进一步探究。

leuD 编码异丙基苹果酸异构酶,将 α -异丙基苹果酸催化为 β -异丙基苹果酸,为亮氨酸的合成提供前体(Kohlhaw *et al.*, 2003)。*qsdS* 编码异丙基苹果酸脱氢酶,具有 N-酰基-L-高丝氨酸内酯(AHL)降解酶活性(Ma *et al.*, 2018)。AHL 参加细菌密度感应系统(QS)的调节,调控生物膜形成(Parsek *et al.*, 2000)、蛋白酶活性(Waters *et al.*, 2005)等。在染色体上,*qsdS* 位于 *leuD* 和 *leuO* 之间,由此推测,*leuD* 的插入失活间接影响了 *qsdS* 的功能,从而影响鳃弧菌 QS 的功能,使蛋白

酶活性、生物膜形成能力受到影响。

rseB 编码一种细胞质蛋白,与内层锚定蛋白 RscA 结合,调节膜内蛋白水解与蛋白酶活性(Kim *et al.*, 2010); *thiQ* 编码硫胺素 ABC 转运 ATP 结合蛋白,参与细菌的能量代谢,该基因的缺失不仅使细菌整体的能量代谢下降,还使细菌的生长减慢,细菌生物膜合成所需的蛋白、胞外多糖等合成能力减弱(Huang *et al.*, 2014)。*potD* 编码一种胞浆蛋白,参与亚精胺和腐胺的转运(Shah *et al.*, 2008)。因此,这些基因的缺失可能导致鳃弧菌多种蛋白或蛋白酶合成能力、转运能力下降,间接影响蛋白酶的活性。这些基因对蛋白酶活性的影响机制有待阐明。

ilvH 编码乙酰乳酸合酶,催化 2-乙酰乳酸的合成,参与三羧酸循环(Zhao *et al.*, 2013); *grpB* 编码 2-甲基异柠檬酸裂解酶,促进 2-甲基异柠檬酸酯催化丙酮酸和琥珀酸酯的形成,参与碳源合成(Hubstenberger *et al.*, 2015),说明 *ilvH* 和 *grpB* 与 ATP 合成相关。因此,猜测这 2 个参与能量合成的基因间接影响鳃弧菌菌膜的形成,它们对菌膜形成的影响机制有待阐明。

总之,本研究通过转座子文库,鉴定出 8 个与鳃弧菌运动、胞外蛋白酶活性、菌膜形成有关的基因。由于转座子的插入突变可能会引发极性效应,使得插入位点的下游基因受到影响。因此,后期还需要通过基因敲除、基因回补实验来确证它们与表型变化的关系,在此基础上研究基因的功能及作用机制。

参 考 文 献

- Austin B, Alsina M, Austin DA, *et al.* Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: A comparison of different methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 1995, 18(2): 285–302
- Austin B, Austin D. Characteristics of the pathogens: Gram-negative bacteria. In: *Bacterial fish pathogens*. Springer Praxis Books. Springer, Dordrecht, 2007
- Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, *et al.* Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9084–9089
- Croxatto A, Chalker VJ, Lauritz J, *et al.* VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6): 1617–1629
- Ding S, Li SF, Li J, *et al.* Long-term protection effect of *Vibrio anguillarum* trivalent inactivated vaccine. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 137–142 [丁山, 李淑芳, 李杰, 等. 鳃弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 137–142]

- Fahmin T, Port GC, Cho KH. c-di-AMP: An essential molecule in the signaling pathways that regulate the viability and virulence of gram-positive bacteria. *Genes (Basel)*, 2017, 8(8): 197
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(9): 643–661
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 95–108
- Hao B, Mo ZL, Xiao P, *et al.* Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation, and virulence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2575–2585
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(11): 6557–6567
- Hirono I, Masuda T, Aoki T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 1996, 21(3): 173–182
- Huang H, Tao YX. A small molecule agonist *thiQ* as a novel pharmacoperone for intracellularly retained melanocortin-4 receptor mutants. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10(8): 817–24
- Hubstenberger A, Cameron C, Noble SL, *et al.* Modifiers of solid RNP granules control normal RNP dynamics and mRNA activity in early development. *Journal of Cell Biology*, 2015, 211(3): 703–716
- Kamoun F, Fguira IB, Tounsi A, *et al.* Generation of mini-Tn10 transposon insertion mutant library of *Bacillus thuringiensis* for the investigation of genes required for its bacteriocin production. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(2): 141–149
- Kim DY, Kwon E, Choi JK, *et al.* Structural basis for the negative regulation of bacterial stress response by RseB. *Protein Science*, 2010, 19(6): 1258–1263
- Kohlhaw GB. Leucine biosynthesis in fungi: Entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(1): 1–15
- Lazarevic V, Soldo B, Médico N, *et al.* *Bacillus subtilis* α -phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 39–45
- Lee C, Lee S, Shin SG, *et al.* Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: Absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 371–376
- Lindell K, Fahlgren A, Hjerde E, *et al.* Lipopolysaccharide O-antigen prevents phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin epithelial cells. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37678
- Ma H, Wang X, Zhang Y, *et al.* The diversity, distribution and function of N-acyl-homoserine lactone (AHL) in industrial anaerobic granular sludge. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 116–124
- Milton DL, O'Toole R, Hörstedt P, *et al.* Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1310–1319
- Mo ZL, Guo DS, Mao YX, *et al.* Identification and characterization of the *Vibrio anguillarum prtV* gene encoding a new metalloprotease. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 55–61
- Naka H, Crosa JH. Genetic determinants of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathology*, 2011, 46(1): 1–10
- Norqvist A, Norrman B, Wolf-Watz H. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 1990, 58(11): 3731–3736
- Ormonde P, Hörstedt P, O'Toole R, *et al.* Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(8): 2326–2328
- O'Toole R, Milton DL, Wolf-Watz H. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(3): 625–637
- Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(16): 8789–8793
- Pham TH, Liang ZX, Marcellin E, *et al.* Replenishing the cyclic-di-AMP pool: Regulation of diadenylate cyclase activity in bacteria. *Current Genetics*, 2016, 62(4): 731–738
- Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, *et al.* Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53(Pt 9): 841–853
- Shah P, Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(1): 4–16
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The LANCET*, 2001, 358(9276): 135–138
- Tian H, Zhang Q, Zhu JS. New phosphodiesterase and its new function. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2003, 19(6): 458–460 [田慧, 张奇, 朱景申. 新的磷酸二酯酶及其功能. *中国临床药理学杂志*, 2003, 19(6): 458–460]
- Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21: 319–346
- Weber B, Hasic M, Chen C, *et al.* Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(12): 3018–3028
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, *et al.* The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6695–6703
- Wilson AC, Perego M, Hoch JA. New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(3): 332–335

- Xie C, Zhang B, Wang D, *et al.* Molecular cloning and characterization of an achene-seed-specific promoter from motherwort (*Leonurus japonicus* Hoult). *Biotechnology Letters*, 2011, 33(1): 167–172
- Yang MC. *Veterinary statistics*. Beijing: China Prospect Press, 1990 [杨茂成. 兽医统计学. 北京: 中国展望出版社, 1990]
- Zhao Y, Niu C, Wen X, *et al.* The minimum activation peptide from *ilvh* can activate the catalytic subunit of AHAS from different species. *ChemBiochem*, 2013, 14(6): 746–752
- Zhou MY, Wang GL, Li D, *et al.* Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79668

(编辑 马璀璨)

Construction of A mini-Tn10 Transposon Library to Identify Genes Associated with Several Phenotypes of *Vibrio anguillarum* M3

LI Qian¹, LI Guiyang², LI Jie², MO Zhaolan^{1,2}①

(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 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 The phenotypic characteristics of *Vibrio anguillarum* are related to the pathogenicity of the bacteria, such as swimming motion, ability of membrane formation, and extracellular protease production. To identify the genes affecting phenotypic changes in *V. anguillarum*, this study used transposon mini-Tn10 (pLOF/Kana) to construct a library of *V. anguillarum* M3 mutant strains and to screen the strains and related genes that affect phenotypic changes. It is proved that there is a certain correlation between mutants causing these phenotypic changes and the virulence. Mutations of 1152 strains of M3 mutant library were screened, and mutant strains with significant changes in swimming ability (strain 6G_1), casein enzyme activity (strains 5A_11, 7B_12, and 7E_12), gelatin enzyme activity (strain 7H_1), and biofilm formation ability (strains 5E_2, 6A_2, and 6E_12) were noted. Further analysis revealed that a phosphodiesterase-related gene mutation caused increased swimming capacity ($P<0.05$), *leuD*, *rseB*, and *thiQ* mutations caused a significant decrease in caseinase activity ($P<0.05$), and *potD* mutations caused a significant decrease in gelatinase activity ($P<0.05$). Moreover, mutations in *leuO*, *ilvH* and *grpB* resulted in a significant decrease in the ability to form bacterial membranes ($P<0.05$). Moreover, we observed a virulent infection in these mutant strains, which showed that LD₅₀ of wild type M3 was 2.04 times higher than that of 6G_1 and the virulence was relatively increased. Additionally, 5A_11, 7B_12, and 7E_12 LD₅₀ were 2.96 times, 3.25 times, and 3.36 times higher than that of wild-type M3, respectively. The LD₅₀ with the strain 7H_1 was 1.25 times higher than that of wild M3, and the LD₅₀ with the strains 5E_2, 6A_2, and 6E_12 were 3.34, 4.08, and 1.84 times higher than that of wild M3, respectively. These results lay a foundation for further study on the pathogenic mechanism of *V. anguillarum*.

Key words *Vibrio anguillarum*; mini-Tn10 transposon; Mutant library; Phenotype; Gene

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190810001

http://www.yykxjz.cn/

张家源, 张洪才, 陈舜胜. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 168-176
Zhang JY, Zhang HC, Chen SS. Optimization of extraction process of protamine from *Takifugu obscurus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 168-176

暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究*

张家源^{1,2} 张洪才^{1,2} 陈舜胜^{1,2①}

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 国家淡水水产品加工技术研发分中心(上海)
食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306)

摘要 以暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)精巢组织为原料, 采用酸提法提取鱼精蛋白。以得率为指标, 通过正交实验, 确定了最佳的提取参数。结果显示, 提取鱼精蛋白的影响因素重要性依次为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量; 最佳提取工艺条件: 硫酸浓度为 0.2 mol/L、硫酸用量为 2.5 倍、提取次数为 2 次、95%乙醇用量为 2.5 倍。在此工艺条件下, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率为 3.82%, 蛋白含量达 89.01%。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)可知, 提取的粗鱼精蛋白有 2 个条带, 分子量分别在 25 和 20 kDa 附近。分析其氨基酸组成发现, 暗纹东方鲀鱼精蛋白属于双鱼精蛋白, 其中, 精氨酸和丙氨酸含量相对较高, 分别占 31.40%和 17.39%。本研究对暗纹东方鲀鱼精蛋白更好地应用在食品和医药领域具有重要意义。

关键词 暗纹东方鲀; 鱼精蛋白; 提取; 工艺优化

中图分类号 TS254.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0020-09

鱼类的精巢俗称鱼白, 因其具有特殊的气味, 常被作为废弃物丢弃, 是鱼类加工的副产品之一。从鱼类的精巢中可以提取到一种碱性蛋白质, 即鱼精蛋白。鱼精蛋白(Protamine)又称精蛋白, 是一种高度聚阳离子肽, 可代替精子细胞中的组蛋白, 当其与 DNA 结合时形成核蛋白, 等电点在 11~13 之间(Xie *et al.*, 2018; Egawa *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2019; Potter *et al.*, 2005)。鱼精蛋白的分子量较小, 由 30~50 个氨基酸组成, 可溶于水, 不溶于丙酮、乙醚等有机溶剂, 富含核酸、蛋白和微量元素等活性成分(陈金梅等, 2015)。由于鱼精蛋白特殊的生物学组成而使其异于其他蛋白质有着独特的功能。鱼精蛋白是肝素唯一的拮抗剂, 可用于外科手术后中和肝素, 同时, 由于鱼精蛋白具有良好的生物相容性, 因此, 可作为运输药物的载体(Gill *et al.*, 2006; Kishimoto *et al.*, 2012; Park *et al.*,

2017; González-Aramundiz *et al.*, 2015; Sommers *et al.*, 2017)。此外, 鱼精蛋白还可作为一些食品中的抗菌成分应用在食品保鲜领域, 具有安全性高、抗菌性能好、热稳定性高等优点。其在碱性条件下具有明显的抗菌活性, 是一种很有前途的抗菌剂(Guan *et al.*, 2017)。因此, 无论在医学领域还是食品领域, 鱼精蛋白都有着重要的作用和应用价值。

鱼精蛋白常以 DNA-蛋白质的形态存在, 其结合键不牢固, 易断开, 可用硫酸将其断开, 制成鱼精蛋白硫酸盐, 再用有机溶剂析出沉淀(李若绮等, 2014)。提取反应过程: DNA-蛋白质+H₂SO₄→硫酸鱼精蛋白+DNA+H₂O(吴燕燕等, 1999)。对 DNA-核蛋白和 RNA-核蛋白溶解度的研究发现, 当 NaCl 浓度为 0.14 mol/L 时, DNA-核蛋白溶解度仅为水中溶解度的 1%, 而 RNA-核蛋白有相当大的溶解度, 因此,

* 国家自然科学基金面上项目(31471685)和上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)共同资助 [The work was supported by National Natural Science Foundation of China (31471685), and Shanghai University Knowledge Service Platform Project (ZF1206)]. 张家源, E-mail: JYZhangshou@163.com

① 通讯作者: 陈舜胜, 教授, E-mail: sschen@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-08-10, 收修改稿日期: 2019-08-30

选用 0.14 mol/L NaCl 来沉淀 DNA-核蛋白(谢俊杰等, 2002)。因鱼的种类不同, 提取得到的鱼精蛋白也存在较大差异。目前, 国内外学者主要从鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)和鲱鱼(*Clupea pallasii*)的成熟精巢中提取鱼精蛋白, 而对河鲀(*Tetraodontidae*)鱼精蛋白的研究较少。河鲀, 又名鲀、吹肚鱼、气泡鱼等, 属硬骨鱼纲、鲀形目、鲀科、东方鲀属, 主要分布在我国渤海、东海、黄海及江河下游, 为近海与河川底层肉食性海产有毒鱼类(杨春等, 2003)。野生河鲀毒性较高, 而人工养殖的河鲀基本无毒。中国河鲀资源丰富, 据统计, 中国海水养殖河鲀产量约为 23000 t, 淡水养殖河鲀产量约为 5000 t。暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)是主要养殖种类之一, 主要养殖区域是江苏、广东和福建地区(张迪等, 2017)。江苏地区主要为淡水养殖河鲀, 产量约占全国总河鲀淡水养殖的 68%。

本研究以暗纹东方鲀精巢为原料, 采用酸法提取鱼精蛋白, 通过 6 个单因素实验, 探讨硫酸浓度、硫酸用量、提取时间、提取次数、提取温度和 95%乙醇用量对鱼精蛋白提取的影响, 并通过正交法优化其提取工艺, 得到最佳提取工艺条件, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)分析暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量, 并对其氨基酸含量进行测定。本研究对河鲀精巢的高效利用具有重大意义, 以期河鲀鱼精蛋白可以更好地应用在食品和医药领域。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

暗纹东方鲀精巢(2019年2月, 冷冻运输)江苏中洋集团提供。

NaCl、95%乙醇、丙酮、乙醚和硫酸(均为分析纯), 国药集团上海化学试剂有限公司; 考马斯亮蓝染色液 G-250、SDS-PAGE 电泳液、BeyoGel™SDS-PAGE 预制胶(4%~20%), 上海碧云天生物技术有限公司; 2×Protein Loading Buffer, 天根生化科技(北京)有限公司; Real Band 蛋白预染, 美国 Marker Bio Basic Inc (BBI); 蛋白定量测试盒, 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

FJ-200 高速分散均质机, 上海标本模型厂; GL-26M/MI 立式高速冷冻离心机, 上海赵迪生物科技有限公司; AUW320 电子分析天平, 日本岛津公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; UV-1800PC 紫

外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 氨基酸自动分析仪 L-8800, 日本日立公司; LGJ-12 冷冻干燥机, 河南兄弟仪器设备有限公司; DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; TY-80A/S 脱色摇床, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; DYCZ-24DN 电泳槽、DYY-6C 型电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 将暗纹东方鲀精巢组织解冻后, 用蒸馏水清洗干净(主要去除附着的杂物, 如结缔组织、腺体、脂肪等), 沥干水分, 分装在密封袋中(每袋约 200 g), -30℃冷藏备用。

1.3.2 原料基本营养成分测定 水分测定参考(GB 5009.3-2016)《食品中水分的测定》中的直接干燥法; 灰分测定参考(GB 5009.4-2016)《食品中灰分的测定》中的食品中总灰分的测定; 蛋白质测定参考(GB 5009.5-2016)《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法; 脂肪测定参考(GB 5009.6-2016)《食品中脂肪的测定》中的索氏抽提法。

1.3.3 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺 工艺流程: 解冻后的精巢组织→捣碎→匀浆→离心→弃上清液, 沉淀重复操作 1 次→H₂SO₄ 溶液提取→离心→收集离心的上清液→过滤→冷乙醇沉淀→丙酮洗涤→乙醚洗涤→冷冻干燥→鱼精蛋白粗品。

参照白婵等(2018)和曹文红等(2017)的方法稍作修改。称取 100 g 暗纹东方鲀精巢于组织捣碎机中, 加入 2 倍体积 0.14 mol/L 的 NaCl 溶液, 匀浆 1 min, 冰浴搅拌 15 min, 静置 15 min, 于 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀重复操作 1 次, 收集沉淀, 加入 H₂SO₄, 在一定温度下提取一定时间, 4℃、10000 r/min 离心 10 min, 收集离心的上清液, 过滤, 滤液用一定体积的 95%乙醇冰浴沉淀过夜后离心, 所得沉淀用丙酮洗涤 2 次, 乙醚洗涤 1 次, 冷冻干燥即得暗纹东方鲀鱼精蛋白粗品。

1.3.4 硫酸提取法提取条件单因素实验

(1)硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响 设定硫酸用量为 3 倍(ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95%乙醇用量为 3 倍(ml/g), 分别控制硫酸浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 mol/L, 探讨硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(2)硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响 设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95%乙醇用量为 3 倍(ml/g), 分别控制硫酸用量为 1、2、3、4 和 5 倍, 探

讨硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(3) 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取次数为 1、2、3、4 和 5 次, 探讨提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(4) 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取 2 次, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h, 探讨提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(5) 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍

(ml/g), 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取温度为 10℃、20℃、30℃、40℃ 和 50℃, 探讨提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(6) 95% 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 分别控制 95% 乙醇用量为 1、2、3、4 和 5 倍, 探讨 95% 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

1.3.5 硫酸提取法正交实验 根据单因素实验结果, 选择硫酸浓度、硫酸用量、提取次数和 95% 乙醇用量进行 $L_9(3^4)$ 正交实验, 以确定暗纹东方鲀鱼精蛋白的最佳提取工艺条件, 实验因素与水平设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺正交实验设计因素水平

Tab.1 Factors and their levels used in $L_9(3^4)$ orthogonal design of the extraction of *T. obscurus* protamine experiments

水平 Level	A: H ₂ SO ₄ 浓度 Sulfuric acid concentration (mol/L)	B: H ₂ SO ₄ 用量 Sulfuric acid dosage (倍)	C: 提取次数 Number of extractions (次)	D: 95% 乙醇用量 95% ethanol dosage (倍)
1	0.2	2.5	1	2.5
2	0.3	3.0	2	3.0
3	0.4	3.5	3	3.5

1.3.6 暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的测定 准确称取 10 mg 提取的粗鱼精蛋白, 用生理盐水定容至 10 ml, 配制成 1 mg/ml 的蛋白溶液。再用蛋白定量试剂盒进行测定。

蛋白质提取率按公式(1)计算:

$$R_1 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, R_1 为暗纹东方鲀鱼精蛋白得率(%), A_1 为蛋白质量(g), A_0 为暗纹东方鲀精巢质量(g)。

1.3.7 暗纹东方鲀鱼精蛋白相对分子质量的测定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE) 对提取的暗纹东方鲀鱼精蛋白进行分析, 以确定该鱼精蛋白的相对分子质量。100 v 恒压电泳约 100 min, 至溴酚蓝迁移至距凝胶下端约 1 cm 处, 停止电泳, 取出凝胶, 用考马斯亮蓝染色液染色 30 min, 再用脱色液脱色至背景褪色、条带清晰可见 (Compton *et al.*, 1985; Sedmak *et al.*, 1977; Schägger, 2006)。测量迁移距离, 计算相对迁移率(R_f) (徐明生等, 2004)。

1.3.8 暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成 采用 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定方法》进行样品前处理。

氨基酸自动分析仪条件: 色谱柱(4.6 mm I.D. × 60.0 mm); 分离树脂: 阳离子交换树脂; 柱温度: 57℃; 检测波长: 570 nm(脯氨酸 440 nm); 1 通道缓冲溶液流速: 0.40 ml/min; 反应液: 茚三酮试剂; 2 通道反应液流速: 0.35 ml/min; 进样量: 20 μl。

1.4 数据处理

所测结果为 3 次重复实验的平均值, 采用 Origin 8.5 软件进行作图, SPSS Statistics 17.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 暗纹东方鲀精巢基本成分

暗纹东方鲀精巢的营养成分见表 2。从表 2 可以看出, 含水量较高, 达 80.22%; 其次是粗蛋白, 占湿重的 14.66%; 脂肪含量较低, 仅占湿重的 1.73%。通过计算, 粗蛋白占暗纹东方鲀精巢干重的 74.12%, 脂肪占 8.75%, 说明暗纹东方鲀精巢是富含蛋白质, 而脂肪含量很低的产品, 与胡晓璐等(2013)研究的鲀鱼精巢组织基本成分的结论一致。

表 2 暗纹东方鲀精巢的基本成分
Tab.2 Basic composition of the *T. obscurus* testis

成分 Composition	水分 Water	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	灰分 Ash
含量 Content (%)	80.22	14.66	1.73	1.60

注: 各组分含量按湿重计

Note: The content of every composition was counted on wet weight

2.2 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺单因素实验

2.2.1 硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图 1。低浓度的硫酸对鱼精蛋白提取不完全, 硫酸与鱼精蛋白结合较少, 生成的鱼精蛋白硫酸盐较少, 得率较低, 适当提高硫酸浓度, 可帮助拆分核酸与目标蛋白之间的键, 提高目标蛋白得率, 当浓度达到 0.3 mol/L 时, 蛋白的提取接近饱和, 得率为 3.51%, 出现峰值后, 得率会随浓度的增大而降低, 此时, 高浓度的硫酸会使蛋白质暴露出更多的疏水基团 (Omana *et al.*, 2010), 从而破坏蛋白结构, 导致蛋白质可能被部分水解, 降低了鱼精蛋白的含量。该结果与刘淑集等(2019)的研究一致, 均表现出相对较高浓度的硫酸会使鱼精蛋白的得率下降。从图 1 中还可以看出, 暗纹东方鲀鱼精蛋白受硫酸浓度影响明显, 所以选择硫酸浓度值为 0.3 mol/L 为最适宜条件。

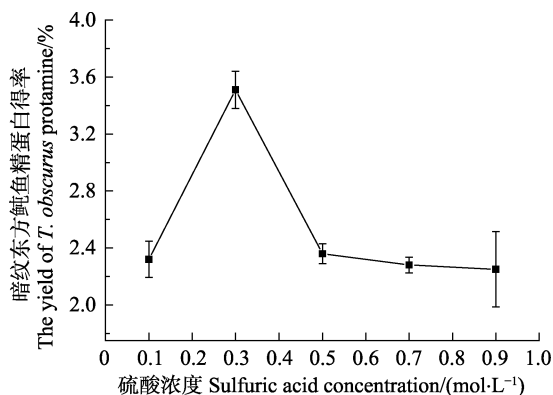


图 1 硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响
Fig.1 Effect of sulfuric acid concentration on the yield of *T. obscurus* protamine

2.2.2 硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

硫酸用量对得率的影响见图 2。硫酸用量从 1 ml/g (体积与质量比, 下同)增加到 5 ml/g 时, 鱼精蛋白得率呈先升高、后降低, 最后趋于平稳的变化趋势。当硫酸用量较少时, 体系过小而导致鱼精蛋白溶解不完全, 适当增加硫酸提取液有助于鱼精蛋白溶出, 当硫酸用量为 3 ml/g 时, 鱼精蛋白得率最高, 蛋白质溶出达到饱和, 继续增加硫酸用量, 鱼精蛋白得率出现小

幅度降低, 主要是因为提取液体积过大, 增加了操作体系的整体规模, 也增大了操作过程中的损失率, 因而对得率产生负面影响。故使得蛋白得率最大化的最佳硫酸用量为 3 ml/g。

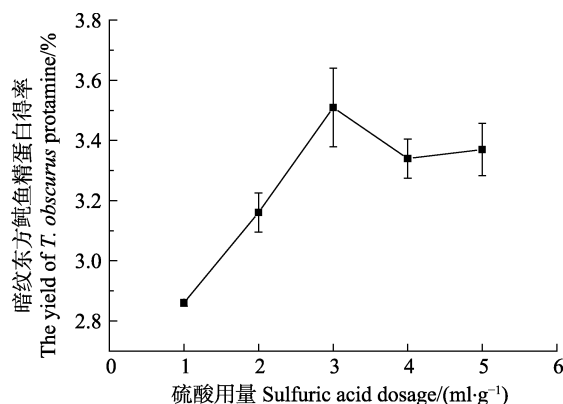


图 2 硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响
Fig.2 Effect of sulfuric acid dosage on the yield of *T. obscurus* protamine

2.2.3 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取次数对鱼精蛋白得率的影响见图 3。暗纹东方鲀鱼精蛋白经过 2 次提取后, 继续增加提取次数时, 得率反而降低, 说明残渣中可提取的鱼精蛋白在第 2 次基本被提取完全, 继续重复提取只会增加操作过程中的损失, 降低鱼精蛋白得率。因此, 提取次数 2 次为最佳。

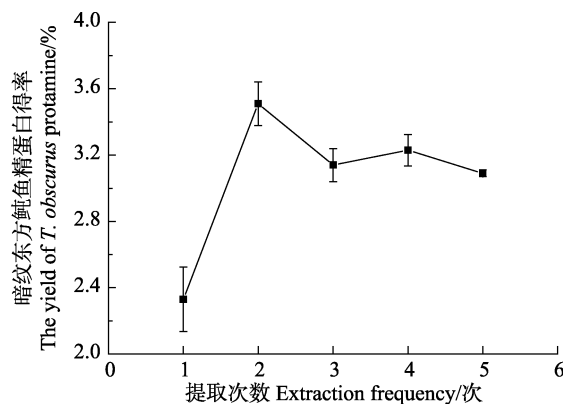


图 3 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响
Fig.3 Effect of extraction frequency on yield of *T. obscurus* protamine

2.2.4 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图4。随着提取时间从0.5 h延长到2.5 h,暗纹东方鲀鱼精蛋白得率整体呈下降趋势,说明延长提取时间不能提高鱼精蛋白的得率。从加入硫酸开始提取计时,0.5 h前,硫酸会辅助鱼精蛋白与核酸之间的键断开,随着时间的增加,得率逐渐降低,可能是因为之前被分离出来的鱼精蛋白被酸水解,因此,绝大多数的精蛋白都在0.5 h内被提取出来。综合来看,0.5 h时,鱼精蛋白溶解量与损失量差值达到最大化,得率较高,提取较为充分,故选取提取时间为0.5 h比较合适。

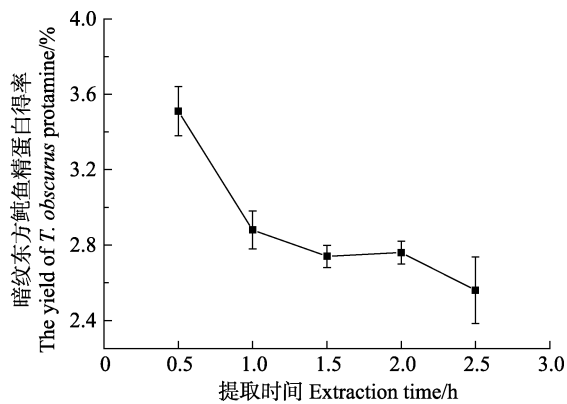


图4 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响
Fig.4 Effect of extraction time on the yield of *T. obscurus* protamine

2.2.5 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图5。温度较低时,对鱼精蛋白得率产生副作用,当温度从10℃升高到50℃时,鱼精蛋白得率呈现先升高后趋于平稳的趋势。因为适当升高温度可使分子的运动速度加快,提高了蛋白的溶出率(洪晶等,2013)。继续增加温度,鱼精蛋白得率没有明显升高,而是在此基础上浮动,说明该鱼精蛋白的耐热性较好,不易受温度的影响而变性。总体来看,温度对河鲀鱼精蛋白的提取率影响并不大,提取得到的蛋白均为白色,因此,在简化提取条件和节约操作成本的角度考虑,选取室温提取比较好。

2.2.6 95%乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响 乙醇用量对鱼精蛋白得率的影响见图6。随着乙醇用量的增大,暗纹东方鲀鱼精蛋白得率呈先增长后降低的趋势,用量3倍时,得率达到最高点,继续增加乙醇用量,鱼精蛋白得率呈缓慢下降趋势,可能是乙醇用量过大,破坏了蛋白的结构,影响得率。因此,最佳用量为3 ml/g。

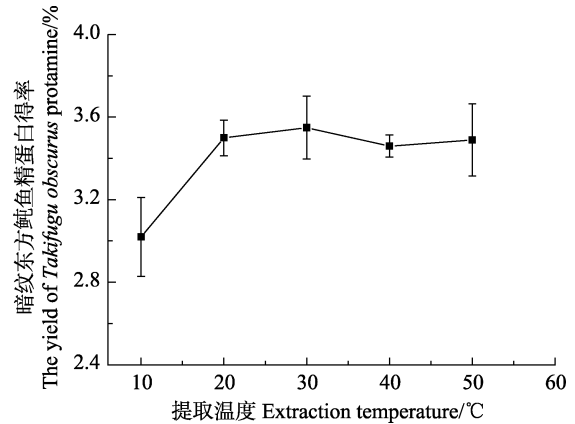


图5 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响
Fig.5 Effect of extraction temperature on the yield of *T. obscurus* protamine

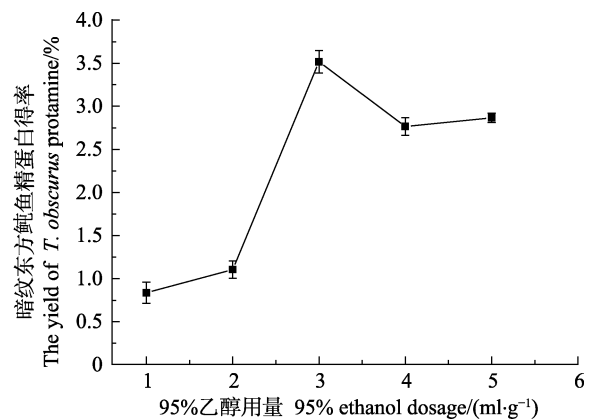


图6 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响
Fig.6 Effect of icy ethyl alcohol dosage on the yield of *T. obscurus* protamine

2.3 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺优化

根据单因素实验结果,分别以硫酸浓度、硫酸用量、提取次数和95%乙醇用量为考察因素,以暗纹东方鲀鱼精蛋白得率为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 进行正交实验,优化最佳提取条件,结果见表3。

由表3可知,在9个实验设计组中,第4组的提取效果最好,蛋白得率达到3.04%;其次为第2组,蛋白得率达到3.01%;由极差分析可知,影响暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的因素主次为: C>B>A>D,即提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。暗纹东方鲀鱼精蛋白提取最优工艺组合为 $A_1B_1C_2D_1$,即硫酸浓度为0.2 mol/L、硫酸用量为2.5倍、提取次数为2次、冷乙醇用量为2.5倍。该工艺条件下提取的鱼精蛋白得率可达3.82%,高于各实验组中暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率。

表 3 $L_9(3^4)$ 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺正交实验结果
Tab.3 $L_9(3^4)$ orthogonal result of the extraction of *T. obscurus* protamine

实验号 Test number	A: H ₂ SO ₄ 浓度 Sulfuric acid concentration (mol/L)	B: H ₂ SO ₄ 用量 Sulfuric acid dosage (倍)	C: 提取次数 Number of extractions (次)	D: 95%乙醇用量 95% ethanol dosage (倍)	河鲀鱼精蛋白得率 Puffer-fish protamine yield (%)
1	1	1	1	1	2.09
2	1	2	2	2	3.01
3	1	3	3	3	1.81
4	2	1	2	3	3.04
5	2	2	3	1	1.87
6	2	3	1	2	1.37
7	3	1	3	2	1.69
8	3	2	1	3	1.59
9	3	3	2	1	2.61
K_1	6.91	6.82	5.05	6.57	
K_2	6.28	6.47	8.66	6.07	
K_3	5.89	5.79	5.37	6.44	
k_1	2.303	2.273	1.683	2.190	
k_2	2.093	2.157	2.887	2.023	
k_3	1.963	1.930	1.790	2.147	
R	0.340	0.343	1.204	0.167	
最优水平 Optimal level	A ₁	B ₁	C ₂	D ₁	

由表 4 可知, 校正模型具有显著性, 其中, 硫酸浓度(A)、硫酸用量(B)对提取率的影响($P < 0.05$), 提取次数(C)对提取率的影响($P < 0.01$), 95%乙醇用量(D)对提取率的影响($P > 0.05$), 依次对应与蛋白得

率的关系依次为显著、显著、极显著和不显著。四者在暗纹东方鲀鱼精蛋白提取过程中需重点控制的顺序为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。

表 4 正交实验方差分析
Tab.4 Analysis of variance of the experimental results of orthogonal array design

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squared deviation	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
校正模型 Correction model	6.165	8	0.771	28.406	<0.0001	**
截距 Intercept	80.772	1	80.772	2977.467	<0.0001	**
A: 硫酸浓度 Sulfuric acid concentration	0.353	2	0.177	6.510	0.0178	*
B: 硫酸用量 Sulfuric acid dosage	0.373	2	0.186	6.868	0.0154	*
C: 提取次数 Number of extractions	5.348	2	2.674	98.575	<0.0001	**
D: 95%乙醇用量 95% ethanol dosage	0.091	2	0.045	1.670	0.2416	
误差 Error	0.244	9	0.027			

*: 差异显著, $P < 0.05$; **: 差异极显著, $P < 0.01$

*: The difference is significant, $P < 0.05$; **: The difference is highly significant, $P < 0.01$

2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)确定暗纹东方鲀精巢中抗菌活性蛋白的相对分子量及分析其成分组成见图7。由图7可知,所提取的暗纹东方鲀精巢组织中的抗菌活性蛋白组分由2个条带组成,主体成分相对分子量在17~25 kDa之间。经计算,暗纹东方鲀鱼精蛋白2条区带的相对迁移率(R_f)分别为0.7814和0.8772。以标准蛋白分子量的对数为纵坐标,相对迁移率(R_f)为横坐标,进行直线回归分析(图8),回归系数 $R^2=0.9934$,回归方程为 $Y=-1.1073X+2.2321$ 。暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量分别为23.27和18.23 kDa。在相关鱼类精巢抗菌活性蛋白的研究中,此抗菌活性蛋白的相对分子质量大于徐明生等(2004)测得鲤鱼(*Cyprinus carpio*)抗

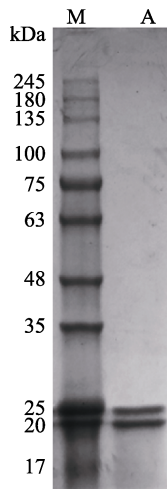


图7 暗纹东方鲀鱼精蛋白 Tricine-SDS-PAEG 电泳
Fig.7 *T. obscurus* protamine
Tricine-SDS-PAEG electrophoresis

M: 预染蛋白 Marker; A: 暗纹东方鲀鱼精蛋白
M: Pre-stained protein marker; A: *T. obscurus* protamine

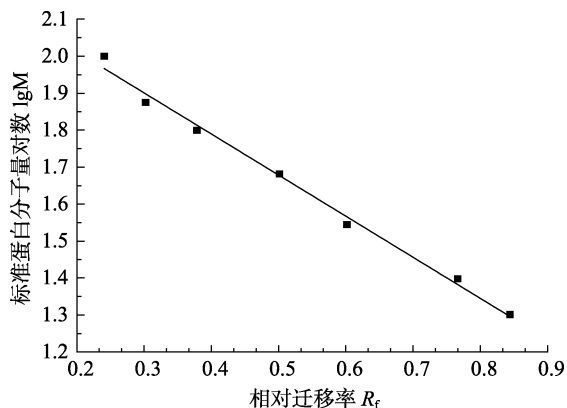


图8 相对分子量标准曲线
Fig.8 Standard curve of the molecular weight

菌鱼精蛋白纯品的分子量(15.32 kDa)。本研究提取的暗纹东方鲀粗鱼精蛋白有2个条带,分析其原因主要有2点,一是样品中含有其他杂蛋白,二是该蛋白质分子具有几个亚基。也有研究表明,鱼类精巢抗菌活性蛋白组分并不单一,它是由互相类似的数种成分组成。

2.5 暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成

暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成见表5,从表5中可以看出,丙氨酸和精氨酸是该鱼精蛋白的主要氨基酸,相对含量分别为17.39%和31.40%,约占总氨基酸的50%。这与刘红玉等(2007)研究的大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的氨基酸组成较为类似,均含有较高的精氨酸。碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)占31.87%,与鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)中碱性氨基酸含量相近(谢俊杰等,2001)。但与俞加林(1994)文中提到的精氨酸占2/3以上的结果有明显差别。分析其原因可能是随着时间的延长,人工养殖的河鲀由于食物、地理位置和环境等差异,导

表5 暗纹东方鲀鱼精蛋白氨基酸组成分析
Tab.5 Amino acid composition analysis of
T. obscurus protamine

氨基酸种类		含量	相对含量
Amino acid type		Content (g/100 g)	Relative content
天冬氨酸	Asp	3.07	4.84
苏氨酸	Thr*	3.07	4.84
丝氨酸	Ser	3.56	5.61
谷氨酸	Glu	3.01	4.75
甘氨酸	Gly	3.93	6.70
丙氨酸	Ala	11.03	17.39
缬氨酸	Val*	3.72	5.86
甲硫氨酸	Met*	0.34	0.54
异亮氨酸	Ile*	2.23	3.52
亮氨酸	Leu*	3.98	6.27
酪氨酸	Tyr	1.56	2.46
苯丙氨酸	Phe*	1.51	2.38
赖氨酸	Lys*	-	-
组氨酸	His	0.3	0.47
精氨酸	Arg	19.92	31.40
脯氨酸	Pro	2.24	3.53
半胱氨酸	Cys	-	-
总氨基酸量		63.43	100.00
Total amino acid amount			
总必需氨基酸量		14.85	23.41
Total essential amino acid amount			

*: 必需氨基酸; -: 未检测到

*: Essential amino acid; -: Not detected

致目前河鲀精巢的氨基酸组成与过去有所差异。根据氨基酸的组成和种类, 可将鱼精蛋白分为 3 类, 分别是单鱼精蛋白、双鱼精蛋白和双鱼精蛋白。因暗纹东方鲀鱼精蛋白含有精氨酸和组氨酸, 所以属于双鱼精蛋白。

3 结论

本研究采用硫酸提取法提取暗纹东方鲀鱼精蛋白, 通过正交实验法优化得到最佳提取工艺: 硫酸浓度为 0.2 mol/L、硫酸用量为 2.5 倍、提取次数为 2 次、冷乙醇用量为 2.5 倍。影响暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的因素主次为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率影响较小, 说明暗纹东方鲀鱼精蛋白具有很好的耐热性。在最佳提取工艺条件下, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率最大为 3.82%。由 Tricine-SDS-PAGE 电泳可知, 鱼精蛋白的分子量较小, 粗提法得到的鱼精蛋白经电泳后出现 2 个条带, 说明该粗鱼精蛋白杂质较少。经计算, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量分别为 23.27 和 18.23 kDa。丙氨酸和精氨酸是该鱼精蛋白的主要氨基酸, 相对含量分别为 17.39% 和 31.40%, 约占总氨基酸的 50%。根据氨基酸的组成种类和数量来分, 暗纹东方鲀鱼精蛋白属于双鱼精蛋白。该研究为河鲀鱼精蛋白的高效利用奠定理论基础。接下来可对该鱼精蛋白的理化特性进一步研究。

参 考 文 献

- Bai C, Rao DH, Xiong GQ, *et al.* Enzymatic extraction optimization of protamine peptides from sturgeon by response surface methodology. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(4): 180–185 [白婵, 饶丹华, 熊光权, 等. 响应面法优化鲟鱼精蛋白肽的酶解提取. *食品与发酵工业*, 2018, 44(4): 180–185]
- Cao WH, Liu ZJ, Lin Y, *et al.* Optimization of the extraction technology and preliminary study on antibacterial activity of protamine from the testis of Giant grouper. *Food Science and Technology*, 2017, 42(11): 261–265 [曹文红, 刘忠嘉, 林芸, 等. 中巨石斑鱼精巢鱼精蛋白提取工艺优化及其抗菌活性的初步研究. *食品科技*, 2017, 42(11): 261–265]
- Chen JM, Li F, Zheng YQ, *et al.* The review of comprehensive utilization with high value of squid processing by-products. *Fishery Modernization*, 2015, 42(1): 44–47 [陈金梅, 李锋, 郑允权, 等. 鱿鱼加工副产物高值化综合利用综述. *渔业现代化*, 2015, 42(1): 44–47]
- Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1985, 151(2): 369–374
- Egawa Y, Hayashida R, Seki T, *et al.* Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta*, 2008, 76(4): 736–741
- Fu XD, Liu YN, Zhu L, *et al.* Flocculation activity of carp protamine in microalgal cells. *Aquaculture*, 2019, 505: 150–156
- Gill TA, Singer DS, Thompson JW. Purification and analysis of protamine. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1875–1882
- González-Aramundiz JV, Olmedo MP, González-Fernández Á, *et al.* Protamine-based nanoparticles as new antigen delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 97(Pt A): 51–59
- Guan GM, Sha JC, Zhu DD. Heparin-MPA dual modified CdS quantum dots used as a simple and rapid label-free fluorescent sensor for protamine and hemin detection. *Microchemical Journal*, 2017, 133: 391–397
- Hong J, Chen TT, Tang MR, *et al.* Optimization of protein extraction technology from Chinese Leek seeds by response surface method. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(12): 89–96 [洪晶, 陈涛涛, 唐梦茹, 等. 响应面法优化韭菜籽蛋白质提取工艺. *中国食品学报*, 2013, 13(12): 89–96]
- Hu XL, Liu SJ, Wu CY. The extraction process research of squid protamine. *Journal of Fujian Fisheries*, 2013, 35(6): 434–440 [胡晓璐, 刘淑集, 吴成业. 鱿鱼鱼精蛋白的提取工艺优化研究. *福建水产*, 2013, 35(6): 434–440]
- Kishimoto S, Ishihara M, Takikawa M, *et al.* Novel experimental and clinical therapeutic uses of low-molecular-weight heparin/protamine microparticles. *Pharmaceutics*, 2012, 4(1): 42–57
- Li RQ, Han L, Li RR, *et al.* Optimization of ultrasonic assistant protamine extraction processing parameters using response surface methodology in bovine testes. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(16): 212–216 [李若琦, 韩玲, 李儒仁, 等. 超声波辅助提取牛睾丸中精蛋白工艺优化. *食品工业科技*, 2014, 35(16): 212–216]
- Liu HY, Jiang XF, Cui HB. Study on Extraction and antimicrobial activities of protamine from *Oncorhynchus keta* spermary. *Food Science*, 2007, 28(2): 37–39 [刘红玉, 姜学芬, 崔洪斌. 大马哈鱼鱼精蛋白的提取及抑菌作用的研究. *食品科学*, 2007, 28(2): 37–39]
- Liu SJ, Chen WY, Xu M, *et al.* Study on optimization of the extraction of protamine from *Takifugu flavidus*. *Fishery Modernization*, 2019, 46(2): 73–80 [刘淑集, 陈梧英, 许旻, 等. 菊黄东方鲀鱼精蛋白提取工艺优化研究. *渔业现代化*, 2019, 46(2): 73–80]
- Omana DA, Xu Y, Moayed V, *et al.* Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: Chemical and functional properties of recovered proteins. *Process Biochemistry*, 2010, 45(3): 375–381
- Park J, Hwang SR, Choi JU, *et al.* Self-assembled nanocomplex of PEGylated protamine and heparin-suramin conjugate for accumulation at the tumor site. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 535(1–2): 38–46
- Potter R, Hansen LT, Gill TA. Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: Importance of electrostatic interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(1): 23–34
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16–22
- Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 1977, 79(1–2): 544–552

- Sommers CD, Ye HP, Liu J, *et al.* Heparin and homogeneous model heparin oligosaccharides form distinct complexes with protamine: Light scattering and zeta potential analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 140: 113–121
- Wu YY, Li LH, Yang XQ, *et al.* Study on the extraction process of nucleoprotein and protamine. *Food Science*, 1999(7): 30–33 [吴燕燕, 李来好, 杨贤庆, 等. 核蛋白和鱼精蛋白提取工艺的研究. *食品科学*, 1999(7): 30–33]
- Xie JJ, Xiong Y, Zhao L, *et al.* Purification and identification of chub *Aristichthys nobilis* protamine. *Jiangxi Science*, 2001, 19(4): 214–217 [谢俊杰, 熊瑜, 赵利, 等. 鲢鱼(*Aristichthys nobilis*) 鱼精蛋白的纯化和鉴定. *江西科学*, 2001, 19(4): 214–217]
- Xie JJ, Zhao L, Xiong Y, *et al.* Extraction of squid protamine. *Journal of Beijing Fisheries*, 2002(5): 35–37 [谢俊杰, 赵利, 熊瑜, 等. 鲢鱼鱼精蛋白的提取. *北京水产*, 2002(5): 35–37]
- Xie M, Zhang F, Liu LJ, *et al.* Surface modification of graphene oxide nanosheets by protamine sulfate/sodium alginate for anti-cancer drug delivery application. *Applied Surface Science*, 2018, 440: 853–860
- Xu MS, Chen JP, Shang Guan XC. Separation, purification and identification a kind of protein with antibacterial activity from cyprinoid. *Science and Technology of Food Industry*, 2004, 25(10): 51–54 [徐明生, 陈锦屏, 上官新晨. 鲤鱼抗菌精蛋白的分离纯化及鉴定. *食品工业科技*, 2004, 25(10): 51–54]
- Yang C, Su XR, Li TW, *et al.* Extraction and determination of tetrodotoxin from low toxicity pufferfish. *Natural Product Research and Development*, 2003, 15(5): 398–400 [杨春, 苏秀榕, 李太武, 等. 低毒河豚鱼毒素的提取和检测. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(5): 398–400]
- Yu JL. Fish essence: New medicinal resources worth developing. *Chinese Marine Medicine*, 1994, 13(2): 53–54 [俞加林. 鱼精: 值得开发的药用新资源. *中国海洋药物*, 1994, 13(2): 53–54]
- Zhang D, Yang ZY, Zhang YL. Development status and development countermeasures of China's puffer-fish breeding industry. *Scientific Fish Farming*, 2017(12): 1–3 [张迪, 杨正勇, 张英丽. 中国河鲀养殖产业发展现状与发展对策. *科学养鱼*, 2017(12): 1–3]

(编辑 陈 辉)

Optimization of Extraction Process of Protamine from *Takifugu obscurus*

ZHANG Jiayuan^{1,2}, ZHANG Hongcai^{1,2}, CHEN Shunsheng^{1,2①}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Research and Development Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology (Shanghai), National Experimental Teaching Demonstration Center of Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306)

Abstract The fish's testis, commonly known as fish white, is often discarded as waste owing to its specific odor and is one of the by-products of fish processing. A basic protein, protamine, can be extracted from the testis of fish. Protamine has the advantages of high safety, good antibacterial performance, and high thermal stability. It can be used as an antibacterial ingredient in some foods in the field of food preservation. It has obvious antibacterial activity under alkaline conditions and is a promising antibacterial agent. Here, the testis of *Takifugu obscurus* was used as the raw material, and the protamine was extracted by acid extraction. The extraction coefficient was used to determine the optimal extraction parameters. According to the results of orthogonal test, the importance factors of the extraction of protamine are as follows: extraction times > sulfuric acid dosage > sulfuric acid concentration > 95% ethanol; optimal extraction conditions are: sulfuric acid concentration 0.2 mol/L, sulfuric acid dosage is 2.5 times, the number of extractions was 2, and the amount of 95% ethanol was 2.5 times. Under this condition, the extraction rate of protamine from *T. obscurus* was 3.82%, and the protein content was 89.01%. According to the tricine-SDS-PAGE, the extracted crude protamine has two bands with molecular weights of 25 kDa and 20 kDa, respectively. Analysis of its lytic acid composition found that arginine and alanine content were relatively higher, accounting for 31.40% and 17.39%, respectively. This study is of great significance for the efficient use of testes of puffer-fish (dark-spotted oriental carp), and also lays a theoretical foundation for the application of stag beetle (dark-spotted oriental carp) protamine in the food and pharmaceutical fields.

Key words *Takifugu obscurus*; Protamine; Extraction; Process optimization

① Corresponding author: CHEN Shunsheng, E-mail: sschen@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190820001

http://www.yykxjz.cn/

宋红梅, 屈政委, 汪学杰, 牟希东, 刘超, 刘奕, 赖明信, 胡隐昌. 印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 177-184

Song HM, Qu ZW, Wang XJ, Mu XD, Liu C, Liu Y, Lai MX, Hu YC. Analysis and assessment for nutritional components of the muscle of *Datnioides pulcher*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 177-184

印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价*

宋红梅¹ 屈政委² 汪学杰¹ 牟希东¹ 刘超¹
刘奕¹ 赖明信¹ 胡隐昌^{1①}

(1. 农业农村部休闲渔业重点实验室 广东省现代休闲渔业工程技术研究中心

中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为分析和评价印尼拟松鲷(*Datnioides pulcher*)的营养价值, 采用常规方法检测印尼拟松鲷肌肉的营养成分, 并与同科经济鱼类和常见的优质淡水鱼类进行比较。结果显示, 印尼拟松鲷肌肉中的水分、粗蛋白质、粗脂肪和粗灰分含量分别为 65.6%、19.6%、7.6%和 1.3%。在肌肉中共测得 16 种氨基酸, 总含量为 18.4%, 其中, 包含 7 种人体必需氨基酸(EAA), 占氨基酸总量(TAA)的 36.09%; 必需氨基酸指数(EAAI)为 79.46%, 符合 FAO/WHO 所规定的人体必需氨基酸的均衡模式; 印尼拟松鲷第一和第二限制性氨基酸分别是蛋氨酸和缬氨酸; 特征性鲜味氨基酸(FAA)含量为 42.15%。不饱和脂肪酸共 16 种, 总量为 68.41%, 其中, 油酸和亚油酸分别为 23.99%和 10.56%, 并且含有丰富的 DHA 和鱼油中相对缺乏的 DPA, 含量分别为 8.5%和 5.1%。研究表明, 印尼拟松鲷氨基酸含量均衡丰富, 不饱和脂肪酸含量高, 是兼具较高观赏价值和与食用价值于一身的可开发鱼类品种。

关键词 印尼拟松鲷; 肌肉; 营养成分

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0021-08

印尼拟松鲷(*Datnioides pulcher*), 亦称印度尼西亚虎鱼, 为鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidei)、松鲷科(Lobotidae)、拟松鲷属(*Datnioides*)的洄游性鱼类, 属拟松鲷鱼类中观赏性较高的一种。印尼拟松鲷原产于泰国、柬埔寨和印度尼西亚等东南亚国家, 与金龙鱼(*Scleropages formosus*)混养非常具有观赏性。

中国是拟松鲷属鱼的主要进口国之一, 在观赏鱼市场中其需求量缺口非常巨大, 近几年, 以泰国虎鱼(*Datnioides microlepis*)为标榜的亚洲拟松鲷属鱼类在中国的数量逐年增多, 但价格居高不下, 这主要

是因为拟松鲷属鱼类属于洄游性鱼类, 且雌雄难辨, 其繁育技术和规模化生产仍然面临很多挑战, 相关基础研究薄弱, 因此, 加强对印尼虎鱼进行研究, 对其开发利用具有重要意义。目前, 国内外对拟松鲷鱼类的研究鲜有报道, 仅有泰北细纹虎(*Datnioides undecimradiatus*)(Wang *et al.*, 2016a)和粗纹泰国虎(*Datnioides microlepis*)(Wang *et al.*, 2016b)相关线粒体测序分析以及银老虎(*Datnioides polota*)血细胞生化特征(Acharya *et al.*, 2018)相关报道, 鲜有关于拟松鲷鱼类相关基础研究。中国水产科学研究院珠江水产研究所

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2018 GH19)、中国东盟海上合作基金(CAME-2018F)和国家水产种质资源共享服务平台(2019DKA30470)共同资助 [This work was supported by Scientific Research Special Funds, Chinese Academy of Fishery Sciences (2018 GH19), China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F), and National Sharing Service Infrastructure of Fishery Germplasm Resources (2019DKA30470)]. 宋红梅, E-mail: shm1227@126.com

① 通讯作者: 胡隐昌, 研究员, E-mail: huyc22@163.com

收稿日期: 2019-08-20, 收修改稿日期: 2019-09-29

观赏渔业研究室于2017年经原产地引进印尼拟松鲷,构建了其稳定的繁育群体。目前,尚未见该鱼肌肉营养成分和营养价值评定相关报道。本研究通过测定和分析印尼拟松鲷肌肉的营养成分和营养品质,评估其作为食用鱼的开发利用价值,也可为印尼拟松鲷营养需求和配合饲料的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试印尼拟松鲷取自中国水产科学研究院珠江水产研究所观赏渔业养殖基地。挑15尾健康无病害的2龄养殖个体用于检测分析(图1)。个体平均体长为 (21.34 ± 1.74) cm,平均体重为 (461.00 ± 28.56) g。清水洗净样品鱼,擦干体表水分,将15尾鱼随机分成3份,每5尾鱼1份,去皮去鳞,取背部两侧肌肉,在冰浴条件下混合搅碎,称取适量鲜样,将5尾鱼的肌肉鲜样混合组成1个样本,共3个样本,每个样本约200 g,样品制备后置于 -20°C 冰箱保存待测。测量时,将样品真空冷冻干燥至恒重,研磨混匀,再将样品分为2份,分别进行一般营养成分、氨基酸和脂肪酸组成的测定。



图1 印尼拟松鲷侧面图
Fig.1 The model of *D. pulcher*

1.2 测定方法

1.2.1 常规营养成分的测定 肌肉中水分含量的测定采用GB5009.3-2016的 105°C 烘干法;粗蛋白质含量的测定采用GB5009.5-2016的凯氏定氮法;粗脂肪的测定采用GB/T 5009.6-2016的酸水解法,试样经2 mol/L盐酸水解后用无水乙醚或石油醚提取,除去溶剂即得游离态和结合态脂肪的总含量;粗灰分的测定采用GB5009.4-2016的高温灰化法。

1.2.2 氨基酸的测定 氨基酸的测定采用GB 5009.124-2016的盐酸水解法,将待测样本在水解管内经6 mol/L盐酸溶液处理,混合氨基酸标准工作液

和样品测定液,分别以相同体积注入氨基酸分析仪(日立L-8900型,日本)测定,以外标法通过峰面积计算样品中水解氨基酸的浓度;色氨酸经6 mol/L LiOH处理,采用液相色谱仪测定(安捷伦1100型,美国)。

1.2.3 脂肪酸的测定 肌肉脂肪酸的测定采用GB5009.168-2016第三法,测试样品经水解-乙醚溶液提取其中的脂肪后,在碱性条件下经过皂化和甲酯化处理,生成脂肪酸甲酯,经气相色谱仪(Finnigan公司Trace MS型,美国)分析,按峰面积归一化法计算脂肪酸组成和百分含量,所得结果与其他经济鱼类和淡水鱼类的营养成分测量结果进行比较。

1.3 肌肉营养价值评价

采用1991年中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白模式和1973年联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)建议的评分标准模式(樊佳佳等,2018;赵婷婷等,2015),计算氨基酸评分(Comprehensive evaluation in amino acids score, AAS)、化学评分(Chemical score, CS)和必需氨基酸指数(Essential amino acid index, EAAI)的公式如下:

$$\begin{aligned} \text{CS} &= \text{aa}/\text{AA}(\text{egg}) \times 100 \\ \text{AAS} &= \text{aa}/\text{AA}(\text{FAO/WHO}) \times 100 \\ \text{EAAI} &= \sqrt[n]{\frac{a}{A} \cdot \frac{b}{B} \cdot \frac{c}{C} \cdots \frac{j}{J}} \times 100\% \end{aligned}$$

式中,样品中氨基酸检测含量(%、DM)以aa表示;FAO/WHO评分标准模式中的同种氨基酸含量(%、DM)以AA(FAO/WHO)表示;全鸡蛋蛋白质中的同种氨基酸的含量(%、DM)以AA(egg)表示;必需氨基酸种类数以n表示。虎鱼肌肉中的必需氨基酸含量(%)用a、b、c……j表示,鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(%)以A、B、C……J表示。

F值:支链氨基酸和芳香族氨基酸的比值,即:
 $F\text{值} = (\text{缬氨酸} + \text{亮氨酸} + \text{异亮氨酸}) / (\text{苯丙氨酸} + \text{酪氨酸})$ 。

1.4 数据分析

用SPSS 20.0和Excel统计软件进行测试数据分析,对数据进行方差分析和Duncan's多重比较,用平均值±标准差(Mean±SD)表示实验结果。

2 结果与分析

2.1 生化组成

从表1可知,印尼拟松鲷肌肉的水分含量为 $(65.61 \pm 0.58)\%$,蛋白含量为 $(19.44 \pm 0.29)\%$ 、脂肪含量为 $(6.26 \pm 1.18)\%$ 、灰分含量为 $(1.27 \pm 0.02)\%$ 。

2.2 氨基酸组成

由表 2 可见, 印尼拟松鲷肌肉中共检测出 16 种常见氨基酸, 包括 7 种人体必需氨基酸(Essential amino acids, EAA)、2 种半必需氨基酸、7 种非必需氨基酸(Nonessential amino acid, NEAA)和 5 种鲜味氨基酸(Delicious amino acids, DAA)。含量最高的 4 种氨基酸依次分别为谷氨酸(3.04%)、天冬氨酸(1.79%)、

赖氨酸(1.69%)和亮氨酸(1.42%); 组氨酸含量最低, 为 0.34%。印尼拟松鲷肌肉氨基酸总含量(TAA)为 18.72%(鲜样), 必需氨基酸总量为 6.81%, 非必需氨基酸总量的为 9.40%。印尼拟松鲷肌肉氨基酸总量高于草鱼(*Ctenopharynodon idellus*) (15.52%)、养殖斑尾复虾虎鱼(*Synechogobius ommaturus*) (15.59%)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*) (13.80%) 和短须裂腹鱼(*Schizothorax wangchiachii*) (10.88%)等(表 3)。

表 1 印尼拟松鲷与其他几种经济鱼类肌肉的生化组成(% , 湿重)

Tab.1 Biochemical composition in muscle of *D.pulcher* and other freshwater fishes (% , Wet weight)

种类 Species	水分 Moisture(%)	粗蛋白质 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude fat(%)	粗灰分 Crude ash(%)	文献 Reference
印尼拟松鲷 <i>D. pulcher</i>	65.61±0.58	19.44±0.29	6.26±1.18	1.27±0.02	
秀丽高原鳅 <i>Triplophysa venusta</i>	70.92	22.10	3.73	1.25	崔丽莉等(2016)
斑石鲷 <i>Oplegnathus punctatus</i>	70.50	20.20	7.80	1.30	尤宏争等(2016)
灰裂腹鱼 <i>Schizothorax griseus</i>	75.37±0.18	22.98±0.02	1.35±0.03	1.43±0.11	王思宇等(2018)
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	76.54±1.09	17.55±0.34	4.15±0.09	1.88±0.09	邵韦涵等(2018)
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	79.33±0.88	16.10±1.64	0.90±0.21	1.27±0.17	谢文平等(2014)
斑尾复虾虎鱼 <i>S. ommaturus</i>	82.10±0.21	15.34±0.20	0.87±0.13	1.12±0.03	黄薇等(2014)
诸氏鲷虾虎鱼 <i>Mugilogobius chulae</i>	79.40±0.03	17.54±0.31	0.62±0.09	2.34±0.07	李建军等(2013)
七彩神仙鱼 <i>Symphysodon</i> spp.	80.44±0.74	17.01±0.21	0.86±0.01	1.19±0.03	王磊等(2016)
草鱼 <i>C. idellus</i>	78.40±0.57	19.95±0.35	0.50±0.16	1.45±0.07	朱冰等(2017)

表 2 印尼拟松鲷肌肉氨基酸组成及含量(% , 湿重)

Tab.2 Amino acid composition and contents in muscle of cultured *D. pulcher* (% , Wet matter)

氨基酸 Amino acid	含量 Content	氨基酸 Amino acid	含量 Content
必需氨基酸 EAA		甘氨酸 Gly [△]	1.20±0.63
苏氨酸 Thr	0.80±0.06	丙氨酸 Ala [△]	1.27±0.10
缬氨酸 Val	0.85±0.11	酪氨酸 Tyr [△]	0.59±0.10
蛋氨酸 Met	0.55±0.06	丝氨酸 Ser	0.74±0.03
异亮氨酸 Ile	0.79±0.14	脯氨酸 Pro	0.77±0.42
亮氨酸 Leu	1.42±0.22	氨基酸总和 TAA	18.72±0.18
苯丙氨酸 Phe	0.72±0.10	必需氨基酸总量 EAA	6.81±0.14
赖氨酸 Lys	1.69±0.28	半必需氨基酸总量 HEAA	1.52±0.06
半必需氨基酸 HEAA		非必需氨基酸总量 NEAA	9.40±0.26
组氨酸 His	0.34±0.03	鲜味氨基酸总量 DAA	7.89±0.31
精氨酸 Arg	1.18±0.09	TEAA/TAA(%)	38.25
非必需氨基酸 NEAA		DAA/TAA(%)	42.15
天冬氨酸 Asp [△]	1.79±0.16	TEAA/TNEAA	76.17
谷氨酸 Ala [△]	3.04±0.36	EAAI	79.46

[△] 为鲜味氨基酸

[△]: Delicious amino acids

表3 虎鱼与其他几种经济鱼类肌肉的氨基酸含量比较(%，湿重)

Tab.3 Comparison of amino acid composition in muscle of *D. pulcher* and other freshwater fishes (%，Wet matter)

种类 Species	氨基酸总量 TAA	必需氨基酸 EAA	鲜味氨基酸 FAA	文献 Reference
印尼拟松鲷 <i>D. pulcher</i>	18.72	6.81	7.89	
草鱼 <i>C. idellus</i>	15.52	5.35	6.41	朱冰等(2017)
斑尾复虾虎鱼 <i>S. ommaturus</i>	15.59	5.87	5.95	黄薇等(2014)
红鳍笛鲷 <i>L. erythropterus</i>	13.80	5.90	5.19	陈涛等(2016)
黄条鲷 <i>Seriola aureovittata</i>	17.83	7.72	5.75	柳学周等(2017)
刀鲚 <i>Coilia ectenes</i>	17.42	6.47	/	唐雪等(2011)
短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	10.88	5.05	4.35	王崇等(2017)

2.3 营养品质评价

EAA 的 AAS 和 CS 是衡量食物营养价值的重要指标, 将表 2 中数据换算成每克氮中含氨基酸毫克数 [(氨基酸含量(mg/g N)=鱼肉中氨基酸含量(%，DM) × 10 × 6.25 / 肌肉中蛋白质含量(%，DM)] 后(唐雪等, 2011), 与 FAO/WHO 建议的氨基酸评分标准模式和鸡蛋蛋白质的氨基酸模式进行比较, 并计算出印尼拟松鲷的 AAS、CS 和 EAAI。从表 3 可见, 印尼拟松鲷 EAA 总量高于 FAO/WHO 模式, 但稍低于鸡蛋蛋白质的氨基酸模式。印尼拟松鲷的 AAS 值均接近或大于 1, CS 值(除蛋氨酸外)均大于 0.5, 表明印尼拟

松鲷氨基酸组成均衡。赖氨酸的氨基酸和化学评分最高, 分别为 1.60 和 1.24; 蛋氨酸的评分最低, 缬氨酸次之, 说明印尼拟松鲷第一和第二限制性氨基酸分别是蛋氨酸和缬氨酸, 支链氨基酸与芳香族氨基酸的比值(*F* 值)为 2.11, 比值较高, 支链氨基酸有护肝、降低胆固醇和抑制癌细胞等功能。由表 4 可见, 印尼拟松鲷的 EAAI (79.46) 高于布氏罗非鱼 (*Tilapia buttikoferi*) (73.43%)(赵婷婷等, 2015)、斑尾复虾虎鱼 (70.19%)(黄薇等, 2014)、红鳍笛鲷(陈涛等, 2016)(63.96%)、草鱼(61.53%)(朱冰等, 2017)等, 说明印尼拟松鲷的氨基酸含量均衡丰富, 可见其肌肉功能必需氨基酸满足率较高, 是一种优质蛋白源。

表4 虎鱼肌肉的氨基酸评分和化学评分

Tab.4 Evaluation for amino acids score (AAS) and chemical score (CS) of *D. pulcher*

必需氨基酸 EAA	测定含量 Measured content (mg/g)	FAO/WHO 评分 模式规定值 FAO/WHO protein scoring pattern	全鸡蛋蛋白 评分规定值 Whole-egg protein score rating	氨基酸评分 AAS	化学评分 CS
苏氨酸 Thr	257	250	292	1.03	0.88
缬氨酸 Val ¹	275	310	441	0.89	0.62
蛋氨酸 Met ²	175	220	386	0.80	0.46
异亮氨酸 Ile	253	250	331	1.01	0.76
亮氨酸 Leu	458	440	534	1.04	0.86
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	422	380	565	1.11	0.75
赖氨酸 Lys	545	340	441	1.60	1.24
合计 Total	2386	2109	2990		
必需氨基酸指数 EAAI	79.46				
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	2.11				

注: 1 为第一限制性氨基酸; 2 为第二限制性氨基酸

Note: 1: The first limiting amino acid; 2: The second limiting amino acid

2.4 脂肪酸组成及含量

从表5印尼拟松鲷肌肉脂肪酸含量和组成可见, 检测所的脂肪酸种类较多, 印尼拟松鲷肌肉富含不饱和脂肪酸(Unsaturated fatty acid, UFA)和人体必需脂

肪酸(Essential fatty acid, EFA), 共检测出27种脂肪酸, 其中, 饱和脂肪酸(Saturated fatty acid, SFA)含量为33.79%, 共11种; 不饱和脂肪酸达69.34%, 共16种, 包括7种单不饱和脂肪酸(Monounsaturated fatty acid, MUFA)和9种多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated

fatty acids, PUFA), 含量分别为34.62%和34.72%。SFA 中棕榈酸的比例最高(20.51%); 月桂酸的比例最低(0.06%); MUFA 中油酸比例最高(23.99%), 豆蔻一烯酸比例最低(0.15%)。SFA/UFA 为48.73%, 说明不饱和脂肪酸含量高于饱和脂肪酸含量。

表 5 印尼拟松鲷肌肉脂肪酸组成及含量
Tab.5 Fatty acid composition and contents in muscle of *D. pulcher* (%)

脂肪酸 Fatty acids	含量 Content
饱和脂肪酸 SFA	
月桂酸 C12:0	0.06±0.01
十三烷酸 C13:0	0.11±0.02
豆蔻酸 C14:0	2.80±0.21
十五烷酸 C15:0	0.96±0.14
棕榈酸 C16:0	20.51±0.49
十七烷酸 C17:0	1.20±0.23
硬脂酸 C18:0	7.49±0.35
花生酸 C20:0	0.32±0.01
二十一烷酸 C21:0	0.19±0.01
山嵛酸 C22:0	0.15±0.01
木焦油酸 C24:0	0.20±0.04
单不饱和脂肪酸 MUFA	
豆蔻一烯酸 C14:1	0.15±0.02
棕榈一烯酸 C16:1	6.48±0.64
十七烷一烯酸 C17:1	0.95±0.13
油酸 C18:1	23.99±0.71
花生一烯酸 C20:1	1.42±0.14
二十四碳一烯酸 C24:1	1.40±0.23
芥酸 C22:1	0.23±0.06
多不饱和脂肪酸 PUFA	
亚油酸 C18:2	10.56±1.45
花生二烯酸 C20:2	0.68±0.05
亚麻酸 C18:3	3.91±0.21
花生三烯酸 C20:3	0.94±0.14
十八碳四烯酸 C18:4	0.50±0.07
ARA C20:4	3.47±0.14
EPA C20:5	1.06±0.04
DPA C22:5	5.10±0.98
DHA C22:6	8.50±0.51
饱和脂肪酸 SFA	33.79
单不饱和脂肪酸 MUFA	34.62
多不饱和脂肪酸 PUFA	34.72
不饱和脂肪酸总量 Total UFA	69.34
饱和脂肪酸总和/不饱和脂肪酸总和 SFA/UFA	48.73

3 讨论

3.1 一般营养成分评价

从营养角度看, 食品中干物质的相对含量越高, 其总营养成分的含量就越高。鱼肉中的蛋白质和脂肪含量是评价其营养价值的重要指标。印尼拟松鲷的肌肉粗蛋白含量为 19.44%, 含量高于草鱼(15.10%)(朱冰等, 2017)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)(15.3%)(周朝伟等, 2018)、乌鳢(*Channa argus*)(11.58%)(周朝伟等, 2018)和短须裂腹鱼(14.24%)(王崇等, 2017); 粗脂肪含量为 6.26%, 明显高于秀丽高原鳅(3.73%)、尼罗罗非鱼(1.75%)(赵婷婷等, 2015)、草鱼(0.62%)(赵婷婷等, 2015)、七彩神仙鱼(0.86%)(王磊等, 2016)、斑尾复虾虎鱼(0.87%)(黄薇等, 2014)和诸氏鲯虾虎鱼(0.62%)(李建军等, 2013)等, 而与黄颡鱼(5.24%)(邵韦涵等, 2018)和斑石鲷(7.80%)(尤宏争等, 2016)相近。鱼类肌肉脂肪含量达到 3.5%~4.5%时, 鱼肉才有较好的适口性, 印尼拟松鲷肌肉脂肪含量高, 使其在肉质的口感方面具有优势, 也预示其肌肉比能值较大, 研究表明, 印尼拟松鲷是一种蛋白质和脂肪含量非常丰富的淡水经济鱼类。

印尼拟松鲷肌肉中氨基酸总含量(TAA)为 18.72% (鲜样), 高于养殖斑尾复虾虎鱼(15.59%)(黄薇等, 2014)、草鱼(15.52%)(朱冰等, 2017)、红鳍笛鲷(13.8%)(陈涛等, 2016; 王崇等, 2017)和短须裂腹鱼(10.88%)(王崇等, 2017)等。从氨基酸组成上看, 印尼拟松鲷肌肉氨基酸中含量最高的为谷氨酸, 这一组成特点与布氏罗非鱼(赵婷婷等, 2015)、黄斑蓝子鱼(*Siganus oramin*)(庄平等, 2008)和江鲮鱼(*Lota lota*)(徐革锋等, 2013)等鱼类分析结果一致。谷氨酸不仅是具有成味作用的鲜味氨基酸, 也参与了多种生理活性物质合成(徐革锋等, 2013); 印尼拟松鲷肌肉中共有 5 种鲜味氨基酸, 包括谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和酪氨酸, 是决定肌肉鲜美程度的主要因素, 其中, 甘氨酸和丙氨酸是呈现甘味的特征氨基酸, 鲜味氨基酸在肌肉中的总含量为 7.89%, 鲜味氨基酸占氨基酸总量的 42.15%, 含量高于养殖斑尾复虾虎鱼(38.14%)(黄薇等, 2014)、红鳍笛鲷(37.6%)(陈涛等, 2016)、黄条鲮(32.20%)(柳学周等, 2017)、布氏罗非鱼(32.13%)(赵婷婷等, 2015)等鱼类; 根据 FAO/WHO 的理想模式, 质量较好的蛋白质的氨基酸组成的 EAA/TAA 为 40%左右, EAA/NEAA 则在 60%以上。本研究中, 印尼拟松鲷肌肉中必需氨基酸占氨基酸总量(EAA/TAA)的值为 38.25%, 必需氨基酸与非必需氨基酸(EAA/NEAA)

的比值为 76.17%，均符合指标要求，氨基酸平衡效果较好。从氨基酸含量来看，印尼拟松鲷肌肉中 EAA 含量为 6.81%，高于斑尾复虾虎鱼(5.87%)(黄薇等, 2014)和红鳍笛鲷(5.9%)(陈涛等, 2016)；同时，EAAI(79.46)也高于布氏罗非鱼(73.43%)(赵婷婷等, 2015)、养殖斑尾复虾虎鱼(70.19%)(黄薇等, 2014)、红鳍笛鲷(63.96%)(陈涛等, 2016)、草鱼(61.53%)(朱冰等, 2017)和鲫鱼(*Carassius auratus*)(58.22%)(赵婷婷等, 2015)等，可见，印尼拟松鲷肌肉氨基酸组成达到指标要求，属于优质蛋白质。

3.2 脂肪酸和氨基酸营养价值评价

脂肪酸是维持细胞的正常生理功能所不可或缺的营养物质，在人体中具有酯化胆固醇、降低血液黏稠度及提高脑细胞活性等生理功能。印尼拟松鲷的 UFA 总含量为 69.34%，高于尼罗罗非鱼、布氏罗非鱼(赵婷婷等, 2015)、草鱼、短须裂腹鱼(王崇等, 2017)和诸氏鲷虾虎鱼(李建军等, 2013)等经济鱼类，其中，油酸和亚油酸含量较高，分别为 23.99%和 10.56%，远高于短须裂腹鱼和布氏罗非鱼等经济鱼类(赵婷婷等, 2015；王崇等, 2017)。油酸能够显著降低血液中的总胆固醇和有害胆固醇，降低低密度脂蛋白(LDL-C)水平以及冠状心脏病的发生几率(徐善良等, 2012)。亚油酸可在体内衍生为花生四烯酸(C20:4)，显著降低血液中的胆固醇含量，有效改善血液循环，抑制动脉粥样硬化，预防心血管疾病的发生(赵婷婷等, 2015)。PUFA 具有明显的降血脂、降血压和抗肿瘤等功效，在促进神经系统视觉系统的发育，防治心血管疾病、抗癌和抗炎等方面具有积极作用(赵亭亭等, 2018；贡艺等, 2018)。此外，高含量 PUFA 可显著增加鲜香味，并在一定程度上显示肌肉的多汁性(徐革锋等, 2013)，印尼拟松鲷的 PUFA 总量为 34.72%，高于短须裂腹鱼(20.12%)(柳学周等, 2017；王崇等, 2017)、黄条鲮(26.14%)和黄斑蓝子鱼(28.28%)(庄平等, 2008)。DPA 和 DHA 属于 PUFA，印尼拟松鲷的 DPA 和 DHA 含量分别为 5.1%和 8.5%，也远高于短须裂腹鱼和布氏罗非鱼等经济鱼类(赵婷婷等, 2015；王崇等, 2017)，脂肪酸含量配比说明印尼拟松鲷是一种健康的膳食鱼类。

饲料蛋白质的氨基酸组成有着和机体自身氨基酸组成特征相似的特征，因此，可依据鱼类肌肉营养成分的特征分析，推算其对饲料营养成分的需要量(邴旭文等, 2006)，如通过报道鲤肌肉蛋白质中所需氨基酸含量来推算其必需氨基酸需求量等(Ogino, 1980)。目前，印尼拟松鲷养殖主要以健康的鲮

(*Cirrhinus molitorella*)和麦瑞加拉野鲮(*Cirrhinus mrigala*)为主要饵料，以新鲜小河虾(*Macrobrachium nipponense*)和食蚊鱼(*Gambusia affinis*)作为健康苗种为补充饵料，尚没有符合该鱼营养特征的专用配合饲料。根据本研究对印尼拟松鲷营养特征的研究，可推测该鱼对必需氨基酸的需求水平，为鱼类配合饲料中氨基酸的平衡模式提供数据基础。

研究表明，印尼拟松鲷肌肉中的蛋白质含量较高，必需氨基酸和鲜味氨基酸含量丰富，氨基酸种类齐全，是一种高质量的鱼类蛋白源。根据 AAS 和 CA 分值，可见印尼拟松鲷的第一和第二限制性氨基酸为蛋氨酸和缬氨酸。此外，印尼拟松鲷肌肉脂肪含量较高，口感鲜度和营养价值俱佳，是兼具较高观赏价值和食用价值的可开发鱼类品种，今后可开展印尼拟松鲷的全人工繁育及养殖技术研发。

参 考 文 献

- Acharya, G, Mohanty PK. Effect of sex on haemocytobiochemical profiling of silver tiger fish (*Daniooides polota* Hamilton, 1822). *Comparative Clinical Pathology*, 2018, 27(5): 1335–1342
- Bing XW, Zhang XZ. Evaluation of nutritional components and nutritive quality of the muscle of *Oxyeleotris marmoratus* Bleeker. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(1): 107–111 [邴旭文, 张宪中. 斑驳尖塘鳢肌肉营养成分与品质的评价. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(1): 107–111]
- Chen T, Li WF. Analysis of muscle nutrients of *Lutjanus erythropterus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(6): 67–72 [陈涛, 李伟峰. 红鳍笛鲷肌肉营养成分分析. *海洋湖沼通报*, 2016(6): 67–72]
- Cui LL, Leng Y, Miao XJ, et al. Evaluation of nutrient quality and composition in the muscle of *Triplophysa venusta*. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(2): 70–75 [崔丽莉, 冷云, 缪祥军, 等. 秀丽高原鳅肌肉营养成分分析与品质评价. *水生态学杂志*, 2016, 37(2): 70–75]
- Fan JJ, Zhu B, Bai JJ, et al. Dressing rate and nutritional composition in muscle of crucian carp hybrid *Carassius auratus* Var. *Pengzenensis* ♀ × *Cyprinus acutidorsalis* Wang ♂. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(3): 347–352 [樊佳佳, 朱冰, 白俊杰, 等. 白金丰产鲫含肉率及肌肉营养成分分析. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(3): 347–352]
- Gong Y, Li YK, Chen L, et al. A comparative analysis of fatty acid profiles in muscle of *Dosidicus gigas* from different harvest locations in the eastern Pacific Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 147–154 [贡艺, 李云凯, 陈玲, 等. 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 147–154]

- Huang W, Zhang ZH, Shi YH, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of cultured *Synechogobius ommaturus*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(9): 2866–2873 [黄薇, 张忠华, 施永海, 等. 养殖斑尾复虾虎鱼肌肉营养成分的分析和评价. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2866–2873]
- Li JJ, Zheng WQ, Chen XQ, *et al.* Analysis of nutritional components and flesh content of *Mugilogobius chulae*. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2013, 23(12): 35–39 [李建军, 郑伟强, 陈小曲, 等. 诸氏鲷虾虎鱼含肉率及肌肉营养成分分析. 中国比较医学杂志, 2013, 23(12): 35–39]
- Liu XZ, Xu YJ, Li R, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition of the muscle of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 128–135 [柳学周, 徐永江, 李荣, 等. 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)肌肉营养组成分析与评价. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 128–135]
- Ogino C. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1980, 46(2): 171–174
- Shao WH, Fan QX, Zhang CM, *et al.* Comparative analysis of nutritive composition in muscle of "Huangyou No.1", yellow catfish and darkbarbel catfish. Journal of Huazhong Agricultural University, 2018, 37(2): 76–82 [邵韦涵, 樊启学, 张诚明, 等. 黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及"黄优1号"肌肉营养成分比较. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 76–82]
- Tang X, Xu GC, Xu P, *et al.* A comparison of muscle nutrient composition between wild and cultured *Coilia nasus*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(3): 514–520 [唐雪, 徐钢春, 徐跑, 等. 野生与养殖刀鲚肌肉营养成分的比较分析. 动物营养学报, 2011, 23(3): 514–520]
- Wang C, Liang YQ, Zhang Y, *et al.* Nutrient content and quality of *Schizothorax wangchiachii*. Journal of Hydroecology, 2017, 38(4): 96–100 [王崇, 梁银铨, 张宇, 等. 短须裂腹鱼营养成分分析与品质评价. 水生态学杂志, 2017, 38(4): 96–100]
- Wang L, Chen ZZ, Gao JZ, *et al.* The complete mitochondrial genome of Mekong tiger fish *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994). Mitochondrial DNA Part B, Resoures, 2016a, 1(1): 367–368
- Wang L, Chen ZZ, Gao JZ, *et al.* The complete mitochondrial genome of Indonesian tiger fish *Datnioides microlepis* (Bleeker 1854). Mitochondrial DNA Part B, 2016b, 1(1): 328–329
- Wang L, Chen ZZ, Leng XJ, *et al.* Comparison of muscle composition of wild and cultured discus fishes *Symphysodon* spp. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(5): 719–725 [王磊, 陈再忠, 冷向军, 等. 野生及人工养殖七彩神仙鱼肌肉成分的比较. 上海海洋大学学报, 2016, 25(5): 719–725]
- Wang SY, Zheng YH, Tang HY, *et al.* Analysis and evaluation for the nutrition components of *Schizothorax griseus* muscles. Freshwater Fisheries, 2018, 48(2): 80–86 [王思宇, 郑永华, 唐洪玉, 等. 灰裂腹鱼肌肉营养分析与评价. 淡水渔业, 2018, 48(2): 80–86]
- Xie WP, Zhu XP, Chen KC, *et al.* Comparison of nutritional composition in muscle of four tilapias. Acta Nutrimenta Sinica, 2014, 36(4): 409–411 [谢文平, 朱新平, 陈昆慈, 等. 四种罗非鱼营养成分的比较. 营养学报, 2014, 36(4): 409–411]
- Xu GF, Wang YY, Bai QL, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in muscle of *Lota lota* (Linnaeus). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(12): 3027–3032 [徐革锋, 王裕玉, 白庆利, 等. 江鲢肌肉营养成分分析与品质评价. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3027–3032]
- Xu SL, Wang DL, Xu JL, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* form the east China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 775–782 [徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳(*Pampus argenteus*)、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳(*P. sinensis*)肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 775–782]
- You HZ, Li WW, Xia SD, *et al.* Dressing rate and nutrient components in muscle of spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(2): 174–179 [尤宏争, 李文雯, 夏苏东, 等. 斑石鲷含肉率与肌肉营养成分分析. 大连海洋大学学报, 2016, 31(2): 174–179]
- Zhao TT, Zhang Y, Chen C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 89–96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 89–96]
- Zhao TT, Liu Y, Wang XJ, *et al.* Analysis and assessment for nutritional components of *Tilapia buttikoferi*. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2015, 41(2): 184–189 [赵婷婷, 刘奕, 汪学杰, 等. 布氏罗非鱼肌肉营养成分分析与评价. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(2): 184–189]
- Zhou CW, Lei L, Deng XX, *et al.* Nutritional composition analysis and evaluation of *Ophicephalus argus* and *Opniocepnalus argus* var. Freshwater Fisheries, 2018, 48(3): 83–89 [周朝伟, 雷骆, 邓星星, 等. 乌鲢与白乌鲢肌肉营养成分分析与评价. 淡水渔业, 2018, 48(3): 83–89]
- Zhu B, Fan JJ, Bai JJ, *et al.* Comparison and analysis of nutritional composition in gold grass carp and grass carp muscle. Marine Fisheries, 2017, 39(5): 539–547 [朱冰, 樊佳佳, 白俊杰, 等. 金草鱼肌肉品质和营养成分分析及评价. 海洋渔业, 2017, 39(5): 539–547]
- Zhuang P, Song C, Zhang LZ, *et al.* Evaluation of nutritive quality and nutrient components in the muscle of *Siganus oramin*. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 77–83 [庄平, 宋超, 章龙珍, 等. 黄斑篮子鱼肌肉营养成分与品质的评价. 水产学报, 2008, 32(1): 77–83]

Analysis and Assessment for Nutritional Components of the Muscle of *Datnioides pulcher*

SONG Hongmei¹, QU Zhengwei², WANG Xuejie¹, MU Xidong¹,
LIU Chao¹, LIU Yi¹, LAI Mingxin¹, HU Yinchang¹①

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Modern Leisure Fisheries Engineering Technology Center, Guangzhou 510380; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract To analyze and conduct a scientific evaluation of nutritional value of *Datnioides pulcher*, the common nutrient components, amino acid composition, and acid composition in muscle of *D. pulcher* were determined on the basis of conventional nutritional components analysis. Then comparison was made between the fish and some economic fishes from the same family and other freshwater fishes with common quality. The results showed that the content of moisture, crude protein, crude fat, and crude ash in the fresh muscle of *D. pulcher* was 65.6%, 19.6%, 7.6%, and 1.3%, respectively. Sixteen kinds of amino acids of *D. pulcher* were found in dry muscle, of which seven were essential amino acids (EAA). In dry muscle, the total amino acid (TAA) content was 18.72%, the content was 6.81%, and the ratio of EAA to TAA was 36.09%. The essential amino acid index (EAAI) was 79.46%, which met the high-quality protein standard established by the Food and Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO). According to the amino acids score (AAS) and chemical score (CS), the first and second limiting amino acids were Val and Met, respectively, and the EAAI of *D. pulcher* was 79.46. The flavor amino acid (FAA) content was 42.15%. There were 16 kinds of unsaturated fatty acids (UFA), which accounted for 68.41% of muscle, among which oleic acid and linoleic acid, with richness in docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA), were 23.99% and 10.56%, respectively; meanwhile, DHA and DPA (relatively lacking in fish oil) contents were 8.5% and 5.1%, respectively. Results of the comprehensive analysis showed that the contents of amino acids and UFA in muscle of *D. pulcher* are higher, and the composition of amino acids is reasonable. Thus, *D. pulcher* is a high-quality fish with high ornamental value as well as edible value, and offers good prospects for exploitation and utilization.

Key words *Datnioides pulcher*; Muscle; Nutritional components

① Corresponding author: HU Yinchang, E-mail: huyc22@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191223002

http://www.yykxjz.cn/

秦传新, 潘莞倪, 于刚, 左涛, 席世改, 朱文涛, 马鸿梅. 水生生物环境丰容技术及其应用研究进展. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 185-193

Qin CX, Pan WN, Yu G, Zuo T, Xi SG, Zhu WT, Ma HM. Review on environmental enrichment for aquatic organisms. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 185-193

水生生物环境丰容技术及其应用研究进展*

秦传新^{1①} 潘莞倪^{1,2} 于刚¹ 左涛¹
席世改¹ 朱文涛^{1,2} 马鸿梅¹



(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 国家渔业资源环境大鹏观测实验站
农业农村部南海渔业资源环境科学观测实验站 中国水产科学研究院海洋牧场技术重点实验室
广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300; 2. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 水生生物作为人类生活的重要组成部分,其在养殖、运输以及展示等过程中福利水平低下现象层出不穷,寻求合适的方法来解决水生生物福利低下的问题,成为保障并提升水生生物福利的一大重要工作。环境丰容作为一项能够通过圈养动物生存环境进行优化,提升圈养动物福利水平,使得圈养动物获得生理和心理的健康,展示其自然行为的技术,成为保障和提升水生生物福利的一个重要手段。目前,与国外相比,国内对水生生物环境丰容技术的研究还处于起步阶段,如何利用环境丰容技术改善水生生物的生存环境,保障并提升水生生物福利水平日益成为研究热点。为此,本文综述了环境丰容的定义、发展历程、环境丰容与动物福利的关系以及在水生生物中的 4 种主要环境丰容技术。同时,就水生生物环境丰容技术存在的问题进行讨论并提出建议,以期水生生物环境丰容提供更多方案参考和理论支撑。

关键词 环境丰容; 动物福利; 水生生物

中图分类号 S953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0022-09

随着渔业技术的不断发展,生活水平的不断提高,人们对水生生物的需求量逐渐增加,无论是从经济价值、观赏价值以及教育意义层面上看,水生生物已逐渐成为人类生活中不可或缺的一部分。然而,在水生生物(尤其是鱼类)养殖、运输、展示等过程中,仍然存在水生生物的福利水平低下的问题,具体体现为存活率低下,疾病、焦虑以及刻板行为出现、侵略行为加强等(Corcoran, 2015; Huntingford *et al*, 2014),寻求合适方法解决水生生物福利低下问题,已迫在眉睫。

环境丰容(Environmental enrichment)作为其中一项提升圈养动物福利的技术手段,是指通过向圈养动物的生活环境加入一定的刺激因素,改善圈养动物的生活条件,提升圈养动物的福利,最终使圈养动物拥有正常的生理和心理的健康,展示其自然行为的过程(Swaigood *et al*, 2005)。目前,环境丰容技术在哺乳动物、鸟类及其他动物中已得到了广泛的应用,成为现代动物园的一种新型管理方式(杨阳等, 2019; 陈昶等, 2016; 毛杰等, 2010; 吴海丽等, 2015)。但是,与

* 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新专项(2018YFD0900905)和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资助(2019ZD1101)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Plan Blue Granary Technology Innovation Project (2018YFD0900905), and Special Fund for Basic Scientific Research Business Fees of the Central Public Welfare Research Institute of the Chinese Academy of Fishery Sciences (2019ZD1101)]

① 通讯作者: 秦传新, 副研究员, E-mail: qincx@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2019-12-23, 收修改稿日期: 2020-01-06

国外相比,国内对于水生生物环境丰容技术相关的研究仍处于起步阶段。本文通过围绕环境丰容技术在国内外水生生物中的研究进展和主要技术应用进行综述,对环境丰容技术存在的问题进行讨论并提出建议,以期水生生物环境丰容提供更多方案参考和理论基础。

1 环境丰容

1.1 定义

环境丰容可以通过多种方式来定义,它通常涉及对动物生境进行改造,对动物实施一定程度的保护,使其身心状态免受不必要的痛苦,从而保障动物的福利水平(Williams *et al.*, 2008)。环境丰容通常被认为是一种动态的工程,通过一系列的构建和改变圈养动物的生活环境,允许动物表现出正常的行为,获得更多的选择机会(张恩权, 2006; 田秀华等, 2007)。

1.2 发展历程

国际上,环境丰容这一概念的提出和应用,最早可以追溯到人们开始将动物圈养到动物园的时期(Mellen *et al.*, 2001)。早在1925年,Robert Yerkes发现为灵长类动物提供一定的运动和戏玩的设施后,其饲养状况得到改善,让当时的群众意识到环境丰容对圈养动物的健康生长具有重要作用,因此,Robert Yerkes的观点被认为是“环境丰容”概念的雏形(杜浩, 2014)。1982年,Markowitz(1983)在美国波特兰动物园开展环境丰容工作,成为史上开展环境丰容工作最具影响力的人物之一。1981年,美国国会举行专门的听证会,并于1985年完成了对动物福利行动计划案的修订。这次修订制定了有关于狗类锻炼和灵长类心理健康的相关制度,并将“环境丰容”概念写入草案。1993年,美国华盛顿动物园首次举办了关于环境丰容的学术研讨会,初步提出了环境丰容的理论框架,并着手开展环境丰容的相关工作(Shepherdson *et al.*, 1998)。

目前,环境丰容及饲养驯化已经成为圈养动物日常管理工作中不可分割的部分,也成为过去30多年里动物园和水族馆所采取的主要工作措施(Mellen *et al.*, 1996)。在我国,北京动物园在1995年首次接触这一概念并尝试开展对猩猩馆的环境丰容工作(李华等, 2005)。1996年,成都卧龙大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)研究所也开展了环境丰容方面的相关实验工作。2002年,北京动物园在我国首次承办了中国动物园协会和华盛顿动物园联合举办的以环境丰容为主题的研讨会,2005年成都动物园开展了对大

熊猫环境丰容的相关工作(杨秀梅等, 2008)。2006年,上海动物园承办了国内第2次环境丰容研讨会,并对狒狒、鸟类和马来熊(*Helarctos malayanus*)等动物进行环境丰容的相关实验工作(田秀华等, 2007)。其后,其他动物园也相继开展环境丰容的相关工作(黄潇航等, 2018; 刘冰许等, 2016; 张轶卓, 2014)。

1.3 环境丰容与福利

环境丰容技术作为一项有效提升动物福利水平的手段,应得到合理、有效的利用。尽管人们意识到保障动物福利对动物健康的重要性,但在具体如何定义福利水平和实施环境丰容问题上,科学家和哲学家之间开展了大量的讨论(Williams *et al.*, 2008)。为此,英国农渔食品部农场动物福利委员会(Farm Animal Welfare Council, FAWC)(1993)颁布了关于陆生动物的5种福利自由,经常被用作环境丰容技术设计和实施的参考依据,主要内容为(1)拥有免受饥渴的自由;(2)拥有免于不适的自由;(3)拥有免受疼痛、伤害或疾病的自由;(4)拥有表达正常行为的自由;(5)拥有免受恐惧和痛苦的自由。相应地,Mellor等(2001)针对5项“自由”提出5项福利水平低下的表现,即(1)营养不良;(2)环境不适;(3)出现疾病、损伤和功能障碍;(4)行动受限;(5)出现精神和身体上痛苦。

由于水生生物所生活环境的复杂性,为水生生物环境丰容的设计、实现和评估带来了一定的技术难题,但可以依据FAWC(1993)提出的要求和Mellor等(2001)的观点,以保障动物福利为基本原则,对水生生物环境丰容技术进行提升,并进行有效评估,合理利用环境丰容技术,切实提升水生生物福利水平。

2 水生生物环境丰容技术研究现状

由于人们对于水生生物的生活史、行为习惯、神经调节等理论知识背景的了解相对匮乏,且对于水生生物而言,尤其是对于鱼类到底能不能感知痛觉、是否存在认知能力等问题上一直存在争议(Corcoran, 2015; Huntingford *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2008)。因此,相对而言,环境丰容在水生生物中的研究进展较慢。环境丰容技术在水生生物生长、繁殖中的应用研究,主要开展以观赏(Ploeg, 2007; Stevens *et al.*, 2017; Sullivan *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2001)、实验(Lee *et al.*, 2019; Collymore *et al.*, 2015; Volgin *et al.*, 2018; Schroeder *et al.*, 2014; Kistler *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018)、增殖或增殖放流(Braithwaite *et al.*, 2014; Kihlslinger *et al.*, 2006; Brockmark *et al.*, 2007; Hammenstig *et al.*, 2014)为主要目的的水生生物环境

丰容研究,且主要研究对象为鱼类(张宗航等,2018)。本文根据环境丰容技术的性质不同,在归纳前人研究基础上将水生生物环境丰容技术划分为四大类,分别为栖息地丰容技术、饵料丰容技术、社会丰容技术和感官丰容技术(王志永等,2010;刘霞利,2013;赵雨梦等,2018)。

2.1 栖息地丰容技术

栖息地丰容技术,又称为生境丰容技术,是指对水生生物的栖息地或其生境中的水流、光照、底质等因素进行优化,减少动物的压力,增加其自然行为,获得身心健康,以此提高水生生物福利水平的一项技术(Swaigood *et al*, 2005; 王志永等, 2010),具体可分为结构丰容、水流丰容和光照丰容等。目前,已有相关的环境丰容技术在水生生物中应用,并取得一定成效。Batzina 等(2012)探究海水再循环系统水缸中蓝色、红棕色和绿色底质对金头鲷(*Sparus aurata*)的影响,发现添加蓝色和红棕色底质可视为一种可行的环境丰容方法。杜浩(2014)通过对达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)进行水流丰容和极端光周期丰容,发现水流丰容组达氏鲟的游泳能力得到明显提高;极端光周期对达氏鲟的视觉发育影响显著。北京动物园仿照大鲵(*Andrias davidianus*)栖息地原生环境造景,进行环境丰容实验,极大改善了大鲵的生活质量和福利水平(陈昶等,2018)。

水生生物对环境具有一定的偏好性,如金鱼(*Carassius auratus*)(Sullivan *et al*, 2015)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Schroeder *et al*, 2014; Kistler *et al*, 2011)等对于水环境中添加底质、植物或其他结构的环境存在明显的偏好。Braithwaite 等(2014)研究表明,大多数养殖鱼类在远离自然的条件下,很可能导致急性或慢性胁迫,致使养殖鱼类的福利水平降低。通过结构丰容,与对照组相比,斑马鱼的焦虑行为有所减少(Lee *et al*, 2019; Collymore *et al*, 2015),虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的应激后不良反应也相应减少(Pounder *et al*, 2016),大西洋鲑(*Salmo salar*)吃得更多,对自然捕食的适应速度更快(Roberts *et al*, 2014)。且当进行简单的空间学习任务测试时,来自复杂饲养处理的椰子深鰕虎鱼(*Bathygobius cocosensis*)的个体比在较简单的环境(海草)和同质环境(砂基质)中饲养的个体更快地达到学习标准(Carbia *et al*, 2019)。因此,通过适当的添加底质、庇护所、植物等结构增加栖息地复杂性,进行环境丰容,可以减少水生生物在环境中的焦虑、不良行为,提升水生生物的环境适应性,并提高其存活率。

环境丰容对鱼类的“胆量”影响显著。Sneddon (2003)根据个体在实验水槽空白区域停留时间的长短,对鱼类的“胆量”进行定义,停留时间越长,“胆量”越大,反之,则“胆量”越小;且张宗航等(2018)研究认为,鱼类行为是其“胆量”的外在表现。Castanheira 等(2017)指出,被动的、胆小的个体虽然竞争能力较弱,但因其具有较强的行为和神经可塑性,使其能够更好地适应复杂多变的水生环境。Kihlslinger 等(2006)研究表明,在一个简单的早期养殖环境中,添加天然底物可以塑造幼年鲑鱼的行为和神经表型的表达。张宗航等(2018)通过分别选用不同规格的人工鱼礁模型和海藻模型,对增殖放流鱼种许氏平鲈(*Sebastods schlegelii*)进行低水平、高水平环境丰容,发现低水平的环境丰容能有效地增强许氏平鲈的趋礁行为、减少幼鱼的“胆量”,在一定程度上有利于提高增殖放流幼鱼在野外的存活率。有研究表明,在进行环境丰容后,鳕鱼(*Gadus morhua*)(Salwanes *et al*, 2005)、鲑鱼(Roberts *et al*, 2011)的“胆量”变小,在庇护所停留的时间更长,并显示出更强的反捕食行为。各项环境丰容技术之间并非是绝对独立的,它们相互交叉、相互融合、相互协调,以求达到更好的丰容效果。Brockmark 等(2010)结合栖息地丰容技术和社会丰容技术对褐鳟(*Salmo trutta*)进行环境丰容,研究发现,在自然密度下饲养的鱼苗在迷宫中找到猎物的速度更快,且该密度养殖的幼鱼吃新型饵料的速度更快,并表现出比在更高密度下饲养的鱼更有效的反捕食行为;以低密度饲养的鳟鱼幼鱼在溪流中生存的可能性是以高密度饲养幼鱼的2倍。

然而,由于物种间的差异、环境丰容的方式以及丰容水平等的不同,环境丰容可能并不能显著提升水生生物的福利水平,甚至可能带来负面影响。通过栖息地丰容技术和饵料丰容技术的结合, Persson 等(2014)研究发现,庇护所的存在能使低水平饵料组的大西洋鲑的鱼鳍受损率降低,但会对其存活率带来消极影响。有研究发现,在进行结构丰容后,与在孵化场典型的贫瘠环境中饲养相比,放流后的褐鳟(Watz, 2019)在天然河流中的运动减少,虹鳟(Lee *et al*, 2008)、黄鳍结鱼(*Tor putitora*)(Ullah *et al*, 2017)的“胆量”增大了,不利于其在野外的生存和发展。杜浩(2014)研究发现,卵石底质养殖对达氏鲟生长表现出明显的负面效应,达氏鲟的养殖成活率低。有研究发现,丰容的孵化环境不会对斑马鱼的生长状况、生殖能力以及攻击行为产生显著影响(Lee *et al*, 2018),也不会改善放流后大西洋鲑(Brockmark *et al*, 2007)和虹鳟(Tatara *et al*, 2009)的生长或生存。Solås(2019)等

采用结构丰容技术进行环境丰容发现,单独的结构丰容不足以改善孵化后养殖鱼类的长期存活率,其他因素可能会影响放流后的存活率。且有学者认为,环境丰容之所以能降低巴西珠母丽鱼(*Geophagus brasiliensis*)的攻击性是由于栖息地复杂性的增加降低了能见度,使得鱼类之间的相互作用降低(Kadry *et al.*, 2010)。

可见,采取适当的环境丰容技术在某种程度上能够提升水生生物的福利,但仍需要根据物种的特异性进行环境丰容设计、规划,探究适合的环境丰容手段,调整环境丰容水平,以期更大程度地提高实验鱼的福利水平。

2.2 饵料丰容技术

饵料丰容技术,则是对水生生物的食物种类、投喂量、大小、颜色、位置、输送方式、获取的难易程度等进行改变和优化,使得水生生物福利水平得到提升的技术手段(Swaisgood *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008; 王志永等, 2010)。

水生野外环境复杂多变,能对新型的、陌生的饵料进行摄食,有利于水生生物在环境中的生存和发展,这对水生生物是否能在增殖放流后适应环境,提高存活率至关重要。通过使用生物饵料进行饵料丰容,与人工饵料饲养组相比,生物饵料的喂养更有利于达氏鲷在自然环境中对陌生饵料的摄食选择(杜浩, 2014)。

饵料丰容技术方法多样、水平各异,与其他丰容技术的结合可能会取得更佳的效果,但也有可能与理想效果相悖。通过饵料丰容技术和栖息地丰容技术相结合,环境丰容组饲养的达氏鲷获得了更好的反捕食训练效果(杜浩, 2014),鳕鱼(*Gadus morhua*)获得了更灵活的行为特征(Braithwaite *et al.*, 2005),大西洋鲑的鱼鳍受损率也有所降低,但大西洋鲑在增殖放流后的存活率有所降低(Persson *et al.*, 2014)。

2.3 社会丰容技术

社会丰容,实际上可理解为增加水生生物与同物种或非同物种之间的相互作用,调整社会条件,调动其社会属性的过程,在实施过程中,需要考虑物种的密度、规格、种类等问题(Swaisgood *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008; 王志永等, 2010)。

通过调整饲养密度,改变水生生物的社会条件进行社会丰容,能够在不同程度上改善放流后水生生物在野外的存活率和适应能力。且在与其他丰容技术相结合的时候,对于提高水生生物的福利水平,社会丰

容技术可能发挥着更大的作用。通过结合社会丰容技术和栖息地丰容技术, Brockmark 等(2007)对 0 龄大西洋鲑进行环境丰容,发现在育苗场,保持低密度和结构丰容的鲑鱼比传统饲养的鲑鱼生长得更快。在成熟时,保持在低密度饲养的鲑鱼比在标准密度饲养的具有更高水平的胰岛素样生长因子 I; 低密度组死亡率低于高密度组;同时,低密度饲养的大西洋鲑的背鳍受损程度低于标准密度。因此, Brockmark 等(2007)研究认为,降低饲养密度可能比结构复杂性更重要,可以应用此技术提高大西洋鲑幼鱼的放流存活率。Brockmark 等(2010)研究发现,对褐鳟进行结构丰容并没有取得明显的效果,认为降低饲养密度可以促进圈养动物的行为生活技能的发展,从而增加它们对自然生产的贡献。通过结合社会丰容和饵料丰容技术, Hammenstig 等(2014)对适用于增殖放流的大西洋鲑进行环境丰容,发现降低的饲养密度比降低的膳食脂肪水平更为重要。

除了同种间的社会作用,非同一物种间的社会丰容技术,如“抖动鱼”(Dither fish)的使用、捕食者的引入,对水生生物进行训练以及水生生物与人的相互作用等社会丰容技术都能在不同程度上改善水生生物的福利水平,达到较好的丰容效果,实现环境丰容的目的(Williams *et al.*, 2008; 杜浩, 2014; Brydges *et al.*, 2009)。有研究表明,使用“抖动鱼”进行社会丰容,即加入体格较小鱼群作为体格更大的神经紧张的鱼群的伴侣,能够减缓体格更大的鱼群的压力,这可能对一个物种的多个生命阶段的社会互动和学习具有重要作用(Williams *et al.*, 2008)。杜浩(2014)通过引入捕食者对达氏鲷进行反捕食训练,有效提高达氏鲷在增殖放流后的反捕食能力;相关研究表明,通过训练可以使得锦鲤进行较低压力捕获,并使它们习惯于处理。也可以通过对鲨鱼、鳐等进行训练,在手术期间缓解它们的压力,减少防御行为的出现,更容易实现对它们的安全控制(Corcoran, 2015);且与普通的水族箱相比,在具备观察窗的水族箱的巨型太平洋章鱼逃跑的次数要少得多(Anderson *et al.*, 2001)。

2.4 感官丰容技术

感官丰容技术,是指通过对水生生物听觉、视觉、嗅觉、味觉等感官给予一定的刺激,改善水生生物的生活环境,从而提升水生生物福利水平的一种技术手段(Swaisgood *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008; 王志永等, 2010)。

通过改变饲养环境的背景、底质等颜色进行环境丰容,对水生生物的健康发展有所帮助。Batzina 等

(2012)通过探究海水再循环系统水缸中蓝色、红棕色和绿色底质的存在对金头鲷的影响,发现添加蓝色和红棕色底质可视为一种可行的环境丰容方法。基于之前的研究(Batzina *et al*, 2012), Batzina 等(2014)在不同社会条件下(较低的 4.9 kg/m^3 和较高的 9.7 kg/m^3 密度)饲养金头鲷时发现,这种丰容仍然有益,且蓝色底质能够促进金头鲷的生长发育,抑制其攻击行为,并降低脑血清素活性。Barcellos 等(2009)在探究颜色背景和遮蔽物可用性是否影响克林雷氏鲶(*Rhamdia quelen*)中皮质醇对胁迫的反应时,发现提升克林雷氏鲶福利水平的最佳选择是带蓝色墙壁并提供庇护所的养殖箱。Papoutsoglou 等(2015)研究发现,与其他声音(罗曼萨、巴赫、白噪声)相比,莫扎特音乐的传播能够使金头鲷产生放松影响,减少焦虑,达到最大的生长速度、体重,同时,肯定了金头鲷听觉对音乐刺激的敏感性,并指出白噪声的存在可能对金头鲷有特殊影响。

3 水生生物环境丰容研究存在问题

3.1 研究基础薄弱

水生生物的福利水平具体体现在拥有健康的身心 and 自然的行为(Swaisgood *et al*, 2005),因此,水生生物生活史、行为习惯、神经调节等理论知识背景的研究成为水生生物环境丰容技术的基础。

然而,目前国内外对于该方面的基础研究较为薄弱,使得环境丰容技术、福利的定义、评估尚未有统一的标准,对于什么才是水生生物的“自然”行为,仍无法做出准确判断,环境丰容技术在水生生物中的研究仍相对有限,水生生物环境丰容技术的进一步发展面临困难(Corcoran, 2015; Huntingford *et al*, 2014; Williams *et al*, 2008)。

3.2 技术缺乏系统性、针对性

由于现阶段对于环境丰容技术在水生生物中的研究应用较少,相关应用仍处在初期探索阶段,仍无法建立一套系统的水生生物环境丰容技术体系,无法加以广泛应用。且对于已有的研究,若将其技术直接应用,则容易缺乏针对性和特异性,导致丰容效果不佳。

3.3 技术实施难度大

环境丰容技术并不是有百利而无一弊的。在使用各项环境丰容技术的时候,会发现环境丰容技术在改善水生生物福利水平的同时,很可能对某些物种带来一些隐患和负面影响,如通过利用“抖动鱼”进行社会

丰容,能够减缓体格更大鱼的压力(Williams *et al*, 2008),但“抖动鱼”也有可能引入疾病和寄生虫,面临被捕食的风险,且多物种混养很可能使研究或实验条件复杂化(Williams *et al*, 2008; Brydges *et al*, 2009),使得因该技术的引进而产生安全、卫生、健康等问题;同时,进行低水平的环境丰容能有效增强许氏平鲷的趋礁行为、减少幼鱼的“胆量”,但高水平的环境丰容很可能会产生不良影响(张宗航等, 2018),因而产生因物种、环境丰容技术及环境丰容水平差异导致的丰容效果不佳等问题。研究表明,降低饲养密度对水生生物福利水平的提高至关重要(Brockmark *et al*, 2007; Hammenstig *et al*, 2014; Brockmark *et al*, 2010),但对于养殖渔业而言,为追求经济效益,通常采取集约化养殖,养殖密度较大、养殖环境较差,若将环境技术加以应用,有可能会增加养殖成本,使得环境丰容技术在以增养殖为目的的水生生物中的实施难度较大。

4 建议与展望

基于环境丰容技术在哺乳动物、鸟类等动物中的成功应用,作者有理由相信水生生物环境丰容技术具有良好的前景,具有很大的发展空间。环境丰容技术作为一项能够切实提高水生生物福利水平的技术手段,人们可以利用其对水生生物中的经济生物、保护生物、观赏生物开展福利提升的一系列相关实验,以期为社会带来更大的经济、文化、社会价值。针对环境丰容技术在水生生物应用中存在的问题,提出以下建议:

4.1 基础研究是推动环境丰容技术发展的基石

人们需要提高对水生生物基本生物学知识的科学认识和理解,加大对水生生物基础科学以及环境丰容技术的科学实验和研究,丰富水生生物行为学、营养学、神经学、病理学等学科内容,完善环境丰容的技术支撑体系,建立多角度评估体系,加快水生生物环境丰容技术的发展。

4.2 针对不同物种开发关键技术研究

由于提升福利水平对象的物种、生命阶段、生活特性等存在差异,在设计、制定环境丰容方法时,需要考虑由于物种间的差异、环境丰容的方式以及丰容水平等的不同带来的影响,针对物种特异性,选择有效的丰容计划,以期达到更好的丰容效果,减少水生生物刻板行为和其他异常行为,实现水生生物福利水平的切实保障和提高,切不可生搬硬套(Corcoran,

2015; Huntingford *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2008; 张宗航等, 2018)。

4.3 综合开发提高推广应用效率

单一的环境丰容技术可能效果不佳, 可以考虑多种环境丰容技术相互结合, 同时, 尽量避免环境丰容技术本身带来的不良影响, 如进行饵料丰容产生的疾病、寄生虫等问题, 减少在丰容技术实施过程中对水生生物的伤害; 加大对环境丰容技术和成功经验的推广, 实现环境丰容技术在更多水生生物物种中的实践应用。同时, 拓展应用领域。水生生物环境丰容技术目前仅在小生境中应用较广, 如水族馆、动物园和实验室中, 也可将该技术进行推广应用到大环境中。如今, 海洋牧场已经成为引领低碳潮流的海洋生物资源可持续发展利用的重要载体(李波, 2012; Qin *et al.*, 2019; 段丁毓等, 2019; 莫宝霖等, 2017; 杨红生等, 2019)。因此, 可以利用水生生物环境丰容技术与海洋牧场相结合, 尤其是对于水生生物中的经济生物, 可以开展相应的环境丰容实验工作, 如利用结构丰容技术对一些具有趋礁习性的物种进行环境丰容, 使用人工鱼礁作为结构丰容的材料, 结合增殖放流, 响应我国“蓝色粮仓”号召(方琼玫等, 2018; 杨红生, 2019; 许强等, 2018; 段丁毓等, 2020), 在实现水生生物福利提升的同时, 为我国渔业更好的发展提供技术支持和理论基础。

总之, 环境丰容技术的发展与水生生物福利水平的进一步提升密切相关, 进一步构建、完善水生生物环境丰容技术体系将为我国渔业的发展带来新的契机, 有助于我国渔业实现更好、更稳健地发展。

参 考 文 献

- Anderson RC, Wood JB. Enrichment for giant Pacific octopuses: Happy as a clam? *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2001, 4(2): 157–168
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM, *et al.* Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture*, 2009, 288(1–2): 51–56
- Batzina A, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z, *et al.* Effects of environmental enrichment on growth, aggressive behaviour and brain monoamines of gilthead seabream *Sparus aurata* reared under different social conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 169: 25–32
- Batzina A, Karakatsouli N. The presence of substrate as a means of environmental enrichment in intensively reared gilthead seabream *Sparus aurata*: Growth and behavioral effects. *Aquaculture*, 2012, 370–371: 54–60
- Braithwaite VA, Ebbesson LOE. Pain and stress responses in farmed fish. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2014, 33(1): 245–253
- Braithwaite VA, Salvanes AGV. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: Implications for rehabilitating wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 272(1568): 1107–1113
- Brockmark S, Adriaenssens B, Johnsson JI. Less is more: Density influences the development of behavioural life skills in trout. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, 277(1696): 3035–3043
- Brockmark S, Neregård L, Bohlin T, *et al.* Effects of rearing density and structural complexity on the pre- and postrelease performance of Atlantic salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2007, 136(5): 1453–1462
- Brydges NM, Braithwaite VA. Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science*, 2009, 118(3–4): 137–143
- Carbia PS, Brown C. Environmental enrichment influences spatial learning ability in captive-reared intertidal gobies (*Bathygobius cocosensis*). *Animal Cognition*, 2019, 22: 89–98
- Castanheira MF, Conceição LEC, Millot S, *et al.* Coping styles in farmed fish: Consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 9(1): 23–41
- Chen Y, Li XG, Wang SB. The design of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) in Beijing Zoo. *Xiandai Horticulture*, 2018(1): 114–115 [陈旸, 李晓光, 王树标. 北京动物园大鲵展示环境丰容设计. *现代园艺*, 2018(1): 114–115]
- Chen Y, Qiao YL, Wang SB, *et al.* Amphibian and reptile display and plant landscaping and maintenance in Beijing Zoo. *Chinese Horticulture Abstracts*, 2016, 32(2): 132–135 [陈旸, 乔轶伦, 王树标, 等. 北京动物园两栖爬行动物展示与植物造景及维护. *中国园艺文摘*, 2016, 32(2): 132–135]
- Collymore C, Tolwani RJ, Rasmussen S. The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2015, 54(3): 280–285
- Corcoran M. Environmental enrichment for aquatic animals. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2015, 18(2): 305–321
- Du H. Conservation aquaculture of Dabry's sturgeon *Acipenser dabryanus*: Fitness for survival of the fingerlings and juveniles from enriched rearing environment. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2014 [杜浩. 达氏鲟的保护养殖: 丰容环境中仔幼鱼的生存适应性. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2014]
- Duan DY, Qin CX, Zhu WT, *et al.* Ecological classification of marine ranching based on landscape ecology: A case study of Zhelin Bay marine ranching. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 1–10 [段丁毓, 秦传新, 朱文涛, 等. 海洋牧

- 场景生态分类研究:以柘林湾海洋牧场为例. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 1-10]
- Duan DY, Qin CX, Zhu WT, *et al.* Research on landscape structure and pattern of marine ranching in Zhelin Bay, east Guangdong. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(9): 1981-1992 [段丁毓, 秦传新, 朱文涛, 等. 粤东柘林湾海洋牧场景观结构与格局的分析研究. 水产学报, 2019, 43(9): 1981-1992]
- Fang QW, Cai DM. How does the "blue granary" move from light blue to dark blue? The first Guangdong Ocean Ranch Expert Forum was held in Guangzhou. *Ocean and Fishery*, 2018(8): 18-19 [方琼玖, 蔡冬梅. "蓝色粮仓"如何从浅蓝迈向深蓝? 广东首届海洋牧场专家论坛在广州举行. 海洋与渔业, 2018(8): 18-19]
- FAWC. Report on priorities for animal welfare: research and development. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1993, 5-19
- Hammenstig D, Sandblom E, Axelsson M, *et al.* Effects of rearing density and dietary fat content on burst-swim performance and oxygen transport capacity in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 2014, 85(4): 1177-1191
- Huang XH, Xu BZ, Zhang L, *et al.* On the form of wildlife abundance under the guidance of animal welfare in China. *Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018, 39(3): 16-17 [黄潇航, 许必钊, 张龙, 等. 我国动物福利思想指导下野生动物丰容形式浅谈. 湖北畜牧兽医, 2018, 39(3): 16-17]
- Huntingford FA, Kadri S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. *Revue Scientifique et Technique*, 2014, 33(1): 233-244
- Kadry VO, Barreto RE. Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, during resident-intruder interactions. *Neotropical Ichthyology*, 2010, 8(2): 329-332
- Kihlslinger RL, Nevitt GA. Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(3): 504-509
- Kistler C, Hegglin D, Würbel H, *et al.* Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). *Applied Animal Behaviour Science*, 2011, 135(4): 318-327
- Lee CJ, Paull GC, Tyler CR. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 2019, 94(1): 86-95
- Lee CJ, Tyler CR, Paull GC. Can simple tank changes benefit the welfare of laboratory zebrafish *Danio rerio*? *Journal of Fish Biology*, 2018, 92(3): 653-659
- Lee JSF, Berejikian BA. Effects of the rearing environment on average behaviour and behavioural variation in steelhead. *Journal of Fish Biology*, 2008, 72(7): 1736-1749
- Li B. A study on China marine ranching construction. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [李波. 关于中国海洋牧场建设的问题研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Li H, Pan WJ, Liu DQ, *et al.* The effects of environmental enrichment to captive chimps. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 2005, 41(4): 410-414 [李华, 潘文婧, 刘东强, 等. 环境丰容对圈养黑猩猩行为的影响. 北京师范大学学报(自然科学版), 2005, 41(4): 410-414]
- Liu BX, Guo SL, Ye SY, *et al.* Impact of environmental and food enrichment on time distribution of captive black bears. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(11): 230-233 [刘冰许, 郭书林, 叶淑英, 等. 环境与食物丰容对圈养黑熊活动时间分配的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2016(11): 230-233]
- Liu XL. Preliminary study on ecologicalization of zoo buildings. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013(2): 111-112 [刘霞利. 浅谈动物园馆舍的生态化. 畜牧兽医科技信息, 2013(2): 111-112]
- Mao J, Zuo ZL, Yang XY, *et al.* Environmental enrichment and behaviors of impressed tortoise in captivity. *Chinese Journal of Wildlife*, 2010, 31(4): 197-200 [毛杰, 左智力, 杨小仪, 等. 凹甲陆龟人工饲养环境丰容及行为观察实验. 野生动物, 2010, 31(4): 197-200]
- Markowitz H. Behavioral enrichment in the zoo. *Biological Society*, 1983, 54(3): 164-165
- Mellen J, MacPhee MS. Philosophy of environmental enrichment: Past, present, and future. *Zoo Biology*, 2001, 20(3): 211-226
- Mellen JD, Ellis S. *Animal learning and husbandry training*. Chicago: University of Chicago Press, 1996
- Mellor DJ, Stafford KJ. Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare. *Australian Veterinary Journal*, 2001, 79(11): 762-768
- Mo BL, Qin CX, Chen PM, *et al.* Preliminary analysis of structure and function of Daya Bay ecosystem based on Ecopath model. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(2): 9-19 [莫宝霖, 秦传新, 陈丕茂, 等. 基于 Ecopath 模型的大亚湾海域生态系统结构与功能初步分析. 南方水产科学, 2017, 13(2): 9-19]
- Papoutsoglou SE, Karakatsouli N, Psarrou A, *et al.* Gilthead seabream (*Sparus aurata*) response to three music stimuli (Mozart-"Eine Kleine Nachtmusik," Anonymous-"Romanza," Bach-"Violin Concerto No. 1") and white noise under recirculating water conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(1): 219-232
- Persson L, Alanärä A. The effect of shelter on welfare of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* reared under a feed restriction regimen. *Journal of Fish Biology*, 2014, 85(3): 645-656
- Ploeg A. The volume of the ornamental fish trade. *Ornamental Fish International*, 2007, 48-61
- Pounder KC, Mitchell JL, Thomson JS, *et al.* Does environmental enrichment promote recovery from stress in rainbow trout? *Applied Animal Behaviour Science*, 2016, 176: 136-142

- Qin CX, Zhu WT, Ma HM, *et al.* Are habitat changes driving protist community shifts? A case study in Daya Bay, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2019, 227
- Roberts LJ, Taylor J, Gough PJ, *et al.* Silver spoons in the rough: Can environmental enrichment improve survival of hatchery Atlantic salmon *Salmo salar* in the wild? *Journal of Fish Biology*, 2014, 85(6): 1972–1991
- Roberts LJ, Taylor J, Leaniz CGD. Environmental enrichment reduces maladaptive risk-taking behavior in salmon reared for conservation. *Biological Conservation*, 2011, 144(7): 1972–1979
- Salwanes AGV, Braithwaite VA. Exposure to variable spatial information in the early rearing environment generates asymmetries in social interactions in cod (*Gadus morhua*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2005, 59(2): 250–257
- Schroeder P, Jones S, Young IS, *et al.* What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. *Laboratory Animals*, 2014, 48(4): 328–337
- Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M. *Second nature: Environmental enrichment for captive animals*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1998
- Sneddon LU. The bold and the shy: Individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 2003, 62(4): 971–975
- Solås MR, Skoglund H, Salwanes AGV. Can structural enrichment reduce predation mortality and increase recaptures of hatchery-reared Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry released into the wild? *Journal of Fish Biology*, 2019, 95(2): 575–588
- Stevens CH, Croft DP, Paull GC, *et al.* Stress and welfare in ornamental fishes: What can be learned from aquaculture? *Journal of Fish Biology*, 2017, 91(2): 409–428
- Sullivan M, Lawrence C, Blache D. Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment for captive fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 2015, 174: 181–188
- Swaigood RR, Shepherdson DJ. Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: What's been done and where should we go next. *Zoo Biology*, 2005, 24(6): 499–518
- Tatara CP, Riley SC, Scheurer JA. Growth, survival, and habitat use of naturally reared and hatchery steelhead fry in streams: Effects of an enriched hatchery rearing environment. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2009, 138(3): 441–457
- Tian XH, Zhang LY, Wang C. Environmental enrichment technique of zoos and methods of estimation. *Chinese Journal of Wildlife*, 2007, 28(3): 64–68 [田秀华, 张丽焯, 王晨. 动物园环境丰容技术及其效果评估方法. *野生动物*, 2007, 28(3): 64–68]
- Ullah I, Zuberi A, Khan KU, *et al.* Effects of enrichment on the development of behaviour in an endangered fish mahseer (*Tor putitora*). *Applied Animal Behaviour Science*, 2017, 186: 93–100
- Volgin AD, Yakovlev OV, Demin KA, *et al.* Understanding the role of environmental enrichment in zebrafish neurobehavioral models. *Zebrafish*, 2018, 15: 5
- Wang ZY, Zhou ZJ, Wang WH, *et al.* Technology and design of habitat enrichment of wildlife in captivity. *Chinese Journal of Wildlife*, 2010, 31(5): 276–279 [王志永, 周正军, 王万华, 等. 圈养野生动物的栖息地丰容技术及其设计. *野生动物*, 2010, 31(5): 276–279]
- Watz J. Structural complexity in the hatchery rearing environment affects activity, resting metabolic rate and post-release behaviour in brown trout *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 2019, 95(2): 638–641
- Williams TD, Readman GD, Owen SF. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Laboratory Animals*, 2008, 43(2): 107–120
- Wu HL, Sha BF, Zhu JQ, *et al.* Improve the welfare of captive animals by environmental enrichment. *Chinese Journal of Wildlife*, 2015, 36(4): 463–467 [吴海丽, 沙炳福, 朱建青, 等. 通过环境丰容提高圈养野生动物福利. *野生动物学报*, 2015, 36(4): 463–467]
- Xu Q, Liu W, Gao F, *et al.* Development of marine ranching at tropical island area in south China sea—advantages, status and prospects. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 173–180 [许强, 刘维, 高菲, 等. 发展中国南海热带岛礁海洋牧场——机遇、现状与展望. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 173–180]
- Yang HS, Zhang SY, Zhang XM, *et al.* Strategic thinking on the construction of modern marine ranching in China. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1255–1262 [杨红生, 章守宇, 张秀梅, 等. 中国现代化海洋牧场建设的战略思考. *水产学报*, 2019, 43(4): 1255–1262]
- Yang HS. Development ideas and implementation approaches of blue granary scientific and technological innovation in China. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 97–104 [杨红生. 我国蓝色粮仓科技创新的发展思路与实施途径. *水产学报*, 2019, 43(1): 97–104]
- Yang XM, Li F. Problems in development of wildlife parks in China and strategies of their sustainable development. *Chinese Journal of Wildlife*, 2008, 29(3): 152–156, 159 [杨秀梅, 李枫. 中国野生动物园发展中的突出问题及可持续发展对策. *野生动物*, 2008, 29(3): 152–156, 159]
- Yang Y, Zhang S, Liu QX, *et al.* Influence of environmental enrichment on space utilization by captive red panda. *Chinese Journal of Wildlife*, 2019, 40(2): 300–306 [杨阳, 张姝, 刘群秀, 等. 环境丰容对圈养小熊猫室内展区空间利用的影响. *野生动物学报*, 2019, 40(2): 300–306]
- Zhang EQ. Ex-situ conservation of amphibians and reptiles. *Chinese Journal of Wildlife*, 2006, 27(6): 41–43, 34 [张恩权. 两栖爬行动物的异地保护. *野生动物*, 2006, 27(6): 41–43, 34]
- Zhang YZ. Research status and development prospects of

environmental enrichment in Chinese zoos. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2014(22): 243–246 [张轶卓. 中国动物园环境丰容的科研现状和发展前景. *现代农业科技*, 2014(22): 243–246]

Zhang ZH, Dong JY, Zhang XM, *et al.* Effects of environmental enrichment on the distribution of *Sebastes schlegelii* in early developmental stages. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(22): 8223–8233 [张宗航, 董建宇, 张雪梅, 等. 环境丰容对早

期发育阶段许氏平鲈趋礁行为的影响. *生态学报*, 2018, 38(22): 8223–8233]

Zhao YM, Yin JN, Peng TT, *et al.* Behavioral responses of the greater flamingo(*Phoenicopterus roseus*) to the environment and food enrichment in Harbin Northern Forest Zoo. *Chinese Journal of Wildlife*, 2018, 39(4): 917–921 [赵雨梦, 尹江南, 彭彤彤, 等. 北方森林动物园大红鹤对环境和食物丰容的行为反应. *野生动物学报*, 2018, 39(4): 917–921]

(编辑 马璀璨)

Review on Environmental Enrichment for Aquatic Organisms

QIN Chuanxin^①, PAN Wann^{1,2}, YU Gang¹, ZUO Tao¹, XI Shigai¹, ZHU Wentao^{1,2}, MA Hongmei¹

(1. *South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National Agricultural Experimental Station for Fishery Resources and Environment, Dapeng, Scientific Observing and Experimental Station of South China Sea Fishery Resources and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China, Key Laboratory of Marine Ranching Technology, CAFS, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300*; 2. *Shanghai Ocean University, Shanghai 201306*)

Abstract With the development of fishery technology and people's improving living standards, the demand for aquatic organisms has gradually increased. Whether in terms of economic value, ornamental value and educational significance, aquatic organisms have gradually become an indispensable part of our lives. However, aquatic organisms especially fish still have a low level of welfare in the process of the breeding, transportation and display. Finding a suitable method to solve the problems of low welfare of aquatic organism has become an important issue for improving aquatic organism welfare. As one of the technical means to improve the welfare of captive animals, environmental enrichment can increase the living conditions and welfare of captive animals by adding some stimulating factors to the captive environment, so as to make the captive animals have normal psychological and physiological health and show their natural behaviors. At present, compared with foreign countries, domestic researches on environment enrichment of aquatic organisms is still in its infancy. Using environmental enrichment technology to improve the living conditions, ensure and enhance the level of welfare of aquatic organisms has become a research hotspot. Therefore, based on the review of the research progress and application of environmental enrichment technology in aquatic organisms at home and abroad, this paper divided the environmental enrichment technology of the aquatic organisms into four categories, discussed the existing problems of environmental enrichment technology and put forward some suggestions, in order to provide more scheme reference and theoretical basis for environmental enrichment technology of aquatic organisms.

Key words Environmental enrichment; Animal welfare; Aquatic organisms

① Corresponding author: QIN Chuanxin, E-mail: qincx@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191213001

http://www.yykxjz.cn/

周丽青, 赵丹, 吴宙, 吴磊, 杨金龙. 主要经济双壳贝类性别分化的分子机制概述. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 194–202
Zhou LQ, Zhao D, Wu Z, Wu L, Yang JL. Review: Molecular mechanism of sex differentiation in major economic bivalves. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 194–202

主要经济双壳贝类性别分化的分子机制概述*

周丽青^{1,2} 赵丹² 吴宙³ 吴磊⁴ 杨金龙^{2①}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
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 上海 201306;
3. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316000;
4. 江苏海洋大学海洋生命与水产学院 连云港 222005)

摘要 本文简要概述了主要经济双壳贝类性别分化分子机制研究进展, 介绍国内外研究性别分化和性别决定的代表性双壳贝类物种及主要研究成果, 主要涉及牡蛎科(Ostreidae)、扇贝科(Pectinidae)、珍珠贝科(Pteriidae)等常见的经济物种, 分子层面涵盖了核酸、蛋白质和激素等, 通过综述这些物种相关研究的现状, 展望双壳贝类性别分化研究的发展趋势, 以期加深对双壳贝类性别分化和性腺发育的认识, 为解析虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)及其他双壳贝类性别分化分子机制研究理清思路。

关键词 双壳贝类; 性别分化; 基因; 分子; 核酸; 激素; 蛋白质

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0023-09

贝类繁殖机制与性别分化一直是生物学研究目标之一, 因种类繁多、方式各异, 目前对软体动物繁殖的分子机制仍知之甚少(Song *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014)。海洋软体动物, 尤其双壳贝类存在雌雄同体现象, 但关于雌雄同体形成及性别分化的数据, 包括性别分化和性别决定过程的分子数据, 还不多见(Teaniniuraitemoana *et al.*, 2014)。随着分子生物学研究技术的快速发展, 研究者们围绕双壳贝类性腺发育、繁殖特性及性别分化和性别决定开展的研究越来越深入。结合作者目前在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性腺发育和性别分化开展的研究工作, 本文简要介绍牡蛎科(Ostreidae)、扇贝科(Pectinidae)、珍珠贝科(Pteriidae)等常见的经济物种性别分化、性

别决定和性腺发育的研究现状, 重点探讨双壳贝类性别分化研究的发展趋势, 以期加深对双壳贝类性别分化和性腺发育的认识。一般来说, 有机体的性别由 2 个因素决定: 遗传因素或环境因素。*sox 9*、*foxl 2*、*Gata* 型锌指蛋白 I (*zglp1*)、蛋白 *ovo(ovo)* 和 *dmrt* 基因参与了贝类的遗传性别决定与分化。激素用量、温度、污染、养殖条件等因素也影响着贝类的性别决定, 有时会引起性别逆转。双壳贝类性别分化或变化的分子机制研究综述如下。

1 牡蛎科性腺发育与性别分化分子机制

牡蛎(*Ostreida*)俗称海蛎子, 是世界第一大养殖贝

* 国家自然科学基金(31672637)、国家重点研发计划(2018YFD0900800)和浙江重中之重开放基金(KF2018008)共同资助
[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672637), National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900800), and Zhejiang Provincial Top Discipline of Bioengineering (Level A) of China (KF2018008)].
周丽青, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 杨金龙, 教授, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-12-13, 收修改稿日期: 2020-02-08

类。除了可食用外,牡蛎也是海洋生态系统的重要成员,对内湾和近海水域藻华的调控有重要作用。牡蛎种类也很多,有些牡蛎有性生殖系统比较神奇,由雌雄异体、性别变化和偶尔的雌雄同体组成,尽管很多

研究人员已经对牡蛎进行了大量研究,但对性别决定和分化的分子机制的认识仍然存在很多盲区,关于繁殖调控的分子通路研究也很少。有关牡蛎性腺发育和性别分化相关研究见表 1。

表 1 牡蛎科性腺发育及性别分化过程中的分子生物学研究

Tab.1 Reports on molecular biology research of gonad development and sex differentiation in Ostreidae

序号 No.	种类 Species	主要研究内容 Major research	参考文献 Reference
1	<i>Crassostrea gigas</i>	采用高效液相色谱仪(HPLC)测定长牡蛎性腺中性激素含量。性腺中可以合成雌性激素,其水平随生殖周期的变化而变化,在配子的发育过程中起作用	Matsumoto 等(1997)
2	<i>Crassostrea gigas</i>	根据脊椎动物(神经)肽受体共有序列通过 RT-PCR 克隆长牡蛎受体基因(<i>Cg-GnRH-R</i>)。定量 PCR 显示生殖周期中 <i>Cg-GnRH-R</i> 在雄性和雌性性腺中均有特异性表达,首次证明 GnRH 受体同源物可能参与原口无脊椎动物的生殖控制	Rodet 等(2005)
3	<i>Crassostrea gigas</i>	观察鉴定到长牡蛎中 1 个 GnRH-R mRNA 前体,通过可变剪接产生 2 个同源异型的促性腺激素释放激素受体产物,一个是 <i>Cg-GnRH-R</i> , 另一个是(<i>Cg-GnRH-RII-L/Cg-GnRH-RII-S</i>),还包括一个短受体(<i>Cg-GnRH-R-TF</i>)。这 2 个同源异型的促性腺激素释放激素受体都具有配体特异性	Rodet 等(2008)
4	<i>Crassostrea gigas</i>	鉴定 <i>Cg-dml(Cg-dmrt like)</i> , 实时定量 PCR 反应和原位杂交结果表明, <i>Cg-dml</i> 在两性中均有表达,在成年配子发生周期结束时,雄性中的表达明显高于雌性, <i>Cg-dml</i> 可能参与了性腺的发育	Naimi 等(2009)
5	<i>Crassostrea gigas</i>	荧光定量 PCR 和原位杂交显示, <i>Cg-Foxl2</i> 在雌、雄配子发生周期中表达增加,但在雌性性腺中的表达量显著增加早于雄性,这种增加对应于卵黄发生期;在 1~1.5 月龄稚贝中, <i>Cg-DML</i> (雄性性腺分化潜在因素)和 <i>Oyvlg(vasa-like 基因)</i> 表达高峰和 <i>Cg-Foxl2</i> 表达显著下降,与性原细胞分化为生殖干细胞的第一次性别形成相对应	Naimi 等(2009)
6	<i>Crassostrea gigas</i>	设计针对牡蛎 <i>Oyvlg</i> 的 dsRNA, 在体内将 <i>oyvl-dsRNA</i> 注射到性腺中,引起生殖细胞增殖不足和整个性腺过早阻止减数分裂的基因敲除表型。证明 <i>Oyvlg</i> 对牡蛎生殖细胞发育具有重要意义。	Fabioux 等(2009)
7	<i>Crassostrea gigas</i>	采用免疫检测和增殖细胞核抗原(PCNA)表达法和实时定量 PCR 检测 PCNA 基因在整个性腺区的表达,并与激光显微切割保存的性腺组织进行比较。PCNA 基因在雄性中的表达高于雌性,与精子发生密切相关	Franco 等(2010)
8	<i>Crassostrea gigas</i>	通过采用抗体阻止长牡蛎性腺中 TGF- β 蛋白的成熟会使性腺萎缩,说明成熟的 TGF- β 能激活牡蛎生殖细胞正常发育	Corporeau 等(2011)
9	<i>Crassostrea gigas</i>	通过定向特异性 RT-PCR、实时定量 PCR 和原位杂交技术分析 <i>Cg-Foxl2</i> mRNA 在成贝性腺中的表达情况,认为 <i>Cg-Foxl2</i> 是导致既有雌雄异体又有雌雄同体的雌性性腺分化最保守的早期级联表达的基因之一	Santerre 等(2012)
10	<i>Crassostrea gigas</i>	采用研发的一种含有 31918 种寡聚核苷酸序列的微阵列确定可变雌雄同体牡蛎性腺发育早中期性别分化的潜在标志物,鉴定出特异性表达基因。	Dheilily 等(2012)
11	<i>Crassostrea gigas</i>	利用 RNA 干扰技术研究发现,牡蛎性腺转化生长因子 β (<i>og-TGFβ</i>)在牡蛎生殖细胞发育过程中起着重要的作用	Huvet 等(2012)

续表 1

序号 No.	种类 Species	主要研究内容 Major research	参考文献 Reference
12	<i>Crassostrea gigas</i>	克隆了长牡蛎 GnRH 样肽前体的 cDNA 转录本, 比较二者与其他无脊椎动物和脊椎动物的未加工的和成熟的氨基酸序列, 确定了它们的表达位点和生物活性	Treen 等(2012)
13	<i>Crassostrea gigas</i>	研究腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)亚基的 mRNA 在配子发生过程中的表达, 发现雌雄同体牡蛎在繁殖过程中表现出较高的能量分配	Guévelou 等(2013)
14	<i>Crassostrea gigas</i>	不同温度条件下, <i>Cg-Dml</i> 、 <i>Cg-SoxE</i> 、 <i>Cg-β-catenin</i> 、 <i>Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os</i> 等基因和生殖细胞标志物 <i>Oyvlg</i> 的 mRNA 表达结果证实牡蛎性别决定时间和控制的分子级联假设, 认为温度影响着牡蛎的性别决定, 提出混合性别决定系统(GSD+TSD)	Santerre 等(2013)
15	<i>Crassostrea gigas</i>	研究了 <i>SoxE</i> 和 <i>β-catenin</i> 的同源序列, 推测这些基因可能都参与牡蛎早期性别分化以及性别决定	Santerre 等(2014)
16	<i>Crassostrea gigas</i>	基于性腺转录组序列, 分析鉴定牡蛎中关键的性别决定基因 (<i>SoxH</i> 或 <i>Sry-like</i> 和 <i>Foxl2</i>)及新同源物。 <i>CgSoxH</i> 可能是一个新的主要的雄性性腺决定调节因子, 直接或间接地与促进雄性性腺的 <i>CgDsx</i> 和促进雌性性腺的 <i>CgFoxl2</i> 相互作用	Zhang 等(2014)
17	<i>Crassostrea gigas</i>	采用 RNA 干扰技术, 研究了淀粉酶在长牡蛎消化道中的作用, 观察到喂养过程中能量吸收与牡蛎配子发生之间的关系	Huvet 等(2015)
18	<i>Crassostrea gigas</i>	利用免疫组织化学技术, 观察细胞色素 P450 系列 (CYP) <i>CYP356A1</i> 在早期雄性生殖细胞的表达情况, 认为这种蛋白质可能参与雄性性腺发育	Rodrigues-Silva 等(2015)
19	<i>Crassostrea gigas</i>	以长牡蛎 F ₁ 全同胞家系为作图群体, 构建含有 120 个微卫星和 66 个 SNP 标记的长牡蛎雌雄性别连锁图谱	仲晓晓等(2015)
20	<i>Crassostrea gigas</i>	通过全基因组测序技术鉴定出 1307 个在雌性性腺中特异高度表达基因, 526 个雄性性腺中特异高度表达基因。发现 <i>Sox9</i> 、 <i>SRY</i> 等基因在牡蛎雄性性腺中特异表达, 认为可能是决定牡蛎雄性转变的重要调控基因	许飞等(2016)
21	<i>Crassostrea gigas</i>	运用免疫荧光观察干细胞及线粒体标记, 分析 <i>Sox2</i> 、 <i>vasa</i> 和染色质结合的 Ser10 磷酸化组蛋白 H3 等标记物在牡蛎早期配子发生过程中的特征, 研究性别分化	Cavelier 等(2017)
22	<i>Crassostrea gigas</i>	通过对长牡蛎基因组的分析, 筛选出与繁殖相关的基因	Song 等(2017)
23	<i>Crassostrea gigas</i>	使用荧光标签甲基化敏感扩增多态性技术(F-MSAP)研究牡蛎全基因组甲基化模式。发现长牡蛎雌性和雄性性腺发育过程中甲基化有变化	Zhang 等(2018)
24	<i>Crassostrea gigas</i>	利用加权基因相关网络分析(WGCNA)方法对不同配子发育阶段性腺进行 RNA-seq 分析, 鉴定雌、雄性腺发育相关基因模块。GO 和 KEGG 富集分析显示, 与雌性性腺发育相关的基因中, 神经递质相关项显著富集, 提示神经递质可能调节雌性性别分化	Yue 等(2018)
25	<i>Crassostrea gigas</i>	鉴定了长牡蛎 <i>Cg-Nanos-like</i> 的同源物, 并研究 <i>Nanos</i> 在 <i>C. gigas</i> 配子发生和胚胎发生过程中的表达模式。 <i>Cg-Nanos-like</i> 参与生殖细胞的发育和卵母细胞成熟的维持	Xu 等(2018)
26	<i>Crassostrea gigas</i>	通过 RACE 技术获得牡蛎 <i>Fem</i> 基因 cDNA 全长序列。通过 RT-PCR 技术对牡蛎周年性腺样品进行表达分析。推测 <i>Fem-1b</i> 和 <i>Fem-1c</i> 可能参与性别决定和性别分化过程	周祖阳等(2018)

续表 1

序号 No.	种类 Species	主要研究内容 Major research	参考文献 Reference
27	<i>Crassostrea virginica</i> Gmelin	利用蛋白质组学工具 Proteinchip [®] 和 SELDI-TOF-MS 分析血淋巴蛋白质, 建立一种测定牡蛎性别和发育阶段的方法。从牡蛎血淋巴中检测到 139 个以上的肽或蛋白质, 其中, 62 个与生殖活动有关	Li 等(2010)
28	<i>Crassostrea virginica</i> Gmlin	报道一种不需杀死亲贝、利用蛋白芯片和 SELDI-TOF-MS 技术分析血淋巴蛋白组来鉴定性别及发育阶段的方法	Li 等(2011)
29	<i>Crassostrea angulata</i>	采用酶联免疫吸附法研究福建牡蛎雌二醇-17 β (E2)和睾酮(T)含量的变化, 获得一个编码牡蛎雌激素受体(ER), ER 可能在牡蛎性腺发育中起重要作用	Ni 等(2013)
30	<i>Crassostrea angulata</i>	通过雌雄性腺中调节蛋白差异分析, 发现对 Zn 胁迫的应对机制存在性别差异	Luo 等(2017)
31	<i>Crassostrea corteziensis</i> Hertlein	分析牡蛎生殖周期中性腺和非生殖相关的体细胞中 9 种金属微量元素浓度。推测 Mn 在性腺成熟或即将排放生殖细胞的过程中可能发挥某些作用	Frías-Espericueta 等(1999)
32	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	应用原位杂交(ISH)技术分析牡蛎中先前被 PHE 激活的 <i>CYP2A1</i> 基因的组织分布。 <i>CYP2A1</i> 信号在不同发育时期雌性性腺中所有卵泡细胞中均有表达, 而雄性只有在精子排放前的滤泡壁细胞才有表达	Reis 等(2015)
33	<i>Crassostrea hongkongensis</i>	对香港巨牡蛎雌性和雄性性腺间差异表达的 miRNAs 进行鉴定, 靶基因在多种 KEGG 代谢途径中富集, 包括 ECM 受体相互作用、半乳糖代谢、吞噬体和 notch 信号通路等。这些通路参与性腺分化和功能维持	Wei 等(2019)
34	<i>Saccostrea glomerata</i>	通过高通量转录组和肽组分析, 确定在悉尼岩牡蛎内脏神经节和性腺的关键调节组织中表达的基因和神经肽。合成 28 种具有生物活性的神经肽, 并对其促性腺发育和产卵能力进行测定。测试证明 APGWa 和 buccalin 促进调节性腺成熟的能力	In 等(2016)

相关文献以品种和报道时间为序排布, 从表 1 可以看出, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)因为分布范围广泛, 对其性腺发育和性别分化的研究开展得最多。从 20 世纪 90 年代起, 至 2008 年前后, 科研人员尝试检测性激素含量和分析促性腺激素释放激素受体 *GnRH-R* 基因表达情况, 来阐述性腺发育或性别分化的过程; 2012~2013 年期间, 也有关于长牡蛎 *GnRH* 样肽前体基因的表达位点和生物活性的报道, 及性腺转化生长因子 β (*og-TGF β*) 在牡蛎生殖过程中的作用, 又如 Ni 等(2013)用酶联免疫吸附法研究福建牡蛎雌二醇-17 β (E2)和睾酮(Testosterone, T)含量的变化, 获得一个编码牡蛎雌激素受体(ER), 认为 ER 可能在牡蛎性腺发育中起重要作用; Naimi 等(2009)分别观察了长牡蛎 *Cg-dml*、*Cg-Foxl2* 和 *vasa-like* 基因(*Oyvlg*) 在雌雄配子发生周期中的表达特征; 同年, Fabioux 等(2009)采用 RNA 干扰技术敲除性腺细胞中的 *Oyvlg* 基因, 从而证明 *Oyvlg* 对牡蛎生殖细胞发育具有重要意义, 开启了一系列性别分化相关基因鉴定及功能的研

究。随着分子生物学和生物信息学分析技术的发展, 转录组、基因组、蛋白质组和代谢组等组学分析技术和精密检测设备的研发, 使进一步揭示牡蛎性腺发育和性别分化机制终将成为可能, 并明确了牡蛎性别分化过程是个多基因参与、环境和遗传因素相互作用的遗传通路, 这些研究也为扇贝、珠母贝等其他贝类的相关研究奠定了基础。从最早的激素含量检测分析, 到性别分化相关基因的序列及功能分析, 再到组学分析, 目标只有一个, 就是探讨牡蛎性别分化机制, 从而实现对牡蛎的性别和繁殖调控, 有利于牡蛎的遗传改良。

2 扇贝科性腺发育与性别分化分子机制

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国重要的水产养殖品种, 然而, 频繁的大规模病害已严重影响到产业的发展, 遗传连锁图谱对栉孔扇贝的遗传改良和选择性育种有借鉴作用。因此, 研究人员构建了栉孔扇贝性别相关 AFLP 遗传连锁图谱, 其中, 有 1 个性别标记在雌性第 19 个连锁组上, 重组率为 0, LOD 为 27.3,

而对应的雄性中没有这个标记,雌性中这个特殊的标记(P2f230)一旦得到证实,将来可以分离、克隆、测序和转化为 Sequence characterized amplified region (SCAR),将其定位于染色体上作为性别决定的基因(Li *et al.*, 2005)。在双壳贝类雌雄间性状无明显差异、尚未见有性染色体的报道及性别决定因子或性别决定机制不清楚的情况下,构建分子标记高密度遗传连锁图谱将为品种改良奠定基础,多种双壳贝类遗传连锁图谱构建中均发现,雄性遗传连锁图谱中基因重组率要低于雌性,说明减数分裂时,雌性基因连锁互换的频率要高于雄性,栉孔扇贝(Wang *et al.*, 2005)和虾夷扇贝(Chen *et al.*, 2012)也是如此,与 *Tegillarca granosa* (Liu *et al.*, 2017)、长牡蛎(Li *et al.*, 2004)和贻贝(*Mytilus edulis*) (Lallias *et al.*, 2007)相似。

虾夷扇贝是中国和日本重要的养殖贝类。除具有商业价值,还因其养殖群体中一定比例的雌雄同体在性别决定和分化机制研究中的价值而备受关注。为确定虾夷扇贝分子性别分化的开始,筛选早期性别鉴定的分子标记,对 5~13 月龄贝的性腺进行组织学检查,发现 10 月龄在性腺形态上发生性别分化,8 个性别决定或分化候选基因的性腺表达谱显示,只有 2 个基因表现出性别二型表达,雌性性腺中含有丰富的 FOXL2,雄性性腺中含有大量 DMRT1L,研究将有助于更好地理解双壳类性别分化的分子机制(Li *et al.*, 2018)。利用 Illumina 测序技术对成熟期雄性和雌性性腺转录组文库进行配对和末端测序,通过 BlastX 与 Swiss-Prot 和 NR 开放数据库相比,9354 个 unigenes 与已知的独特蛋白质显著匹配。根据注释信息,至少有 30 个与性别决定和分化相关的基因,如 *Dmrt1*、*Sox9*、*fem1* 和 *vasa* 被筛选和鉴定(Yang *et al.*, 2016)。也有研究对虾夷扇贝 3 个雌性和 3 个雄性性腺的转录组进行测序和分析,研究了先前在脊椎动物中报道的关键性别决定基因,并推测存在于双壳类贝类中,即 *FOXL2*、*DMRT*、*SOXH* 和 *SOXE* 等。这些基因均具有保守的功能结构域,并在性腺中被检测到,其中, *PyFOXL2* 偏向雌性, *PyDMRT* 和 *PySOXH* 偏向雄性,表明这 3 个基因可能是扇贝性别决定或分化的关键候选基因(Li *et al.*, 2016)。为进一步研究双壳类性别决定和分化的分子机制提供了资料。

许多软体动物常发生性逆转,性激素可能会参与这一过程。在成体虾夷扇贝中,促性腺激素释放激素和 17 β -雌二醇(E2)参与了雄贝的性成熟过程。成熟期, *Foxl2* 和 *Tesk* 分别在扇贝的雌性和雄性性腺中表达。性逆转期,扇贝性腺器官培养时,性激素处理降低了性逆转期大部分扇贝性腺 *Tesk* 的表达。然而,

在培养的成熟性腺中,无论是 E2 还是睾酮(T)作用, *Foxl2* 和 *Tesk* 的表达都没有明显的变化,提示性激素处理可能影响性逆转期的性腺发育(Otani *et al.*, 2017)。促性腺激素释放激素(GnRH)是控制脊椎动物生殖周期的核心,由于 GnRH 同源激素也存在于无脊椎动物中,因此,可能在双壳贝类中的也具有共同的祖先 GnRH 样肽。比较虾夷扇贝 GnRH 样肽前体的 cDNA 转录本与其他无脊椎动物和脊椎动物的未加工的和成熟的氨基酸序列,确定了它的表达位点和生物活性。用抗章鱼 GnRH 样肽免疫细胞化学证明,扇贝神经组织中存在 GnRH 样肽,扇贝 GnRH 样肽对体外培养的扇贝雄性性腺精原细胞分裂有促进作用,但对体外培养的鹌鹑垂体细胞释放 LH 无促进作用(Treen *et al.*, 2012)。

3 珍珠贝科性腺发育与性别分化分子机制

珍珠贝养殖是近年来备受关注的集约化珍珠生产方式,珠母贝是生产珍珠的主要生物。这吸引了专家对珠母贝的生长和繁殖进行研究,研究的目的是通过利用控制繁殖的育种计划生产有活力的珠母贝种群。在许多动物中, *vasa* 基因同源序列常被用作特定生殖细胞检测的分子标记。珠母贝(*Pinctada fucata*)成熟亲贝和稚贝 *vasa* 基因同源序列(*povlg1*)原位杂交结果表明,1 月龄幼贝中,内脏团两侧对称分布的一团生殖细胞最初由多个细胞组成。2 月龄幼贝,这些细胞迁移到内脏团的腹侧边缘。4 月龄幼贝,这些细胞团沿内脏团的外围迁移,迁移过程中细胞数量和大小不断增加。这种对未成熟生殖细胞分布和迁移的观察,将为控制性腺发育和珍珠质量提供有用的信息(Sano *et al.*, 2015)。马氏珠母贝(*Pinctada matensii*)是我国人工培育海水珍珠的最主要珠母贝,在其养殖群体中,有少数雌雄同体个体,并在一定条件下出现性转化。因此,克隆鉴定马氏珠母贝的 *Dmrt* 基因既可丰富 *Dmrt* 基因家族的成员,探讨 *Dmrt* 基因在贝类中的保守性,也为进一步克隆贝类的性别决定和分化的候选基因及探讨贝类性别决定和分化机制提供基础资料(于非非等, 2007)。

采用第二代测序方法和 RNAseq 技术,对生产黑珍珠的黑唇珠母贝(*P. margaritifera*)不同发育阶段的雄性和雌性性腺标本进行了测序,在 Illumina 测序、组装和注释之后,差异表达分析鉴定了 1993 种不同类型性腺间差异表达的 contigs;样本聚类分析解释了性腺基因差异表达的大部分变异;对这些 contigs 的分析揭示了已知的编码与性别决定和/或分化有关的

蛋白质的特异基因的存在, 如雄性的 *dmrt* 和 *fem-1 like*, 雌性的 *foxl2* 和卵黄原蛋白特异性表达基因 *pmarg-fem1-like*、*pmarg-dmrt* 和 *pmarg-foxl2*, 在不同生殖阶段(性别不确定、性反转和性腺衰退)的表达谱表明这 3 个基因可能参与了黑唇珠母贝的精卵转换。这些为研究雌雄同体海洋软体动物的繁殖提供了一种新的转录组学分析方法, 鉴定了雄性先熟、雌雄同体黑唇珠母贝的性别分化和潜在的性别决定基因(Teaniniuraitemoana *et al*, 2014)。同样是基于 RNAseq 数据集, 严格的表达分析鉴定了 1937 个在性腺组织学分类中差异表达的 contigs; 9 个候选基因被鉴定为性别通路的标记: 7 个为雌性通路, 2 个为雄性通路(Teaniniuraitemoana *et al*, 2015)。这些是探究该物种和其他相关物种性别反转、性别分化和性别决定论的有用工具。

Pf-Dmrt4 具有 *Dmrt* 家族的典型特征, 与 *Dmrt4* 簇有显著的同源性。定量 PCR 反应测定发现, 配子发生过程中性腺中的 *Pf-Dmrt4* mRNA 在成熟个体中表达量最高; 经原位杂交证实, *Pf-Dmrt4* 在精子、精细胞、卵母细胞和卵黄原细胞中均有表达; 用 RNA 干扰技术敲除 *Pf-Dmrt4*, 导致 mRNA 表达水平下降, 注射 *Pf-Dmrt4*-dsRNA 组为排放期雄性性腺, 滤泡破裂, 精子释放。结果表明, *P. fucata* 的 *Pf-Dmrt4* 可能参与雄性性腺发育, 维持雄性生殖功能(Wang *et al*, 2018)。采用 RACE-PCR 技术, 从马氏珠母贝雄性性腺的 SMART cDNA 中克隆了 *Dmrt5* 基因的全长 cDNA 序列。同源性比对显示, *pmDmrt5* 编码的氨基酸序列与海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)和小鼠(*Mus musculus*)的 *Dmrt5* 基因的同源性并不高, 但它们的 DM 结构域是高度保守的。RT-PCR 结果认为, *pmDmrt5* 基因可能参与了马氏珠母贝性别发育的调控(于非非等, 2009)。利用 RACE-PCR 技术从 SMART cDNA 文库中克隆到一个 *Sox* 基因的 cDNA 全长, 通过荧光定量 PCR 技术, 对该基因在不同组织及发育不同时期性腺中的表达情况进行分析。结果显示, 马氏珠母贝这个 *Sox* 基因与长牡蛎 *Sox11* 基因的同源性最高, 为 80%, 故命名为 *pmSox11*; 系统进化树分析也显示, *pmSox11* 与长牡蛎 *Sox11* 基因的亲缘关系最近。荧光定量 PCR 分析组织表达特异性及时序表达图谱显示, *pmSox11* 基因可能在马氏珠母贝早期神经系统发育和性别发育的调控方面起重要作用(于非非等, 2016)。利用 RACE-PCR 技术获得企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*) *Dmrt2* 基因 cDNA 的全长序列, 通过

荧光定量 PCR 分析 *Dmrt2* 基因在各组织中的表达特征, 以及在早期雌性性腺、成熟期雌性性腺、早期雄性性腺、成熟期雄性性腺和排放期雄性性腺中的表达变化结果, 推测 *Dmrt2* 可能与企鹅珍珠贝雄性性腺的发育有关, 可能参与了企鹅珍珠贝雄性性别分化和性腺发育的生理过程(潘珍妮等, 2017)。同样地, 企鹅珍珠贝 *Sox9* 基因与黑蝶真珠蛤(*P. margaritifera*)和马氏珠母贝有高度同源性(>81%); *Sox9* 在企鹅珍珠贝各组织中均有表达, 在足中表达量最高($P<0.05$), 雄性性腺中其次; *Sox9* 在成熟期雄性性腺中检测到最大表达量($P<0.05$), 在发育早期的雄性性腺、退化期雄性性腺和成熟期雌性性腺中表达量较低, 其中, 发育早期雌性性腺表达量最低($P<0.05$)(许开航等, 2018)。

4 总结与展望

双壳贝类常有性逆转现象, 从已有的研究报道来看, 除环境因素之外, 遗传物质对性别的调控作用是主要因素, 性激素可能会参与这一过程。水产养殖业是动物性食物生产增长速度最快的领域, 贝类是水产养殖的主要对象之一, 采用现代生物技术以满足人们对水产养殖产品的数量和质量增长的需求日益迫切。然而, 主要经济贝类种类较多, 且繁殖特性和性别分化各有特点, 尽管开展了大量相关研究, 仍有很多未知亟待解答。通过对虾夷扇贝雌雄 2 个性别 3 个不同发育阶段的大样本量性腺转录组数据, 进行加权基因共表达网络分析, 发现 turquoise 和 green 基因模块的基因与雄性性状密切相关, coral1 和 black 基因模块的基因与雌性性状密切相关, *Pydmrt1* 在性别决定和性别分化中起非常重要的作用(Zhou *et al*, 2019), 目前, 我们正在开展 *Pydmrt1*、*SoxH*、*P450-1A1-like* 等基因功能验证分析。随着转录组、基因组和蛋白质组学分析技术的发展, 使得我们能以更开阔的视野探寻双壳贝类性别分化的分子机制, 将来有望对双壳贝类进行性别和生殖调控, 培育高产、抗逆、抗病新品种(系)贝类, 保护和增殖濒危或珍稀贝类资源。

参 考 文 献

- Cavelier P, Cau J, Morin N, *et al*. Early gametogenesis in the Pacific oyster: New insights using stem cell and mitotic markers. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(21): 3988–3996
- Chen M, Chang YQ, Zhang J, *et al*. A genetic linkage map of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) and microsatellite (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 2012,

- 11(46): 10517–10526
- Corporeau C, Groisillier A, Jeudy A, *et al.* A functional study of transforming growth factor-Beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(5): 971–980
- Dheilly NM, Lelong C, Huvet A, *et al.* Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: A microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36353
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, *et al.* *In vivo* RNA interference in oyster – *vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276(9): 2566–2573
- Franco A, Jouaux A, Mathieu M, *et al.* Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell and Tissue Research*, 2010, 340(1): 201–210
- Frías-Espericueta MG, Osuna-López JI, Páez-Osuna F. Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: Seasonal variation. *Science of the Total Environment*, 1999, 231(2–3): 115–123
- Guévelou E, Huvet A, Galindo-Sánchez CE, *et al.* Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(4): 100, 1–15
- Huvet A, Béguel JP, Cavaleiro NP, *et al.* Disruption of amylase genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(11): 1740–1747
- Huvet A, Fleury E, Corporeau C, *et al.* *In vivo* RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(4): 402–410
- In VV, Ntalamagka N, O'Connor W, *et al.* Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides*, 2016, 82: 109–119
- Lallias D, Lapègue S, Hecquet C, *et al.* AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Animal Genetics*, 2007, 38(4): 340–349
- Li L, Xiang JH, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture*, 2005, 245(1–4): 63–73
- Li L, Guo XM. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(1): 26–36
- Li RJ, Zhang LL, Li WR, *et al.* *FOXL2* and *DMRTIL* are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patinopekten yessoensis*. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 01166
- Li Y, Siddiqui G, Wikfors GH. *Crassostrea virginica* Gmelin using protein profiles of hemolymph by Proteinchip® and SELDI-TOF-MS technology. *Aquaculture*, 2010, 309: 258–264
- Li YP, Zhang LL, Sun Y, *et al.* Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopekten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(4): 453–465
- Li YQ, Siddiqui G, Wikfors GH. Determination of sex and gonadal development of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmlin through protein profiles of hemolymph by SELDI-TOF-MS technology. Abstracts, 103rd Annual Meeting, March 27–31, 2011, 524
- Liu B, Teng SS, Shao YQ, *et al.* A genetic linkage map of blood clam (*Tegillarca granosa*) based on simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Shellfish Research*, 2017, 36(1): 31–40
- Luo LZ, Zhang QH, Kong X, *et al.* Differential effects of zinc exposure on male and female oysters (*Crassostrea angulata*) as revealed by label-free quantitative proteomics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36(10): 2602–2613
- Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, *et al.* Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(4): 811–817
- Naimi A, Martinez AS, Specq ML, *et al.* Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2009, 152(2): 189–196
- Naimi A, Martinez AS, Specq ML, *et al.* Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(1): 134–142
- Ni JB, Zeng Z, Ke CH. Sex steroid levels and expression patterns of estrogen receptor gene in the oyster *Crassostrea angulata* during reproductive cycle. *Aquaculture*, 2013, 376–379: 105–116
- Otani A, Nakajima T, Okumura T, *et al.* Sex reversal and analyses of possible involvement of sex steroids in scallop gonadal development in newly established organ-culture systems. *Zoological Science*, 2017, 34(2): 86–92
- Pan ZN, Yu XY, Wang MF, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt2* gene from *Pteria penguin*. *Marine Sciences*, 2017, 41(10): 117–124 [潘珍妮, 余祥勇, 王梅芳, 等. 企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因的克隆及表达分析. *海洋科学*, 2017, 41(10): 117–124]
- Reis IMM, Mattos JJ, Garcez RC, *et al.* Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2AU1) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. *Aquatic*

- Toxicology, 2015, 169: 79–89
- Rodet F, Lelong C, Dubos MP, *et al.* Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1730(3): 187–195
- Rodet F, Lelong C, Dubos MP, *et al.* Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of gonadotropin-releasing hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene*, 2008, 414(1–2): 1–9
- Rodrigues-Silva C, Flores-Nunes F, Vernal JI, *et al.* Expression and immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isoform 356A1 (CYP356A1) in oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 2015, 159: 267–275
- Sano N, Kimata S, Obata M, *et al.* Distribution and migration of immature germ cells in the pearl oyster *Pinctada fucata* with the expression pattern of the vasa ortholog by in situ hybridization. *Journal of Shellfish Research*, 2015, 34(3): 803–809
- Santerre C, Sourdain P, Adeline B, *et al.* Cg-SoxE and Cg- β -catenin, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 167: 68–76
- Santerre C, Sourdain P, Martinez AS. Expression of a natural antisense transcript of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: First demonstration in the gonads of a lophotrochozoa species. *Sexual Development*, 2012, 6(4): 210–221
- Santerre C, Sourdain P, Marc N, *et al.* Oyster sex determination is influenced by temperature — First clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2013, 165(1): 61–69
- Song SS, Yu H, Li Q. Genome survey and characterization of reproduction-related genes in the Pacific oyster. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2017, 61(2): 97–109
- Teaniniuraitemoana V, Huvet A, Levy P, *et al.* Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Identification of potential sex differentiation and sex determining genes. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 491
- Teaniniuraitemoana V, Huvet A, Levy P, *et al.* Molecular signatures discriminating the male and the female sexual pathways in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122819
- Treen N, Itoh N, Miura H, *et al.* Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: A primitive endocrine system controlling reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(2): 167–172
- Wang LL, Song LS, Chang YQ, *et al.* A preliminary genetic map of Zhikong scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904). *Aquaculture Research*, 2005, 36(7): 643–653
- Wang Q, Shi Y, He MX. *Pf-Dmrt4*, a potential factor in sexual development in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(6): 2337–2350
- Wei PY, He PP, Zhang XZ, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the gonads of *Crassostrea hongkongensis* using high-throughput sequencing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 31: 100606
- Xu F, Kong LF, Zhang Y, *et al.* Complete genome sequencing and functional analysis of oyster. *Science and Technology Information*, 2016(6): 162–163 [许飞, 孔令锋, 张扬, 等. 牡蛎全基因组测序与功能解析. *科技资讯*, 2016(6): 162–163]
- Xu KH, Wang MF, Yu XY, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Sox9 gene from *Pteria penguin*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38(2): 15–22 [许开航, 王梅芳, 余祥勇, 等. 企鹅珍珠贝 Sox9 基因的克隆及表达分析. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(2): 15–22]
- Xu R, Li Q, Yu H, *et al.* Oocyte maturation and origin of the germline as revealed by the expression of nanos-like in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, 2018, 663: 41–50
- Yang D, Yin C, Chang YQ, *et al.* Transcriptome analysis of male and female mature gonads of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Genes and Genomics*, 2016, 38(11): 1041–1052
- Yu FF, Zhou L, Wang MF, *et al.* Cloning and sequence analysis of three DM domain in *Pinctada martensii*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(5): 905–906 [于非非, 周莉, 王梅芳, 等. 马氏珠母贝 (*Pinctada matensii*) 3 个 DM 结构域的克隆及序列分析. *农业生物技术学报*, 2007, 15(5): 905–906]
- Yu FF, Gui JF, Zhou L, *et al.* Cloning and expression characterization of Dmrt5 in *Pinctada martensii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 844–850 [于非非, 桂建芳, 周莉, 等. 马氏珠母贝 Dmrt5 基因的克隆及时序表达模式分析. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 844–850]
- Yu FF, Wang MF, Gui JF, *et al.* Molecular cloning and expression patterns of Sox11 gene in *Pinctada martensii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(1): 71–75 [于非非, 王梅芳, 桂建芳, 等. 马氏珠母贝 Sox11 基因的克隆及时序表达模式分析. *水生生物学报*, 2016, 40(1): 71–75]
- Yue CY, Li Q, Yu H. Gonad transcriptome analysis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* identifies potential genes regulating the sex determination and differentiation process. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(2): 206–219
- Zhang N, Xu F, Guo XM. Genomic analysis of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc. *G3(Bethesda)*, 2014, 4: 2207–2217
- Zhang X, Li Q, Kong LF, *et al.* DNA methylation frequency and epigenetic variability of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenesis. *Fisheries Science*, 2018,

84(5): 789–797

Zhong XX, Li Q, Kong LF, *et al.* Quantitative trait locus analysis of meat yield and shell shape traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 574–579 [仲晓晓, 李琪, 孔令锋, 等. 长牡蛎出肉率与壳形性状的 QTL 定位分析. *中国水产科学*, 2015, 22(3): 574–579]

Zhou LQ, Liu ZH, Dong YH, *et al.* Transcriptomics analysis

revealing candidate genes and networks for sex differentiation of yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 671

Zhou ZY, Li Q, Yu H, *et al.* Cloning and expression analysis of *Fem-1* gene of Pacific oyster (*Crassostea gigas*). *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(6): 45–54 [周祖阳, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎 *Fem-1* 基因 cDNA 克隆和表达分析. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(6): 45–54]

(编辑 冯小花)

Review: Molecular Mechanism of Sex Differentiation in Major Economic Bivalves

ZHOU Liqing^{1,2}, ZHAO Dan², WU Zhou³, WU Lei⁴, YANG Jinlong^{2①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000; 4. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005)

Abstract In this review, we have provided an overview of the current knowledge on the different molecular mechanisms of sex differentiation in major economic bivalves. The representative species of bivalves were introduced to understand the different mechanisms of sex differentiation or sex determination. The review provides a brief summary of the recent discoveries on sex differentiation in oysters, scallops, pearl oysters, and other common economically important bivalve species. The review highlights the various sex differentiation-associated molecular mechanisms by focusing on the involvement of nucleic acids, proteins, hormones, and so on. The current research trends on sex differentiation in bivalves have been discussed, which may help to advance our understanding of the sex differentiation and gonadal development of the Yesso scallop and other bivalves.

Key words Bivalves; Sex differentiation; Genes; Molecule; Nucleic acid; Hormone; Protein

① Corresponding author: YANG Jinlong, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委 员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔 杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄 平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李 健 LI Jian	李 军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李 琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖 放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈 勇(美国)CHEN Yong
林 洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦 松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐 跑 XU Pao
徐 皓 XU Hao	黄 捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主 编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副 主 编 Associate Editor-in-Chief 李 健 LI Jian 孔 杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常 青 CHANG Qing

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第41卷 第5期 2020年10月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.41 No.5 Oct. 2020

主管单位 中华人民共和国农业农村部

主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕

印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed

Subscription

Overseas Distributed

by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Jin Xianshi

by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

by China Post Group Corporation Shandong Branch

Post Offices All Over China

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

10>