

中国科技核心期刊 中文核心期刊

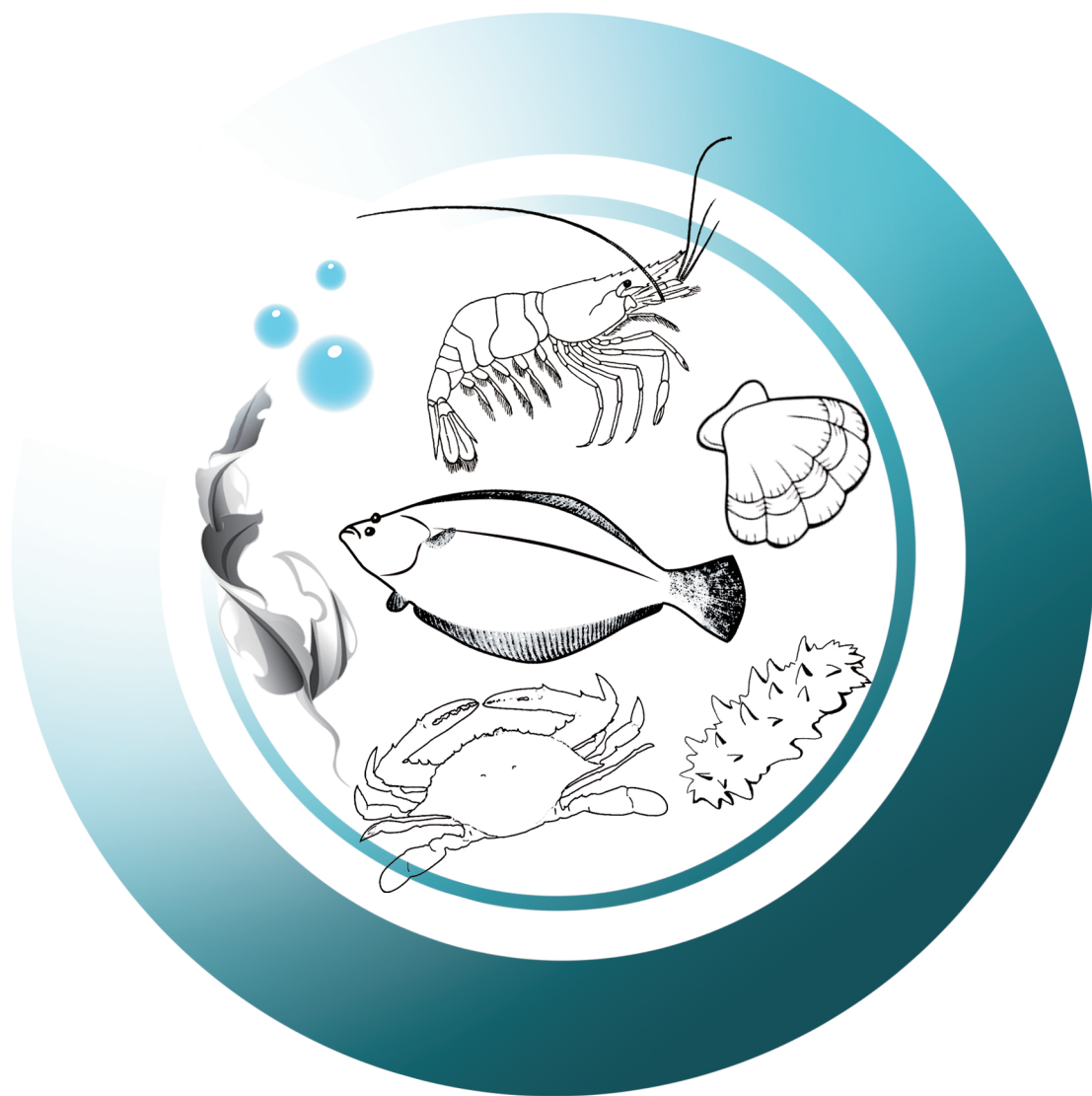
2021

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第42卷 VOL.42 第2期 NO.2



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 42 卷 第 2 期

2021 年 4 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊

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

目 次

研究论文

- 黄海中国对虾环境 DNA (eDNA)的垂直分布规律及其影响因素初探.....钱塘毅 王伟继 李 苗 单秀娟 金显仕 (1)
- 基于碳、氮稳定同位素研究黄海及东海北部主要鱼类的营养级和食性.....白怀宇 王玉堃 张廷廷 黄凌风 孙 耀 (10)
- 桑沟湾浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素.....侯 兴 高亚平 杜美荣 姜妮妮 李凤雪 董世鹏 李文豪 孟 珊 王军威 张义涛 蒋增杰 (18)
- 不同模拟情景下长江江豚种群生存力分析.....吴 斌 王伟萍 贺 刚 王海华 (28)
- 北部湾春季多齿蛇鲻生物学特征及其年际变化.....邓裕坚 易木荣 李 波 刘思杓 邱康文 沈春燕 何雄波 颜云榕 (36)
- 半滑舌鳎 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因的克隆及其温度响应的表达规律.....郝先才 冯 博 邵长伟 王 倩 (45)
- 投喂频率对绿鳍马面鲀幼鱼生长、生理指标及肝脏 *hsp70* 基因表达丰度的影响.....徐郑鑫 张鹏飞 陈四清 边 力 常 青 王志达 (55)
- 大菱鲂体重和体尺性状联合 GWAS 分析.....高 进 杨润清 (63)
- 黄条鲮生长性状全基因组关联分析.....崔爱君 徐永江 王 滨 姜 燕 柳学周 (71)
- 狼鲛的外部形态、消化系统和生殖系统的观察.....刘宇岩 李凤辉 张小忠 边 力 陈四清 曲江波 高文磊 刘长琳 葛建龙 (79)
- 响应面法优化斑马鱼中微塑料分离、提取的工艺.....吕世伟 周德庆 刘 楠 于 莹 宿小杰 (87)
- 红鳍东方鲀对 8 种饲料原料的表观消化率.....王建学 卫育良 徐后国 梁萌青 (96)
- 经验对欧洲舌齿鲈幼鱼行为及其关联性指标的影响.....胡 雨 刘 鹰 范继泽 周 诚 张志强 马 真 (104)
- 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析.....曹 梅 王兴强 秦传新 沈 晔 张子杨 钱诗悦 (112)
- 南极磷虾与鹰爪糙对虾酚氧化酶生化性质对比分析.....林瑞环 赵 玲 曹 荣 刘 淇 (124)
- 盐度骤降对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响.....霍恩泽 张雯雯 李加琦 丁敬坤 薛素燕 王英朴 于文涵 侯 兴 蒋增杰 方建光 毛玉泽 (132)
- 背角无齿蚌稚蚌的生长和发育研究.....郑浩然 陈修报 刘洪波 杨 健 (139)
- 枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析.....郑 姚 吴开年 王 利 魏 勇 (147)
- 海水鱼蛭阿鲁加姆锡兰蛭(*Zeylanicobdella arugamensis*)的在体感染与生活史观察.....任宁欣 史成银 万晓媛 谢国驷 王仁宝 王海波 (155)
- 池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝脏营养成分比较.....周 剑 赵仲孟 黄志鹏 赵 瀚 李 强 张 露 柯红雨 苏旭涛 肖 宇 杜 军 (162)
- 桑沟湾标准化与传统养殖模式海带的营养成分比较.....房景辉 何 为 毛玉泽 方建光 蒋增杰 高亚平 蔺 凡 杜美荣 梁 博 (170)
- 威海双岛湾海域海草分布及其生态特征.....李 政 李文涛 杨晓龙 张彦浩 张沛东 (176)
- 综述
- 海洋环境中有机胺的迁移转化研究进展.....胡清静 崔正国 孟 赫 白 莹 宋若晗 陆长坤 王宏胜 曲克明 (184)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.42 No.2 April 2021

A Preliminary Study on the Vertical Distribution of <i>Fenneropenaeus chinensis</i> Environmental DNA in the Yellow Sea and Its Influencing Factors	QIAN Tangyi, WANG Weiji, LI Miao, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi	(1)
Trophic Levels and Feeding Characters of Marine Fishes in the Yellow Sea and Northern East China Sea Based on Stable Isotope Analysis	BAI Huaiyu, WANG Yukun, ZHANG Tingting, HUANG Lingfeng, SUN Yao	(10)
Temporal and Spatial Variation in Phytoplankton Community Structure and Their Relationship with Environmental Factors in Sanggou Bay	HOU Xing, GAO Yaping, DU Meirong, JIANG Weiwei, LI Fengxue, DONG Shipeng, LI Wenhao, MENG Shan, WANG Junwei, ZHANG Yitao, JIANG Zengjie	(18)
Analysis of Population Viability Analysis of Yangtze Finless Porpoise in Different Simulated Scenarios	WU Bin, WANG Weiping, HE Gang, WANG Haihua	(28)
Biological Characteristics and Inter-Annual Changes of <i>Saurida tumbil</i> in Spring in the Beibu Gulf, South China Sea	DENG Yujian, YI Murong, LI Bo, LIU Sibiao, QIU Kangwen, SHEN Chunyan, HE Xiongbo, YAN Yunrong	(36)
Molecular Characterization and Expression Patterns of <i>hsd11b11</i> and <i>hsd11b2</i> and Their Response to High Temperature Stress in Chinese Tongue Sole <i>Cynoglossus semilaevis</i>	HAO Xiancai, FENG Bo, SHAO Changwei, WANG Qian	(45)
Effects of Feeding Frequency on the Growth, Physiology, and Expression Abundance of <i>hsp70</i> mRNA in Juvenile <i>Thamnaconus septentrionalis</i>	XU Zhengxin, ZHANG Pengfei, CHEN Siqing, BIAN Li, CHANG Qing, WANG Zhida	(55)
Joint Genome-Wide Association Study of Body Mass and Morphological Traits in Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	GAO Jin, YANG Runqing	(63)
Genome-Wide Association Analysis of Growth Traits in Yellowtail Kingfish (<i>Seriola lalandi</i>)	CUI Aijun, XU Yongjiang, WANG Bin, JIANG Yan, LIU Xuezhou	(71)
Morphological Characteristics, Digestive System and Reproductive System of the Wolf-Eel (<i>Anarrhichthys ocellatus</i>)	LIU Yuyan, LI Fenghui, ZHANG Xiaozhong, BIAN Li, CHEN Siqing, QU Jiangbo, GAO Wenlei, LIU Changlin, GE Jianlong	(79)
Process Optimization of Microplastics Extraction and Isolation in Zebrafish Using Response Surface Methodology	LÜ Shiwei, ZHOU Deqing, LIU Nan, YU Ying, SU Xiaojie	(87)
Apparent Digestibility Coefficients of Selected Feed Ingredients for Juvenile Tiger Puffer (<i>Takifugu rubripes</i>)	WANG Jianxue, WEI Yuliang, XU Houguo, LIANG Mengqing	(96)
Effect of Experience on Behavior and Parameter Correlation in Juvenile Seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	HU Yu, LIU Ying, FAN Jize, ZHOU Cheng, ZHANG Zhiqiang, MA Zhen	(104)
Transcriptome Analysis of <i>Palaemon carincauda</i> Subjected to Hypoxic Stress	CAO Mei, WANG Xingqiang, QIN Chuanxin, SHEN Ye, ZHANG Ziyang, QIAN Shiyue	(112)
Comparative Analysis of the Biochemical Properties of Phenoloxidase Isolated from <i>Euphausia superba</i> and <i>Trachypenaeus curvirostris</i>	LIN Ruihuan, ZHAO Ling, CAO Rong, LIU Qi	(124)
Effects of Acute Salinity Changes on Energy Budgets of Oysters <i>Crassostrea ariakensis</i> and <i>Crassostrea gigas</i>	HUO Enze, ZHANG Wenwen, LI Jiaqi, DING Jingkun, XUE Suyan, WANG Yingpu, YU Wenhan, HOU Xing, JIANG Zengjie, FANG Jianguang, MAO Yuze	(132)
Growth and Development of the Early Juvenile <i>Anodonta woodiana</i>	ZHENG Haoran, CHEN Xiubao, LIU Hongbo, YANG Jian	(139)
Transcriptome and sRNA Analyses of the Response of <i>Bacillus subtilis</i> to Ammonia Nitrogen	ZHENG Yao, WU Kainian, WANG Li, WEI Yong	(147)
<i>In vivo</i> Infestation and Life Cycle Observation of Marine Leech <i>Zeylanicobdella arugamensis</i>	REN Ningxin, SHI Chengyin, WAN Xiaoyuan, XIE Guosi, WANG Renbao, WANG Haibo	(155)
Comparison of Nutrient Components in Muscles and Hepatopancreas of Pond- and Paddy Field-Cultured <i>Procambarus clarkii</i>	ZHOU Jian, ZHAO Zhongmeng, HUANG Zhipeng, ZHAO Han, LI Qiang, ZHANG Lu, KE Hongyu, SU Xutao, XIAO Yu, DU Jun	(162)
A Comparison of Nutrients in Kelp Cultured in Standardized and Traditional Long-Line Modes in Sanggou Bay	FANG Jinghui, HE Wei, MAO Yuze, FANG Jianguang, JIANG Zengjie, GAO Yaping, LIN Fan, DU Meirong, LIANG Bo	(170)
Distribution and Ecological Characteristics of Seagrass in Shuangdao Bay, Weihai	LI Zheng, LI Wentao, YANG Xiaolong, ZHANG Yanhao, ZHANG Peidong	(176)
Advancements in the Transport and Transformation of Amines in the Marine Environment	HU Qingjing, CUI Zhengguo, MENG He, BAI Ying, SONG Ruohan, LU Changkun, WANG Hongsheng, QU Keming	(184)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200525002

http://www.yykxjz.cn/

钱塘毅, 王伟继, 李苗, 单秀娟, 金显仕. 黄海中国对虾环境 DNA(eDNA)的垂直分布规律及其影响因素初探. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 01-09

Qian TY, Wang WJ, Li M, Shan XJ, Jin XS. A preliminary study on the vertical distribution of *Fenneropenaeus chinensis* environmental DNA in the Yellow Sea and its influencing factors. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 01-09

黄海中国对虾环境 DNA (eDNA)的 垂直分布规律及其影响因素初探*



钱塘毅^{1,2} 王伟继^{2,3} 李苗² 单秀娟^{2,3①} 金显仕^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116036; 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 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 准确掌握物种分布和种群动态是渔业资源评估的基础。然而,对某些种群规模小或生活史复杂的物种进行监测的难度很大。近年来,环境 DNA 技术快速兴起,已被广泛应用于各类物种监测、生物多样性评估和生物量评价等领域。为了解冬季中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)越冬洄游过程中的分布情况,2019 年 12 月在黄海中南部采集表、中、底 3 个水层水样,检测其中中国对虾的 eDNA,并对表层沉积物进行室内实验。结果显示,中国对虾 eDNA 在自然水体中呈现特殊的垂直分布规律:底层浓度高,表层浓度低,这一规律与中国对虾生活习性相关;表层沉积物会在外力作用下再悬浮,并向周围释放 eDNA,对水体造成较大程度影响,本研究将采集到的表层沉积物分为 3 个实验组,3 个实验组最大释放量分别为 1624.06、3453.34 和 1143.24 copies/L,沉积物对水体的影响持续 1 周左右。

关键词 环境 DNA; 中国对虾; 分布规律; 表层沉积物; 生物量评估

中图分类号 S932.5+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0001-09

准确地掌握目标物种的分布信息是生物多样性研究的必要前提之一,且对生物地理学、保护生物学和生态学等学科领域的研究也具有重要意义(Lodge *et al*, 2012, Ficetola *et al*, 2008)。与陆地环境不同,受到水深、温度、光照、压力等诸多因素限制,对水生生物进行直接观察和识别难度很大(Bogich *et al*,

2008),特别是某些低密度或具有独特生活史的种群(Dejean *et al*, 2011)。目前,传统调查方法,例如拖网、影像和声学调查等,通常成本高昂且会对珍稀物种造成巨大威胁(Murphy *et al*, 2010)。随着分子生物学研究的不断发展,环境 DNA (environmental DNA, eDNA)技术的出现使得“非侵入”式资源调查和物种跟踪成

* 国家自然科学基金项目(31872692)、国家重点研发计划(2017YFE0104400)、山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0501-1)、山东省泰山学者专项基金项目和 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019GH16)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872692), National Key Research and Development Program (2017YFE0104400), Pilot National Laboratory of Marine Science and Technology (Qingdao), Shandong Province (2018SDKJ0501-1), Taishan Scholars Project of Shandong Province, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019GH16)]. 钱塘毅, E-mail: 389168510@qq.com

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

收稿日期: 2020-05-25, 收修改稿日期: 2020-06-09

为可能(Taberlet *et al.*, 2012)。该技术是通过采集并检测生物体向水环境中释放的 DNA 片段来判断生物是否存在于该水域, 并进行生物量评估的一种新兴技术(Ficetola *et al.*, 2008; Takahara *et al.*, 2012)。eDNA 的来源广泛, 可以是生物的表面、黏液、粪便、尿液和生殖细胞等(Turner *et al.*, 2015; Klymus *et al.*, 2015; Wilcox *et al.*, 2015), 并且只需通过少量水样的采集分析即可满足调查目的(Thomsen *et al.*, 2012a、b), 从而降低采样成本, 减少采样工作对环境和生物体的干扰和破坏。eDNA 技术很大程度上弥补了传统调查方法的不足, 在物种保护和生物量评估等方面发挥重要作用。

已有学者对 eDNA 在河流中的扩散或降解进行研究(Deiner *et al.*, 2014; Jane *et al.*, 2015; Sansom *et al.*, 2017), 发现水体中的 eDNA 在自然条件下易降解, 且会在环境中扩散, 以短片段的形式移动到远离释放源的位置。此外, 仅依靠分析 eDNA 本身无法就其源头及释放时间进一步溯源。然而, 对于在面积、水流及深度相比河流都更为复杂的海洋环境中, eDNA 的分布规律及变化研究仍旧十分有限(Yamamoto *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2017)。了解 eDNA 在水体中扩散和滞留的规律对于采样设计和空间推断(即样本所代表的可能出现的目标生物的位置)具有重要意义(Shogren *et al.*, 2017)。对水体中 eDNA 变化规律的阐释是利用其进行目标物种追踪及生物量评估的前提。一般而言, 利用 eDNA 技术对目标物种进行追踪是为获取其准确的分布位置和种群信息。而 eDNA 在水体中的分布受多种因素影响, 包括物种分布、水流、沉降和沉积物再悬浮等(Deiner *et al.*, 2014; Robison *et al.*, 1981; Saba *et al.*, 2012; Wotton *et al.*, 2001; Maggi, 2013)。这些除物种分布以外的其他因素的影响所导致 eDNA 的杂乱分布是研究者不想看到的。如何避免这些因素影响, 从而通过 eDNA 获取有效的目标物种信息是研究者一直以来想要解决的问题。而目前已有研究对 eDNA 的水平分布讨论较多(Thalinger *et al.*, 2019), 很少涉及垂直分布的特点, 或只涉及了单一介质(Turner *et al.*, 2015)。本研究选用中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)作为目标物种, 选择平均水深较大的黄海作为研究水域, 以 eDNA 垂直分布作为主要考察要素。鉴于沉积物也会对水体中 eDNA 浓度造成一定程度的影响(Turner *et al.*, 2015; 魏楠等, 2020)。将水体与沉积物的相互效应也考虑在内, 希望能更加科学合理地解释 eDNA 的分布特点。本研究分为两部分内容: (1) 在黄海中西部海域 8 个站位的不同水深(表、中、底)采水, 研究水体中中国对虾

eDNA 的分布规律; (2) 采集表层沉积物并进行室内实验, 分析沉积物对水体的影响方式。通过本研究希望能够了解中国对虾 eDNA 在水中的分布规律和影响因素, 更合理地设计采样工作以及更有效地将 eDNA 技术推广到其他物种的研究中。

1 材料与方 法

1.1 采样站 位

样品来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所蓝海 101 号科研调查船于 2019 年 12 月 21 日在黄海的调查。根据邓景耀等(1990)对中国对虾的研究方法, 在中国对虾越冬洄游路线上, 选取 8 个站位, 利用分层采水方法在各站位分别采集表、中、底 3 个层次水样。其中, 表层水在距海面 3 m 深的位置取水, 中层水在 20 m 左右水深采水, 底层水在该站位水深于海底以上 5 m 左右位置取水(具体采样深度根据海况及作业难度有所变动), 具体采样位置见图 1, 采样水深信息见表 1。

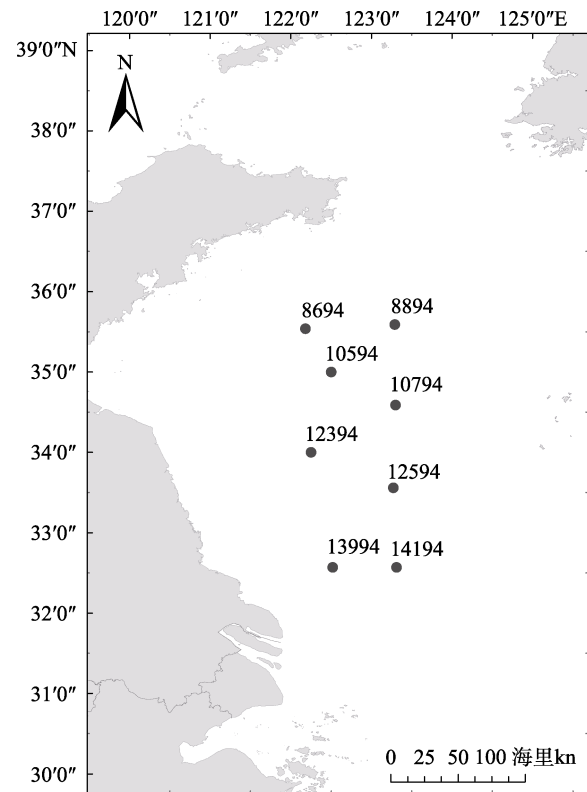


图 1 2019 年 12 月黄海采样站 位

Fig.1 Sampling stations in the Yellow Sea in Dec. 2019

1.2 目的基因及特异性引物

选择中国对虾的线粒体细胞色素 C 氧化亚基 I

基因(mtDNA CO I)进行研究。引物参照李苗等(2019),其中,COI PF与COI PR作为普通PCR引物用来制备质粒标准品DNA。COI DF与COI DR作为定量PCR引物,扩增的目的片段为普通PCR引物所扩增片段的一部分。引物与探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 各站位采样水深
Tab.1 Station location and sampling depth

站位号 Station	经度 Longitude (°)	纬度 Latitude (°)	水深 Depth (m)	表层 水深 Surface (m)	中层 水深 Mid (m)	底层 水深 Bottom (m)
8694	112.18	35.54	56	3	20	48
8894	123.29	35.59	76	3	23	69
10594	122.50	35.00	68	3	20	60
10794	123.30	34.59	79	3	20	70
12394	122.25	34.00	51	3	21	33
12594	123.27	33.56	71	3	21	63
13994	122.52	32.57	35	3	20	28
14194	123.31	32.57	39	3	14	33

表 2 本研究用到的引物与探针
Tab.2 Primers and probes used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size (bp)
COI PF	TTGTAGTTACAGCCCACGCT	56.4	597
COI PR	AAATTATCCCGAAGGCGGGT	56.7	
COI DF	AGGGGTAGGAACAGGATGAAC	57.7	106
COI DR	GACACCAGCTAGATGCAGCG	59.1	
Probe	5'FAM-TCAGCTAGAATTGCTCATGCCGAGCTTCAGT-3'BHQ1	66.2	106

离心管中的混合液转移到 DNeasy 离心柱中, 25℃ 8000 g 离心 1 min;

(3)向离心柱内加入 500 μl Buffer AW1, 25℃ 8000 g 离心 1 min, 再向离心柱内加入 500 μl Buffer AW2, 25℃ 8000 g 离心 3 min;

(4)将离心柱放入 1.5 ml 的无菌离心管中, 在离心柱中央加入 100 μl Buffer TE, 25℃ 孵育 1 min。25℃ 8000 g 离心 1 min;

eDNA 提取完成后, 立即使用超微量紫外分光光度计检测其浓度及质量, 若 eDNA 样品的浓度高于 250 ng/μl (实时荧光定量 PCR 试剂盒要求待测样品的 DNA 浓度低于 250 ng/μl), 则将其进行稀释。在每个 eDNA 样品内吸取 10 μl DNA 溶液, 用作琼脂糖凝胶电泳检测及 PCR 定量分析, 其余 90 μl eDNA 溶液

1.3 中国对虾 eDNA 富集

使用滤膜法对海水中 eDNA 进行富集。选取直径为 47 mm、孔径为 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜对 1 L 所采水样过滤(李苗等, 2019), 每个水样取 3 个平行样本及 3 个阴性对照, 共计 75 个样本。为避免样品相互污染, 过滤完后每张滤膜用锡纸单独包裹再放入封口袋中并做好标记, -20℃ 保存直到进行 DNA 提取。

1.4 eDNA 提取

使用试剂盒进行 eDNA 提取, 具体提取方法参照 Renshaw 等(2015)并加以改进, 其具体提取步骤为:

(1)将滤膜从冰箱取出后, 用剪刀去除滤膜边缘多余部分, 再剪成条状, 置于 2 ml 无菌离心管中; 向离心管内加入 570 μl 的 Buffer ATL 和 60 μl 的蛋白酶 K 溶液(20 mg/ml), 涡旋震荡, 将混合液混合均匀, 在恒温水浴锅内 65℃ 水浴 3 h, 水浴期间, 每隔 15 min 轻轻颠倒混匀离心管, 使其充分裂解, 裂解完成后取出并挤干剩余滤膜;

(2)向离心管内加入 630 μl 的 Buffer AL 和 630 μl 的无水乙醇, 涡旋震荡 15 s, 使其混合均匀; 将 2 ml

-80℃ 保存备用。

1.5 中国对虾 eDNA 定量分析

所有提取的 eDNA 样品采用 BBI 生命科学有限公司的 2×TaqMan Fast qPCR Master Mix (Low Rox) 实时荧光定量 PCR 试剂盒进行定量分析。定量 PCR (Quantitative PCR, qPCR) 扩增的反应体系按照试剂盒说明书要求采用 20 μl 体系(表 3)。qPCR 扩增反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 5 s, 60℃ 35 s, 40 个循环。qPCR 扩增仪器为 ABI 7500 型定量 PCR 仪, 质粒标准品 DNA 与未知浓度 eDNA 样品在每个 96 孔板均设计 3 个 qPCR 重复, 每个 96 孔板设置 3 个阴性对照(无模板)与 3 个阳性对照(中国对虾基因组 DNA), 质粒标准品 DNA 依次从 10⁷ copies/μl 以 10 倍的浓度

梯度稀释到 10 copies/ μl 。实验获得的所有数据采用绝对定量法分析,每个 eDNA 样品最终的拷贝数以阳性扩增样品的平均值为准,应用系统软件 SDS 1.4.0.25 自动计算 C_t 值,并生成标准曲线与扩增曲线。

表 3 实时荧光定量 PCR 反应体系及用量
Tab.3 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction system and dosage

反应体系 Reaction system	用量 Dosage (μl)
2 \times PCR 反应预混液 2 \times PCR Master Mix	10.0
COI DF (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
COI DR (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
探针 Probe (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
模板 DNA Template DNA	2.0
双蒸水 ddH ₂ O	6.8

1.6 表层沉积物释放实验设置

选择黄海中南部的 3 个站位(8694、10594 和 13994)采集表层沉积物(采样站位根据该海域底质类型进行选择)。表层沉积物的采集工作在同一航次中完成,采样时,将采泥器垂直下放到海底抓取沉积物,待采泥器闭合后提出海面移至夹板,排出采泥器中残留海水以避免沉积物悬浮进入水体。采样前后,采泥设备用双蒸水冲洗 2 遍以避免样品交叉污染。样品放入无菌封口袋,于 -20°C 冷库中保存,运输过程用冰块保持温度在 -10°C 左右,避免样品反复冻融。2020 年 1 月 3 日样品送达实验室后立即进行实验。3 个站位的表层沉积物分为 3 个实验组。每个实验组为 1 个 15 L 的塑料整理箱(长 \times 宽 \times 高: 35 cm \times 24 cm \times 20 cm),内装 1000 g 沉积物样品和 10 L 人工海水。实验过程中,所用人工海水经实验室 qPCR 检测,无中国对虾 eDNA 存在。实验启动时,分别混匀 3 个实验组,待沉积物重新沉淀后,采集 1 L 上层水样(3 个平行样品)进行中国对虾 eDNA 富集,滤膜用锡纸单独包装, -20°C 保存待用。取样后向整理箱中重新加入 3 L 人工海水以保证下次取样浓度一致。每日 15:00 取样,连续进行 1 周。所有实验组均在室内进行,室温保持在 10°C ,水温保持在 6°C 并通过空气泵持续曝气。所有实验设备均在实验前用高锰酸钾消毒,并用双蒸水冲洗。实验结束后,对所有样品统一进行 eDNA 的提取和 qPCR 检测。室内实验中国对虾 eDNA 的富集、提取及 qPCR 分析方法同上(1.3、1.4 和 1.5)。

表 4 实验条件设置
Tab.4 Setting of experimental condition

实验组 Experimental group	表层沉积物 Surface sediment (g)	人工海水 Artificial seawater (L)	平行样本数量 Parallel samples
8694	1000.00	10.00	3
10594	1000.00	10.00	3
13994	1000.00	10.00	3
空白 Blank	0	10.00	3

1.7 数据分析

所有数据经标准化处理后使用 Excel 2016、R 3.6.3 及其集成开发环境 R Studio 软件处理。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

2%的琼脂糖凝胶电泳检测表明,引物 COI DF/DR 成功扩增了中国对虾 mtDNA CO I 长度为 106 bp 的目的片段,电泳条带单一明亮、无杂带(图 2),与预期结果一致,说明所选引物特异性良好。

2.2 中国对虾 CO I 基因 qPCR 扩增的标准曲线

从图 3 可以看出,本实验稀释的质粒标准品 DNA 浓度在 $10\sim 10^7$ copies/ μl 范围内具有良好的线性关系,说明本研究建立的标准曲线能够准确地反应中国对虾 mtDNA CO I 基因的扩增。

2.3 中国对虾 eDNA 分布规律

检测结果显示,在黄海 8 个站位的表、中、底水样中,底层 eDNA 拷贝数与表层和中层具有显著差异($P=0.003$, $P=0.0009$)。除个别站位外,底层水体 eDNA 拷贝数均大于表、中层水体(表 5)。8894、12394 和 14194 站位表层 eDNA 浓度大于中层,其中,14194 站位表层 eDNA 浓度最高,呈现了中国对虾 eDNA 分布规律为表层少、底层多(图 4)。

2.4 表层沉积物释放实验

室内沉积物释放实验结果显示,表层沉积物在外力作用下会向水体中释放大量中国对虾 eDNA,其中,8694 与 10594 站位在实验第 1 天释放量最高,分别为 1624.06 和 3453.34 copies/L,而 13994 站位在第 2 天释放量达到最高,为 1143.24 copies/L。3 个实验组沉积物释放的 eDNA 拷贝数与时间呈负相关关系。均在第 7 天(2020 年 1 月 9 日)趋于稳定且保持在较低水平(表 6 和图 5)。

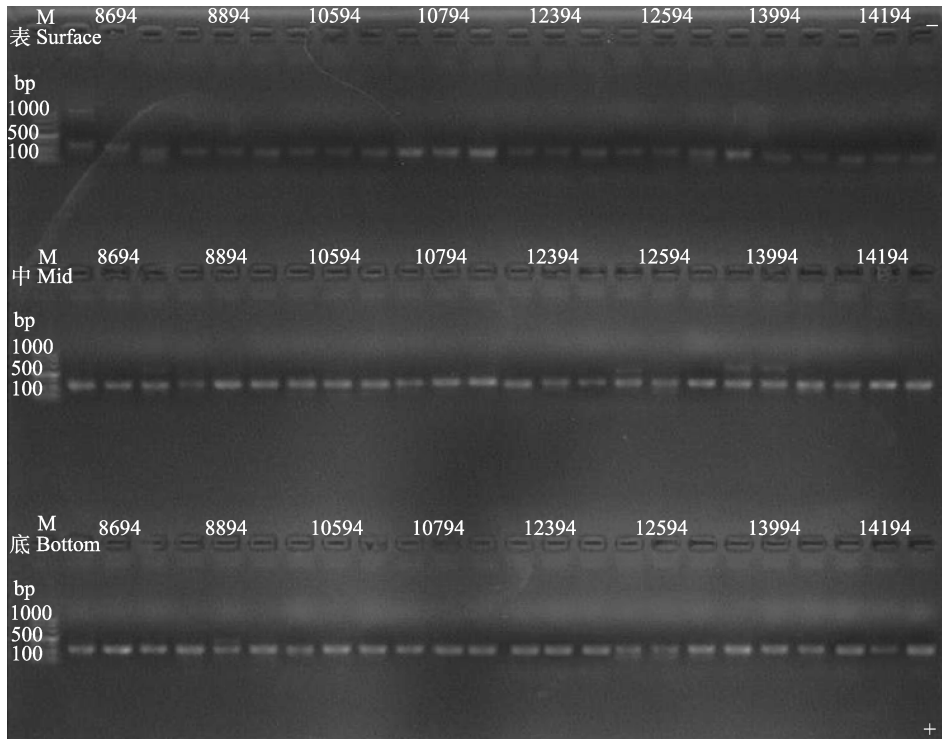


图 2 qPCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.2 Detection of qPCR production by agarose gel electrophoresis

M: DNA Marker DL 2000; -: 负极; +: 正极; 连续 3 列泳道为同一采样站位

M: DNA Marker DL 2000; -: Negative electrode; +: Positive electrode;
Three rows of lanes are for the same sampling station

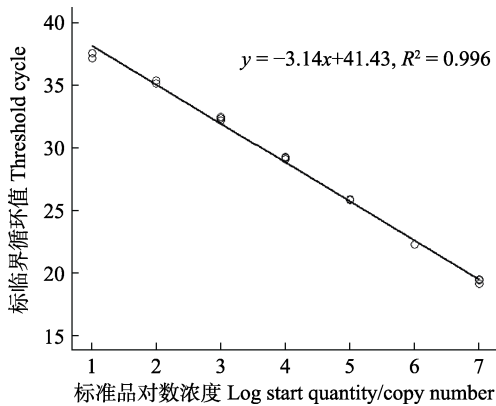


图 3 中国对虾 mtDNA CO I 基因 qPCR 标准曲线

Fig.3 The standard curve of qPCR of *F. chinensis* mtDNA CO I gene

表 5 黄海 8 个站位不同水深中国对虾 eDNA 浓度
Tab.5 Concentrations of *F. chinensis* eDNA in different water depths at eight stations in Yellow Sea (copies/L)

站位号 Station No.	表层 Surface	中层 Mid	底层 Bottom
8694	1898.74	2882.14	3465.42
8894	1818.40	1401.69	2212.25
10594	1616.72	2163.28	2551.10
10794	3582.64	7267.49	9338.28
12394	1789.86	1160.17	3054.33
12594	2689.88	3476.83	3425.31
13994	1415.96	1817.87	2596.97
14194	1735.86	1130.94	1118.00

3 讨论

3.1 生物习性对其 eDNA 分布的影响

本研究发现, 中国对虾在垂直方向上具有显著的分
布规律。结合目标物种在不同发育阶段的生活习性和
实际环境条件, 对 eDNA 浓度进行分析推测, 能够
分析得到更为准确的物种分布位置和生物量情况。以

往研究表明, 中国对虾在越冬场主要以底栖的甲壳类、瓣鳃类、多毛类、蛇尾类(*Ophiuroidea*)及小型鱼类为食, 还会摄食寄居蟹皮海绵(*Suberites domumuela*) (邓景耀等, 1990)。根据中国对虾这一摄食习性, 可以推测中国对虾在黄海越冬洄游过程中应该集中分布于底层水体。而检测结果与这一推测相符: 越冬期中国对虾 eDNA 底层浓度相对较大。同时, 粪便和外壳作为越冬期中国对虾的主要 eDNA 来源, 由于涌浪

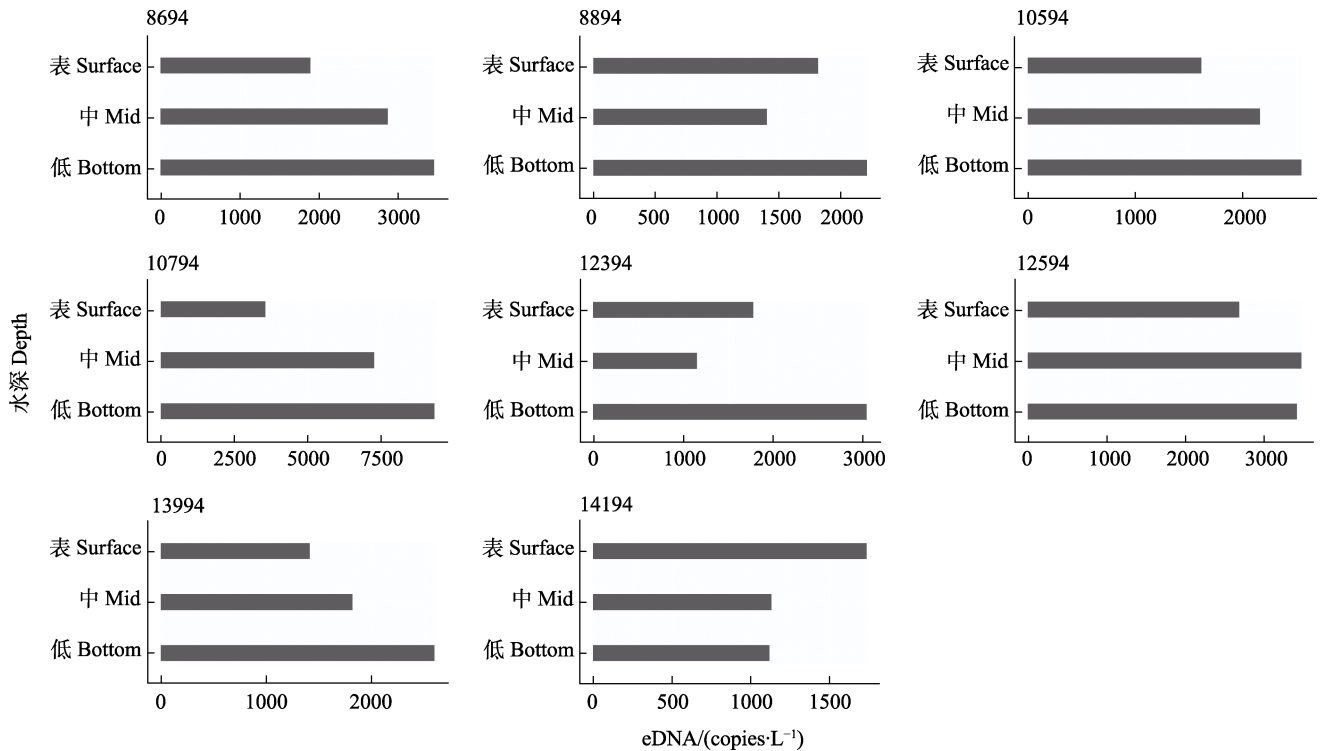


图4 黄海8个站位不同水深中国对虾 eDNA 浓度

Fig.4 Concentrations of *F. chinensis* eDNA in different water depths at eight stations in Yellow Sea

表6 表层沉积物释放中国对虾 eDNA 浓度

Tab.6 Variations of environmental DNA concentration of *F. chinensis* released from the surface substrate (copies/L)

站位号 Station	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
8694	1624.06	1000.07	281.30	342.61	329.11	153.95	247.09
10594	3453.34	2812.50	1283.75	1039.92	544.87	640.89	270.17
13994	494.87	1143.24	1020.98	687.93	616.26	264.56	188.96

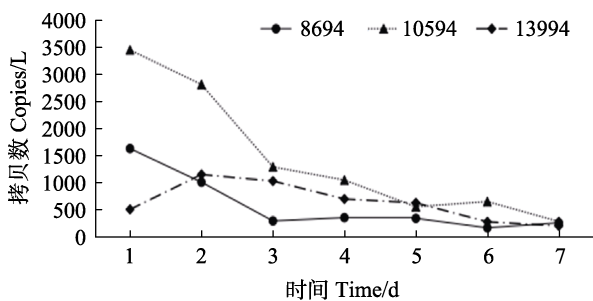


图5 室内实验中国对虾 eDNA 的浓度变化

Fig.5 Variation of eDNA concentration of *F. chinensis* in laboratory experiments

和沉降作用,这些物质会变成细小碎屑沉至底层水体 (Turner *et al.*, 2015), 也会导致底层水体中国对虾 eDNA 浓度升高。此外,不同物种或同一物种在不同发育阶段,其 eDNA 的释放速率也存在一定差异 (Minamoto *et al.*, 2017; Maruyama *et al.*, 2014)。将种群构成因素纳入到考量范围,也是提高 eDNA 技术准确

性的有效途径。

3.2 水体浑浊度对 eDNA 分布的影响

结果显示,中国对虾的 eDNA 在自然水体中总体呈现底层浓度高、表层浓度低的特点,但 8894、12394 和 14194 的检测结果与其他站位存在差异。在采样过程中发现,这 3 站的水体较为浑浊,泥沙量大,可能是导致 eDNA 浓度反常变化的原因之一,怀疑该海域存在垂直流,导致底部泥沙悬浮,从而对 eDNA 浓度存在一定程度影响。具体影响方式需要开展更多实验来验证。

3.3 沉积物对 eDNA 分布的影响

本研究发现,eDNA 会在水体与沉积物之间双向移动,粪便和外壳作为中国对虾越冬期的主要 eDNA 来源,不仅会在沉降作用下进入沉积物,并且沉积物会在外力(如垂直流、底栖生物扰动和人为干扰等)作

用下, 导致沉积物再悬浮(Turner *et al.*, 2015), 向周围释放 eDNA, 使得底层水体 eDNA 浓度升高, 从而使测量值高于真实值。研究表明, eDNA 会在水体与沉积物之间转移, 因此, 将沉积物与水体结合进行分析更有意义(Leff *et al.*, 1992)。相比水体, 沉积物中含有更多的 eDNA(Corinaldesi *et al.*, 2005; Dell'Anno *et al.*, 2004)。其原因是: (1) 生物的粪便、外壳和脱落的组织会在沉降作用下进入沉积物中, 使沉积物中 eDNA 浓度升高(Turner *et al.*, 2015); (2) eDNA 可被沉积物中的表面活性颗粒吸附, 受保护而不被降解, 并且这些颗粒还会吸附核酸酶, 导致酶活性降低, 从而延长 eDNA 降解时间(Pietramellara *et al.*, 2009), 使沉积物中 eDNA 不断积累, 浓度上升。以上两点说明了沉积物在 eDNA 研究中的重要性。但大多数研究只是单独对沉积物中的 eDNA 进行研究, 鲜有研究者将沉积物与周围环境结合看待(魏楠等, 2020), 因而沉积物对周围环境的影响极易被忽视。本研究揭示了沉积物通过再悬浮释放 eDNA 的方式对周围水体造成巨大影响, 如何屏蔽这一影响, 减少测量误差, 是接下来研究的重点。

3.4 再悬浮 eDNA 残留时间的区别

室内实验发现, 表层沉积物中的中国对虾 eDNA 溶解进入水体 7 d 后近乎完全降解。而这与李苗等(2018)对中国对虾 eDNA 水中残留时间的研究结果存在差异, 其研究发现, 新鲜的 eDNA 可以在水体中残留 27 d。同时还发现, eDNA 降解时间受 eDNA 浓度影响。eDNA 浓度较高, 其降解时间较长(李苗等, 2020)。考虑到本研究的样本是在野外采集到的, 其浓度远比养殖场中的样品浓度小。因此, 本研究中沉积物释放的 eDNA 残留时间相对较短。另外, 新鲜的 eDNA 被生物体释放进入水体时发生降解, 致使片段长度缩短, 并在沉降作用下保留在沉积物中, 沉积物又在外力作用下再悬浮, 导致所释放短片段 eDNA 环境改变, 加速了降解过程, 因此, 沉积物释放的 eDNA 仅能残留较短时间。已有研究表明, 不同片段长度的 eDNA 在残留时间上具有显著差异(Dejean *et al.*, 2011)。在以后的研究中, 可以根据 eDNA 片段长度的不同, 对 eDNA 进行区分, 选择合适的引物长度进行 qPCR 检测, 以此降低沉积物释放的干扰。

在了解目标生物的生活习性的前提下, 研究人员进行有针对性的采样设计, 可以使检测结果更加可信。但需要对再悬浮的 eDNA 进行有效区分, 以避免测量结果的误差, 从而将 eDNA 技术更好地推广到其他水生物种的生态系统研究中。

参 考 文 献

- Bogich TL, Liebhold AM, Shea K. To sample or eradicate? A cost minimization model for monitoring and managing an invasive species. *Journal of Applied Ecology*, 2008, 45: 1134–1142
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71: 46–50
- Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 2014, 9: e88786
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398
- Dell'Anno A, Corinaldesi C. Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: Ecological and methodological considerations. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4384–4386
- Deng JY, Ye CC, Liu YC. Shrimp and its resource management in Bo Sea and Yellow Sea. Beijing: China Ocean Press, 1990 [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990]
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Journal of Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, *et al.* Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Journal of Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 216–227
- Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, *et al.* Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Journal of Biological Conservation*, 2015, 183: 77–84
- Leff L, McArthur J, Shmickets L. Information spiraling: Movement of bacteria and their genes in streams. *Journal of Microbial Ecology*, 1992, 24: 11–24
- Li M, Shan XJ, Wang WJ, *et al.* Establishment and optimization of environmental DNA detection techniques for assessment of *Fenneropenaeus chinensis* biomass. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 12–19 [李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 12–19]
- Li M, Shan XJ, Wang WJ, *et al.* Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 51–57 [李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 51–57]
- Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance

- from environmental DNA. *Journal of Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555–2558
- Maggi F. The settling velocity of mineral, biomineral, and biological particles and aggregates in water. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2013, 118(4): 2118–2132
- Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, *et al.* The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114639
- Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara KR, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173073
- Murphy HM, Jenkins GP. Observational methods used in marine spatial monitoring of fishes and associated habitats: A review. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 2010, 61: 236–252
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, *et al.* Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *Journal of Peer*, 2017, 5: e3044
- Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, *et al.* Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Journal of Biology and Fertility Soils*, 2009, 45(3): 219–235
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Journal of Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168–176
- Robison BH, Bailey TG. Sinking rates and dissolution of midwater fish fecal matter. *Journal of Marine Biology*, 1981, 65(2): 135–142
- Saba GK, Steinberg DK. Abundance, composition, and sinking rates of fish fecal pellets in the Santa Barbara Channel. *Journal of Scientific Reports*, 2012, 2: 716
- Sansom BJ, Sassoubre LM. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2017, 51: 14244–14253
- Shogren AJ, Jennifer I, Andruszkiewicz TE, *et al.* Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Journal of Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5065
- Taberlet P, Prud'Homme, SM, Campione E, *et al.* Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Journal of Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1816–1820
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868
- Thalinger B, Wolf E, Traugott M, *et al.* Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA. *Journal of Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1033–1047
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012a, 7: e41732
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Journal of Molecular Ecology*, 2012b, 21(11): 2565–2573
- Turner CR, Uy KL, Everhart RC. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Journal of Biology Conservation*, 2015, 183: 93–102
- Wei N, Wang XH, Zhang CP. Application of environmental DNA on monitoring surface sediment and the relationship to environment variables. *Journal of Environmental Engineering*, 2020, 14(8): 2262–2269 [魏楠, 王夏晖, 张春鹏. 环境DNA在监测表层沉积物中的运用及其与环境变量的关系. *环境工程学报*, 2020, 14(8): 2262–2269]
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, *et al.* Environmental DNA particle size distribution from brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(3): 639–641
- Wotton RS, Malmqvist B. Feces in aquatic ecosystems. *Journal of Bioscience*, 2001, 51: 537–544
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Journal of Scientific Reports*, 2017, 7: 40368
- Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, *et al.* Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149786

A Preliminary Study on the Vertical Distribution of *Fenneropenaeus chinensis* Environmental DNA in the Yellow Sea and Its Influencing Factors

QIAN Tangyi^{1,2}, WANG Weiji^{2,3}, LI Miao², SHAN Xiujuan^{2,3}^①, JIN Xianshi^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116036; 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, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Qingdao 266071;

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

Abstract Accurate knowledge of species distributions and population dynamics is the basis for fishery resource assessments. However, it is difficult to monitor certain species with small populations or complex life histories. Recently, as a new monitoring technology, environmental DNA (eDNA) has been widely used in species monitoring, biodiversity assessments, and biomass assessments. In this study, eDNA technology was employed to understand the distribution of Chinese shrimp during its winter migration. In December 2019, we collected water samples from three water layers in the south-central Yellow Sea to test the eDNA of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. In addition, laboratory experiments were carried out on the surficial sediments of the seabed. First, it was found that the eDNA of Chinese shrimp exhibited a specific vertical distribution in the natural water, which was characterized by a high concentration in the bottom layer and low concentration in the surface layer. This distribution is related to the life habits of Chinese shrimp. Second, the surficial sediments would re-suspend and release eDNA to the surrounding areas under the action of external forces, causing a large impact on the water. In this study, the surficial sediments were divided into three experimental groups. The maximum amounts of eDNA released by the three experimental groups were 1624.06, 3453.34, and 1143.24 copies/L, the effects of which lasted for approximately a week. It is hoped that this study will assist with the eDNA sampling design in the future.

Key words Environmental DNA; Chinese shrimp; Distribution; Surficial sediment; Biomass assessment

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191025001

http://www.yykxjz.cn/

白怀宇, 王玉堃, 张廷廷, 黄凌风, 孙耀. 基于碳、氮稳定同位素研究黄海及东海北部主要鱼类的营养级和食性. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 10-17

Bai HY, Wang YK, Zhang TT, Huang LF, Sun Y. Trophic levels and feeding characters of marine fishes in the Yellow Sea and northern East China Sea based on stable isotope analysis. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 10-17

基于碳、氮稳定同位素研究黄海及东海北部 主要鱼类的营养级和食性*

白怀宇¹ 王玉堃² 张廷廷² 黄凌风^{1,3①} 孙耀^{2,4①}

- (1. 厦门大学环境与生态学院 厦门 361102; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 滨海湿地生态系统教育部重点实验室 厦门 361102;
4. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究通过对 2011~2014 年间在黄海及东海北部采集的 36 种海洋鱼类进行碳、氮稳定同位素测定, 利用碳稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)计算底层饵料贡献比(Bp)来确定鱼类的食性, 利用氮稳定同位素比值($\delta^{15}\text{N}$)计算其营养级(TL)。结果显示, 这 36 种鱼类的营养级范围为 2.75~4.34, 平均值为 3.47。其中, 4 种为完全浮游生物食性, 8 种为底栖生物食性, 完全底栖生物食性为 12 种, 混合食性为 12 种。中(TL=3.5~4)、低(TL<3.5)营养级的种类占大多数(91.67%), 而高营养级(TL>4)种类较少, 仅为 3 种, 且全部为混合食性。营养级的研究结果与 1986、1992 和 2004 年的研究对比发现, 个别种类发生了改变。如蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)营养级有不同程度的下降; 而黄鲫(*Setipinna taty*)却有不同程度的上升。食性的研究结果与 2004、2009 和 2011 年的研究对比发现, 有些种类食性发生了较大变化, 如白姑鱼(*Argyrosomus argentatus*); 有些种类食性几乎没有变化, 如小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)。

关键词 碳、氮稳定同位素; 营养级; 食性

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0010-08

稳定同位素是一种天然的示踪物质, 近年来, 在海洋生物学及生态学的研究中受到越来越多的重视(蔡德陵等, 2005; 孙明等, 2013; Ohshimo *et al.*, 2019)。生物体内的碳稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)受其代谢活动及摄食情况等多方面的影响, 在生物体对其饵料进行同化吸收时富集值极低, 因此, 可用来判断摄食者的食物来源(张波等, 2016)。而氮稳定同位素在生物体内富集系数较大, 在消费者和其食物之间以平均 3.4‰

的差值递减, 可以用来确定食物网结构或生物的营养级(徐军等, 2010)。

营养级(Trophic level, TL), 是指某一种生物在生态系统的食物链中所处的营养层次(张波等, 2004)。海洋生态系统十分复杂, 具有多层次的营养级结构。了解各种海洋生物尤其是鱼类的营养级及其食性是现代海洋生物学的基础目标之一(蔡德陵等, 2005)。计算营养级和食性的传统方法为胃含物分析法, 即利

* 国家自然科学基金青年科学基金项目(41606195)和国家重点基础研究发展计划项目(2015CB453303)共同资助 [This work was supported by National Science Foundation for Young Scientists of China (41606195), and National Key Basic Research Development Program (2015CB453303)]. 白怀宇, E-mail: xuehaiyouwo@163.com

① 通讯作者: 黄凌风, 教授, E-mail: huanglf@xmu.edu.cn; 孙耀, 研究员, E-mail: sunyao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-10-25, 收修修改稿日期: 2020-02-22

用某一种鱼类消化道内未消化的饵料生物的物种组成及数量确定其在食物网中的位置和食性(纪炜炜, 2011)。而稳定同位素能反映生物体一段时间内对食物的吸收代谢情况, 具有检测灵敏度高、不受时间和空间限制等特点(王玉堃, 2015)。蔡德陵等(2005)通过对黄、东海生态系统进行长期研究, 基于大量渔业资源调查数据, 利用氮稳定同位素比值($\delta^{15}\text{N}$), 以紫贻贝(*Mytilus edulis*)作为基准生物, 总结出一个适应于黄、东海鱼类的营养级计算公式。纪炜炜等(2011)利用碳稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)计算底层饵料贡献比来确定鱼类的食性, 将其分为 3 大类: 浮游动物食性、底栖动物食性和混合食性。

在过去几十年里, 相关学者对黄海和东海渔业资源的调查和研究从未间断(张波等, 2004; 李忠义等, 2009)。本研究在对 2011 年后捕获的黄海和东海北部 36 种海洋鱼类进行碳、氮稳定同位素测定的基础上, 分析其营养级及食性, 并与以往的研究进行对比, 拟解决以下问题: 1) 黄海和东海北部主要鱼类的营养级在 2011 年后是否发生改变; 2) 黄海和东海北部主要鱼类的食性是否发生变化。

1 材料与方法

1.1 鱼类样品的采集和处理

实验鱼类为 2011~2014 年间中国水产科学研究院黄海水产研究所“北斗”号渔业科学调查船于黄海和东海北部(30°~39°N, 120.5°~126°E)采集的 36 种鱼类。采样航次分别为 2011 年秋季航次(10~11 月)和 2013、2014 年夏季航次(7~8 月)。将鱼冷冻带回实验室后, 用解剖刀去除鱼鳞及鱼皮等, 取适量背部肌肉, 置于 60°C 恒温鼓风干燥箱中烘干 48 h, 之后使用玛瑙研钵将肌肉组织研磨成细粉末备用。

1.2 稳定同位素检测

实验样品的稳定同位素分析在中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所农业环境稳定同位素实验室进行, 使用 Isoprime-100 稳定同位素质谱仪(德国 Elementar 公司)进行测定, 碳或氮的稳定同位素比值以国际通用的 δ 值表示, 其定义为:

$$\delta(\%) = [(R_{\text{样品}} - R_{\text{标准}}) / R_{\text{标准}}] \times 1000$$

式中, R 为所测同位素的比率, 为 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, 碳、氮同位素比值以国际通用标准物 PDB 和大气氮(N_2)作为标准值。每种鱼取 3 个个体的样品进行测定。实验中每 5 个样品加测 1 个标准品, 每 10 个样品中随机选取 1 个样品进行 2~3 次重复测定, $\delta^{13}\text{C}$ 值的

分析精度为 $\pm 0.1\%$, $\delta^{15}\text{N}$ 值的分析精度为 $\pm 0.2\%$ 。

1.3 鱼类营养级计算

根据蔡德陵等(2005)的研究结果, 将 $\delta^{15}\text{N}$ 用于计算黄、东海鱼类的营养级, 其公式如下:

$$\text{TL} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{样品}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{基准}}) / \Delta\delta^{15}\text{N} + 1$$

式中, $\delta^{15}\text{N}_{\text{样品}}$ 为所测样品的氮同位素比值。营养级的氮同位素富集值 $\Delta\delta^{15}\text{N} = 2.5$ 及基准值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{基准}} = 6.05\%$ 均采用蔡德陵等(2005)的结果, 其研究中的基准生物为紫贻贝。本研究未额外测定基准值。

1.4 鱼类食性测定

参考纪炜炜等(2013)的研究, 通过计算底层饵料贡献比测定某种鱼类的食性, 其公式为:

$$\text{底层饵料贡献比(Bp)} = (\delta^{13}\text{C}_C - \delta^{13}\text{C}_P) / (\delta^{13}\text{C}_B - \delta^{13}\text{C}_P)$$

式中, $\delta^{13}\text{C}_C$ 、 $\delta^{13}\text{C}_P$ 和 $\delta^{13}\text{C}_B$ 分别代表消费者、浮游生物饵料和底层生物饵料的碳同位素平均值, 该公式假设营养级之间碳稳定同位素富集度为 0 (Vander Zander *et al.*, 2002)。

根据底层饵料贡献比(Bp)可将水生生物的摄食生态类型划分为 3 大类: Bp < 0.25, 为浮游生物食性; Bp = 0.25~0.75, 为混合食性; Bp > 0.75, 为底栖生物食性。此外, 当 Bp < 0 时, 为完全意义上的浮游生物食性; Bp > 1, 则为完全意义上的底栖生物食性(Vander Zander *et al.*, 2002; Sherwood *et al.*, 2005; 李忠义等, 2009; 纪炜炜, 2011)。

通过查阅以往的研究结果, 确定黄海和东海北部浮游生物饵料和底层生物饵料的的优势类群及其碳同位素平均值。其中, 浮游生物饵料定义为粒径大于 1000 μm 的浮游动物, 底层生物饵料定义为凹管鞭虾(*Solenocera koelbeli*)、哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)、鹰爪虾(*Trachypenaeu scurvirostris*) 和日本螯(*Charybdis japonica*)等底栖无脊椎动物; 浮游生物饵料的碳同位素平均值取 -22.09% , 底层生物饵料的碳同位素平均值取 -17.19% (薛莹, 2005; 李忠义, 2006)。

1.5 数据处理

本研究对鱼类样本的碳、氮稳定同位素进行统计, 并计算出营养级和食性结果, 与以往研究中黄海及东海北部鱼类的营养级和食性分析结果进行对比, 数据处理软件为 Excel 2013。

2 结果

2.1 稳定同位素测定结果

对于研究中测定的 36 种鱼类, 样品中 $\delta^{13}\text{C}$ 的范

围为-15.40‰~-24.18‰,总跨度为8.78‰,平均值为(-18.60±2.24)‰; $\delta^{15}\text{N}$ 的范围为10.42‰~14.39‰,总跨度为3.97‰,平均值为(12.23±0.92)‰。稳定同位素测定结果如图1所示。

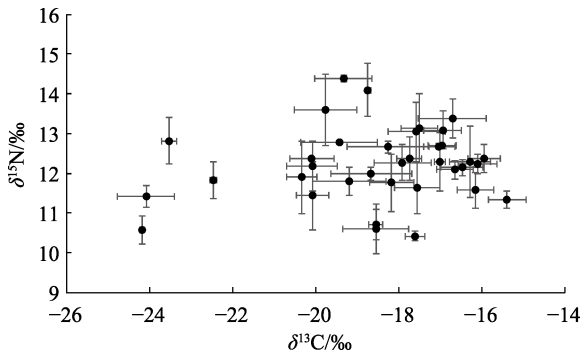


图1 36种海洋鱼类的碳、氮稳定同位素比值(平均值±标准差)

Fig. 1 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of 36 species of marine fishes (Mean±SD)

2.2 鱼类营养级分析结果

根据实验测定的 $\delta^{15}\text{N}$ 计算得到本研究中的36种海洋鱼类的营养级,结果如表1所示,其营养级范围为2.75~4.34,总跨度为1.59,平均值为3.47。其中,

鲢(*Miichthys miiuy*)的营养级最低,黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的营养级最高。

2.3 鱼类底层饵料贡献比和食性测定结果

计算获得的底层饵料贡献比(Bp)值,其范围为-0.43~1.37,总跨度为1.80,其中,斑鱚(*Konosirus punctatus*)的Bp值最小,黑姑鱼(*Atrubucca nibe*)的Bp值最大。根据底层饵料贡献比值可判定,本研究分析的36种海洋鱼类中,有4种为完全浮游生物食性,8种为底栖生物食性(非完全意义上的),混合食性为12种,完全底栖生物食性为12种(表2)。本研究未见其他食性的鱼类。

2.4 营养级分组的食性统计结果

参考张波等(2015)的研究,将本研究中的36种海洋鱼类依据营养级不同分为3组,分别为低营养级组(TL<3.50)、中营养级组(TL=3.5~4)和高营养级组(TL>4),并对不同食性的鱼种数进行统计(图2)发现,中、低营养级组的鱼类占绝大多数,高营养级组的鱼类所占比例较少(8.33%),且都是混合食性。中营养级组不同食性的鱼种数呈现明显的梯度变化,其中有一半为完全底栖食性。低营养级组所占比例较大(52.78%),以混合食性和完全底栖食性为主。

表1 黄海及东海北部36种海洋鱼类营养级谱及对比
Tab. 1 Trophic levels of 36 marine fishes in Yellow Sea and northern East China Sea

鱼的种类 Fish species	氮同位素法 Analysis of $\delta^{15}\text{N}$		胃含物分析法 Analysis of stomach content		
	本研究 This study	蔡德陵等 (2005)	邓景耀等 (1986)	韦晟等 (1992)	张波等 (2004)
鲢 <i>Miichthys miiuy</i>	2.75	3.58	3.40	3.40	4.34
斑鱚 <i>Konosirus punctatus</i>	2.81	-	-	2.00	3.22
银鲳 <i>Pampus argenteus</i>	2.82	2.48	-	2.20	3.12
绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys kumu</i>	2.86	2.35	-	2.80	4.10
黑姑鱼 <i>Atrubucca nibe</i>	3.11	-	-	-	-
玉筋鱼 <i>Ammodytes personatus</i>	3.14	2.55	-	2.30	-
日本鲭 <i>Scomber japonicus</i>	3.15	-	-	-	-
鳓 <i>Ilisha elongata</i>	3.21	-	-	-	-
褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	3.23	-	-	-	-
黄鲫 <i>Setipinna taty</i>	3.28	2.99	2.40	2.20	3.22
小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	3.30	2.70	3.10	2.70	3.7
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	3.31	1.91	2.70	2.50	3.7
长绵鳎 <i>Zoarces elongatus</i>	3.34	2.82	2.40	2.40	-
白姑鱼 <i>Argyrosomus argentatus</i>	3.38	3.38	3.20	2.90	3.81
银色突吻鳗 <i>Gnathophis nystromi</i>	3.42	-	-	-	-
刺鲳 <i>Psenopsis anomala</i>	3.44	-	-	-	4.03

续表 1

鱼的种类 Fish species	氮同位素法 Analysis of $\delta^{15}\text{N}$		胃含物分析法 Analysis of stomach content		
	本研究 This study	蔡德陵等 (2005)	邓景耀等 (1986)	韦晟等 (1992)	张波等 (2004)
蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	3.45	3.62	3.90	3.80	3.89
龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>	3.47	2.60	—	—	3.55
长蛇鲻 <i>Saurida elongate</i>	3.49	3.49	3.80	3.80	—
多齿蛇鲻 <i>Saurida tumbil</i>	3.50	—	3.45	—	—
竹荚鱼 <i>Trachurus trachurus</i>	3.50	3.02	—	—	3.80
高眼鲷 <i>Cleisthenes herzensteini</i>	3.53	3.30	3.30	—	4.20
尖嘴扁颚针鱼 <i>Ablennes anastomella</i>	3.53	—	—	3.80	—
皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belengerii</i>	3.53	3.38	3.30	—	—
宽体舌鳎 <i>Cynoglossus robustus</i>	3.65	2.46	—	—	—
带鱼 <i>Trichiurus coxii</i>	3.65	2.82	—	3.40	3.81
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	3.66	—	—	2.90	4.40
大泷六线鱼 <i>Hexagrammos otakii</i>	3.69	—	3.00	—	—
太平洋鲱 <i>Clupea pallasii</i>	3.70	—	—	—	—
许氏平鲉 <i>Sebastes schlegelii</i>	3.80	—	—	—	—
多鳞鱚 <i>Sillago sihama</i>	3.82	—	—	2.40	—
无斑圆颚针鱼 <i>Tylosurus leiurus</i>	3.83	—	—	—	—
鲷 <i>Platycephalus indicus</i>	3.93	—	—	3.00	—
矛尾复鰂虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>	4.02	3.24	3.00	3.00	—
大头鳕 <i>Gadus macrocephalus</i>	4.22	2.53	—	3.50	4.50
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	4.34	—	—	3.00	3.93

注：“—”表示未得到相关数据，下同

Note: “—”: Data unavailable. The same as below

表 2 黄海和东海北部 36 种海洋鱼类的食性测定结果及对比

Tab.2 Feeding characters of 36 marine fishes in Yellow Sea and northern East China Sea

鱼的种类 Fish species	Bp 值 Bp value	生态摄食类型 Feeding characters			
		本研究 This study	张波等 (2004)	李忠义等 (2009)	纪炜炜等 (2011)
斑鲷 <i>Konosirus punctatus</i>	-0.43	完全浮游生物食性	底栖动物食性	—	—
玉筋鱼 <i>Ammodytes personatus</i>	-0.41	完全浮游生物食性	—	—	—
太平洋鲱 <i>Clupea pallasii</i>	-0.30	完全浮游生物食性	—	—	—
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	-0.08	完全浮游生物食性	浮游动物食性	—	—
长绵鳎 <i>Zoarces elongatus</i>	0.36	混合食性	—	—	—
高眼鲷 <i>Cleisthenes herzensteini</i>	0.41	混合食性	底栖、游泳动物食性	—	—
蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	0.41	混合食性	浮游、底栖和游泳动物食性	—	—
日本鲭 <i>Scomber japonicus</i>	0.41	混合食性	—	—	—
矛尾复鰂虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>	0.47	混合食性	—	混合食性	—
大泷六线鱼 <i>Hexagrammos otakii</i>	0.54	混合食性	—	浮游生物食性	—
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	0.56	混合食性	—	完全底栖生物食性	底栖生物食性
小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	0.59	混合食性	浮游、底栖和游泳动物食性	混合食性	混合食性
大头鳕 <i>Gadus macrocephalus</i>	0.68	混合食性	—	—	—

续表 2

鱼的种类 Fish species	Bp 值 Bp value	生态摄食类型 Feeding characters			
		本研究 This study	张波等 (2004)	李忠义等 (2009)	纪炜炜等 (2011)
白姑鱼 <i>Argyrosomus argentatus</i>	0.70	混合食性	底栖、游泳动物食性	浮游生物食性	底栖生物食性
绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys kumu</i>	0.72	混合食性	底栖动物食性	—	混合食性
银鲳 <i>Pampus argenteus</i>	0.72	混合食性	浮游底栖动物食性	混合食性	混合食性
宽体舌鲷 <i>Cynoglossus robustus</i>	0.78	底栖生物食性	—	—	—
黄鲫 <i>Setipinna taty</i>	0.80	底栖生物食性	浮游动物食性	混合食性	混合或浮游生物食性
长蛇鲻 <i>Saurida elongate</i>	0.85	底栖生物食性	—	浮游生物食性	—
尖嘴扁颌针鱼 <i>Ablennes anastomella</i>	0.88	底栖生物食性	—	—	—
鲩 <i>Miichthys miuiy</i>	0.91	底栖生物食性	—	完全底栖生物食性	—
许氏平鲉 <i>Sebastes schlegelii</i>	0.92	底栖生物食性	—	—	—
褐牙鲷 <i>Paralichthys olivaceus</i>	0.92	底栖生物食性	—	—	—
无斑圆颌针鱼 <i>Tylosurus leiurus</i>	0.94	底栖生物食性	—	—	—
带鱼 <i>Trichiurus coxii</i>	1.03	完全底栖生物食性	—	—	—
多齿蛇鲻 <i>Saurida tumbil</i>	1.03	完全底栖生物食性	—	—	—
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	1.05	完全底栖生物食性	游泳动物食性	—	—
多鳞鱧 <i>Sillago sihama</i>	1.05	完全底栖生物食性	—	—	—
鲷 <i>Platycephalus indicus</i>	1.10	完全底栖生物食性	—	—	—
银色突吻鳗 <i>Gnathophis nystromi</i>	1.11	完全底栖生物食性	—	—	—
刺鲳 <i>Psenopsis anomala</i>	1.14	完全底栖生物食性	游泳动物食性	—	底栖生物食性
竹荚鱼 <i>Trachurus trachurus</i>	1.19	完全底栖生物食性	浮游、底栖和游泳动物食性	底栖或浮游生物食性	—
鳓 <i>Ilisha elongata</i>	1.21	完全底栖生物食性	—	—	—
龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>	1.22	完全底栖生物食性	游泳动物食性	混合食性	浮游生物食性
皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belengerii</i>	1.25	完全底栖生物食性	—	—	底栖生物食性
黑姑鱼 <i>Atrobuca nibe</i>	1.37	完全底栖生物食性	—	—	—

3 讨论

3.1 碳、氮稳定同位素比值分析

海洋鱼类体内碳、氮稳定同位素含量受其代谢活动等多方面的影响,同时,不同鱼类因其生活史和摄食偏好等的不同,也可能导致它们的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 含量相差较大(图 1)。在本研究 36 种海洋鱼类中,共有 19 种与蔡德陵等(2005)在黄海和东海进行的海洋生

物稳定同位素研究的种类相同。整体研究结果与之相比, $\delta^{13}\text{C}$ 的总跨度相差较小(8.78‰ vs 7.04‰),而 $\delta^{15}\text{N}$ 的总跨度相差较大(3.97‰ vs 7.17‰)。考虑除个体差异和种群特异性之外,2 个研究在采样时不能保证同种鱼处在相同的生长阶段(如幼鱼或成鱼),因此,其稳定同位素的分析结果也会不相同。

此外,研究表明,在同一生态系统中,如果 2 个物种间的碳稳定同位素差异小于 0.60‰或大于 1.50‰,便可认为这 2 个物种间不存在捕食关系。因

为对于前一种情况, 它们可能处于同一个营养级上; 而对于后一种, 这 2 个物种之间至少还存在 1 个营养级(王玉堃, 2015)。由此, 本研究中的 36 种海洋鱼类, $\delta^{13}\text{C}$ 总跨度为 8.78‰, 应存在多个营养层次。

对于同一种鱼的稳定同位素比值, 其或因在不同类型的海区, 饵料种类和丰富度不同而产生差异。张博伦等(2019)研究了天津海域某人工鱼礁区的食物网结构, 对于 2012 年建成的鱼礁区, 其许氏平鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ (-17.19‰) 与本研究(-17.58‰)相差较小, 但 $\delta^{15}\text{N}$ (14.30‰) 与本研究(13.04‰)相差较大。这或许是因为人工鱼礁区比本研究中的开阔海域饵料更丰富。

本研究中, 不同鱼种的碳、氮稳定同位素几乎无相关性(图 1), 这或许是由于其营养级跨度较大导致。而对于同一种鱼的稳定同位素分析, Pethybridge 等(2015)研究发现, 长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)肌肉组织中碳、氮稳定同位素具有很好的相关性。陶雅晋等(2017)利用稳定同位素技术结合胃含物分析法研究南海黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacores*)的摄食习性。他们的研究成果为今后利用稳定同位素分析法深入研究某一种海洋鱼类, 尤其是经济鱼种提供了思路。

3.2 海洋鱼类的营养级和食性变动

对于水域生态系统生物营养级和食性的分析测定最早采用胃含物分析法。这种方法比较直观、操作性强, 但对样品的需求量大, 也需要研究者具有娴熟的生物种类识别能力, 且容易存在偶然误差(生物偶食性和饵料难消化吸收等情况)。相对而言, 稳定同位素分析法需要的样品量较小, 高效、准确(王玉堃, 2015)。

本研究查阅以往调查数据, 包括邓景耀等(1986)对渤海鱼类的研究, 韦晟等(1992)对黄海鱼类的研究以及张波等(2004)对东海和黄海鱼类的研究。通过对比发现, 不同年代、不同海域的同种鱼类, 其营养级测定结果存在一定的偏差。同时, 张波等(2004)研究发现, 海洋鱼类的平均营养级随年代变化有下降的趋势。以鲈为例, 本研究中其营养级与张波等(2004)和蔡德陵等(2005)的研究相比, 分别下降了 1.59 和 0.83 个营养级。这可能与本研究中所采集的鲈未生长到成鱼阶段有关。此外, 本研究结果与 Pauly 等(1998)提出的捕捞能降低海洋食物网营养级的观点相吻合, 即在高强度的捕捞影响下, 海洋生态系统中营养级较高的捕食者(通常是成年个体较大、经济价值较高的种类)会持续减少, 从而导致渔获物的整体组成向个体较小、营养级较低、经济价值较低的种类转变(纪炜炜, 2011; 王玉堃, 2015)。

影响鱼类食性的因素有很多, 其中饵料生物的种类

型是主要因素, 栖息环境也在一定程度上影响其食性和摄食量(李忠义等, 2009)。本研究通过与以往学者对黄海和东海北部鱼类食性的研究对比发现, 少数种类在近 10 年中, 其食性几乎没有变化, 如小黄鱼、银鲳等(表 2)。其他种类的食性随年代和海域的不同而略有偏差, 如白姑鱼、龙头鱼等, 考虑到同一种鱼在不同生长阶段其食性会发生改变(张波等, 2016), 而在调查取样时不可能确保所有样本都取到成年个体, 从而导致出现这种结果。

营养级分组的食性统计结果(图 2)同以往的研究(张波等, 2004; 李忠义等, 2009)相比, 黄海和东海北部的主要鱼类有向较低营养级转变的趋势, 同时, 中、高营养级组的鱼类以混合食性和完全底栖食性为主, 分别占这 2 组种类总数的 29.41% 和 41.18%。这种情况, 一方面可能是由于捕捞压力使海洋中饵料生物的种类和数量减少, 迫使某些海洋鱼类改变了食性范围, 由单一食性转变为混合食性; 另一方面, 中、高营养级的部分种类大多以“伏击”的方式捕食其他鱼类, 所以会选择较隐蔽的水底生活, 促使其食性为完全底栖, 例如, Henderson 等(2014)对大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)的研究就说明了这一点。

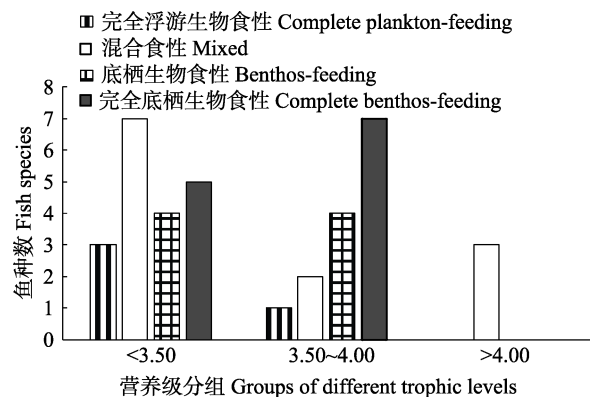


图 2 本研究中不同营养级分组的鱼类食性种类数
Fig.2 Fish species of feeding character in different trophic levels in this study

有学者提出“海洋营养级指数”的概念, 即海洋渔获物的平均营养级, 可反映渔获物及其营养层次的变化趋势。通过近几十年对我国黄海和东海海洋鱼类营养级的研究, 杜建国等(2014)发现, 海洋营养级指数有下降的趋势, 说明我国的海洋渔获物正从高营养级、高经济价值的鱼类向低营养级、低经济价值的鱼类转变。同时, 本研究 and 以往的研究对比发现, 部分鱼种的营养级发生了较大改变。除了强大的捕捞压力外, 鱼类生境及栖息地的破坏也是导致其营养级变动的一大因素(张波等, 2004)。

参 考 文 献

- Cai DL, Li HY, Tang QS, *et al.* The establishment of continuous trophic levels in the food web of ecosystem of Yellow Sea and East China Sea: The results from analysis of carbon and nitrogen stable isotopes. *Scientia Sinica Vitae*, 2005, 35(2): 123–130 [蔡德陵, 李红燕, 唐启升, 等. 黄东海生态系统食物网连续营养谱的建立: 来自碳氮稳定同位素方法的结果. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(2): 123–130]
- Deng JY, Meng TX, Ren SM. Food web of fishes in Bohai Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 1986, 6(4): 356–364 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民. 渤海鱼类食物关系的初步研究. *生态学报*, 1986, 6(4): 356–364]
- Du JG, Ye GQ, Chen B, *et al.* Changes in the marine trophic index of Chinese marine area. *Biodiversity Science*, 2014, 22(4): 532–538 [杜建国, 叶观琼, 陈彬, 等. 中国海域海洋生物的营养级指数变化特征. *生物多样性*, 2014, 22(4): 532–538]
- Henderson MJ, Fabrizio MC, Lucy JA. Movement patterns of summer flounder near an artificial reef: Effects of fish size and environmental cues. *Fisheries Research*, 2014, 153: 1–8
- Ji WW, Chen XZ, Jiang YZ, *et al.* Stable isotope analysis of some representative nektonic organisms in the central and northern part of East China Sea. *Marine Fisheries*, 2011, 33(3): 241–250 [纪炜炜, 陈雪忠, 姜亚洲, 等. 东海中北部游泳动物稳定碳氮同位素研究. *海洋渔业*, 2011, 33(3): 241–250]
- Ji WW, Jiang YZ, Ruan W, *et al.* Stable isotope analysis on the feeding character of representative fishes during spring in central and northern East China Sea and south Yellow Sea. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 415–422 [纪炜炜, 姜亚洲, 阮雯, 等. 基于稳定同位素方法分析东海中北部及黄海南部春季主要鱼类的食性特征. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 415–422]
- Ji WW. Ecological studies on the food web structures and trophic relationships of northern and central East China Sea using stable carbon and nitrogen isotopes. Doctoral Dissertation of Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2011 [纪炜炜. 东海中北部主要游泳动物食物网结构和营养关系初步研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011]
- Li ZY, Zuo T, Dai FQ, *et al.* Study on feeding habits of organisms from Changjiang Estuary and adjacent Southern Yellow Sea in spring with stable isotope technology. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 784–789 [李忠义, 左涛, 戴芳群, 等. 长江口及南黄海海域春季生物摄食生态的稳定同位素研究. *水产学报*, 2009, 33(5): 784–789]
- Li ZY. Studies on the feeding ecology of dominant fishes and foodweb structure in the Changjiang Estuary and Southern Yellow Sea with stable isotope. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2006 [李忠义. 应用稳定同位素技术研究长江口及南黄海海域主要鱼类摄食生态和食物网结构. 厦门大学博士研究生学位论文, 2006]
- Ohshimo S, Madigan DJ, Kodama T, *et al.* Isoscapes reveal patterns of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of pelagic forage fish and squid in the Northwest Pacific Ocean. *Progress in Oceanography*, 2019, 175: 124–138
- Pauly D, Christensen V, Dalsgaard J, *et al.* Fishing down marine food webs. *Science*, 1998, 279(5352): 860–863
- Pethybridge HR, Young JW, Kuhnert PM, *et al.* Using stable isotopes of albacore tuna and predictive models to characterize bioregions and examine ecological change in the SW Pacific Ocean. *Progress in Oceanography*, 2015, 134: 293–303
- Sherwood GD, Rose GA. Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2005, 63(4): 537–549
- Sun M, Liu XZ, Li YP, *et al.* Trophic level analysis of key species in Liaodong Bay using stable nitrogen isotopes. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 190–198 [孙明, 刘修泽, 李轶平, 等. 应用氮稳定同位素技术研究辽东湾海域主要渔业生物的营养级. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 190–198]
- Tao YJ, Mo M, He XB, *et al.* Feeding habits and ontogenetic diet shifts of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) in the South China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 1–10 [陶雅晋, 莫檬, 何雄波, 等. 南海黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacores*)摄食习性及其随生长发育的变化. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 1–10]
- Vander Zanden MJ, Vadeboncoeur Y. Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology*, 2002, 83(8): 2152–2161
- Wang YK. Preliminary studies on the population ecology based on fish otolith microstructure and microchemistry. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [王玉莹. 耳石微细结构和微化学示踪技术在鱼类种群生态学研究中的应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- Wei S, Jiang WM. Study on food web of fishes in the Yellow Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1992, 23(2): 182–192 [韦晟, 姜卫民. 黄海鱼类食物网的研究. *海洋与湖沼*, 1992, 23(2): 182–192]
- Xu J, Zhang M, Xie P. Variability of stable nitrogen isotopic baselines and its consequence for trophic modeling. *Journal of Lake Sciences*, 2010, 22(1): 8–20 [徐军, 张敏, 谢平. 氮稳定同位素基线的可变性及对营养级评价的影响. *湖泊科学*, 2010, 22(1): 8–20]
- Xue Y. Studies on the feeding ecology of dominant fishes and food web of fishes in the central and southern Yellow Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2005 [薛莹. 黄海中南部主要鱼种摄食生态和鱼类食物网研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2005]
- Zhang B, Tang QS. Study on trophic level of important resources species at high trophic levels in the Bohai Sea, Yellow Sea

and East China Sea. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(4): 393–404 [张波, 唐启升. 渤、黄、东海高营养层次重要生物资源种类的营养级研究. *海洋科学进展*, 2004, 22(4): 393–404]

Zhang B, Wu Q, Jin XS. Interannual variation in the food web of commercially harvested species in Laizhou Bay from 1959 to 2011. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 278–287 [张波, 吴强, 金显仕. 1959–2011 年莱州湾渔业资源群落食物网结构的变化. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 278–287]

Zhang B, Yuan W, Dai FQ. Study on feeding ecology of fish

community in Laoshan Bay during summer using stable carbon and nitrogen isotopes. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 585–594 [张波, 袁伟, 戴芳群. 应用稳定同位素技术研究崂山湾夏季鱼类群落的摄食生态. *水产学报*, 2016, 40(4): 585–594]

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

(编辑 马瑾艳)

Trophic Levels and Feeding Characters of Marine Fishes in the Yellow Sea and Northern East China Sea Based on Stable Isotope Analysis

BAI Huaiyu¹, WANG Yukun², ZHANG Tingting², HUANG Lingfeng^{1,3①}, SUN Yao^{2,4①}

(1. *College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102*; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071*; 3. *Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, Xiamen 361102*; 4. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071*)

Abstract This study analyzed the carbon and nitrogen stable isotopes from 36 species of marine fishes in the Yellow Sea and northern East China Sea in 2011–2014. The feeding characters were determined by calculating the benthos proportion (Bp) with the $\delta^{13}\text{C}$ data, and the trophic levels (TLs) were calculated using the $\delta^{15}\text{N}$ data. The results showed that the trophic levels of the fishes ranged from 2.75 to 4.34 (mean 3.47). Four of the 36 species were completely plankton-feeding, and eight of them were benthos-feeding. The number of mixed feeding and complete benthos-feeding species was 12. Most of the fish species (91.67%) belonged to the middle (TL=3.5~4) and low (TL<3.5) trophic levels. However, the number of high trophic level (TL>4) species was only 3, and all were mixed feeding. In contrast to the TL research results of 1986, 1992, and 2004, the authors of this paper found that the trophic levels of some species had changed slightly in recent years. For example, the TL of *Scomberomorus niphonius* had decreased to varying degrees, while that of *Setipinna taty* had increased to a certain extent. The feeding character results were compared to those of 2004, 2009, and 2011. It showed that the feeding character of some fishes, such as *Argyrosomus argentatus*, had changed significantly. That of others, such as *Larimichthys polyactis*, had not changed significantly.

Key words Carbon and nitrogen stable isotope; Trophic level; Feeding character

① Corresponding author: HUANG Lingfeng, E-mail: huanglf@xmu.edu.cn; SUN Yao, E-mail: sunyao@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200130001

http://www.yykxjz.cn/

侯兴, 高亚平, 杜美荣, 姜妮妮, 李凤雪, 董世鹏, 李文豪, 孟珊, 王军威, 张义涛, 蒋增杰. 桑沟湾浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 18–27

Hou X, Gao YP, Du MR, Jiang WW, Li FX, Dong SP, Li WH, Meng S, Wang JW, Zhang YT, Jiang ZJ. Temporal and spatial variation in phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 18–27

桑沟湾浮游植物群落结构时空变化 特征及影响因素*



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

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

摘要 为了解北方典型养殖海湾——桑沟湾水域浮游植物群落结构的时空变化特征及其影响因素,于2017年4月(春季)、7月(夏季)、11月(秋季)和2018年1月(冬季)对桑沟湾水域21个站点进行4个航次的大面调查。结果显示,调查期间,该湾共采集到浮游植物31属51种,其中,硅藻(Diatom)24属43种,甲藻(Dinoflagellate)3属4种,绿藻(Chlorophyta)2属2种,金藻(Chrysophyta)2种,蓝藻(Cyanophyta)1种。按照季节划分,春季22种,夏季20种,秋季23种,冬季20种。优势度指数分析结果表明,硅藻是绝对优势种,其中,具槽帕拉藻(*Paralia sulcata*)为全年优势种,数量百分比在18.6%~84.9%之间。浮游植物细胞丰度在 $0.16 \times 10^3 \sim 12.20 \times 10^3$ 个/L之间,表现为冬季>春季>秋季>夏季。物种多样性指数(Shannon)范围为0.69~1.35,物种均匀度指数 J (Pielou)范围为0.42~0.70。磷酸盐是桑沟湾浮游植物生长的主要限制营养盐。研究结果揭示了桑沟湾养殖水域浮游植物的时空变化特征,为深入认识养殖生态系统的结构和功能提供了基础数据。

关键词 浮游植物; 群落结构; 营养盐; 滤食性贝类; 桑沟湾

中图分类号 Q-9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0018-10

浮游植物是海洋生态系统中最重要的高级生产者,在海洋生态系统的物质循环和能量流动过程中发

* 青岛海洋科学与技术国家实验室主任基金(QNLM201707)、山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0502)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD50)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T13)、山东省泰山学者青年专家计划项目(tsqn201909166)和国家现代农业产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)共同资助 [This work was supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (QNLM201707), Marine S&T Fund of Shandong Province for QNLM (2018SDKJ0502), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD50), Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, QNLM (2018-MFS-T13), the Young Taishan Scholars Program of Shandong Province (tsqn201909166), and China Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 侯兴, E-mail: houxing_up@163.com

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

收稿日期: 2020-01-30, 收修改稿日期: 2020-02-15

挥着重要作用。我国是世界贝类养殖第一大国,牡蛎、贻贝、扇贝、蛤仔等滤食性贝类是海水贝类养殖的主要种类,作为滤食性贝类主要的食物来源,浮游植物的群落结构和多样性研究对于滤食性贝类养殖业的健康可持续发展具有重要的指导意义。

桑沟湾位于山东省荣成市,水域面积约为144 km²,平均水深约为7.5 m,是我国北方典型的规模化养殖海湾(Fang *et al.*, 2016),主要养殖对象为长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)及海带(*Saccharina japonica*)等。自20世纪80年代发展至今,桑沟湾形成了规模化的多营养层次综合养殖模式:由湾内到湾外依次为贝类养殖区、贝类海带综合养殖区、海带养殖区,并且海带养殖区已经扩展到了湾口外的大片区域(郝林华等, 2012)。近些年来,对桑沟湾浮游植物的种类组成、数量分布、季节变化、多样性特征、光合色素特征等进行了研究(毛兴华等, 1988; 刘慧等, 2003; 宋洪军等, 2007; 李超伦等, 2010; 王晓敏, 2017),但规模化养殖水域的生态环境条件随不同年份养殖活动的强弱变化响应不同,阶段性开展养殖区的浮游植物结构组成研究对于持续掌握养殖水域饵料基础条件的变化趋势非常必要。因

此,本研究于2017年4月~2018年1月,对桑沟湾水域进行4个航次的大面调查,结合历史数据,分析了浮游植物群落结构和环境因子基础数据的时空变化特征、潜在成因及长期变化趋势,研究结果可为深入认识桑沟湾规模化海水养殖活动的资源环境效应提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集和处理方法

于2017年4月(春季)、7月(夏季)、11月(秋季)及2018年1月(冬季)在桑沟湾(122.48°~122.64°E, 37.04°~37.15°N)进行4个季度的大面调查,共设置21个站点(图1),覆盖桑沟湾贝类养殖区、海带养殖区和贝藻综合养殖区。其中,站点1、2+、4+为外海区,站点2、3、4为海带区,站点5、6、7、10、11、12为贝藻综合养殖区,站点8、9、14、15、16、18、19为贝类区养殖,站点13为沿岸区。对各站点进行浮游植物群落调查并开展水质指标检测调查,水质理化指标包括水温(*T*)、pH、盐度(*S*)、溶解氧(*DO*)、透明度(*SD*)、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N和PO₄³⁻-P等。

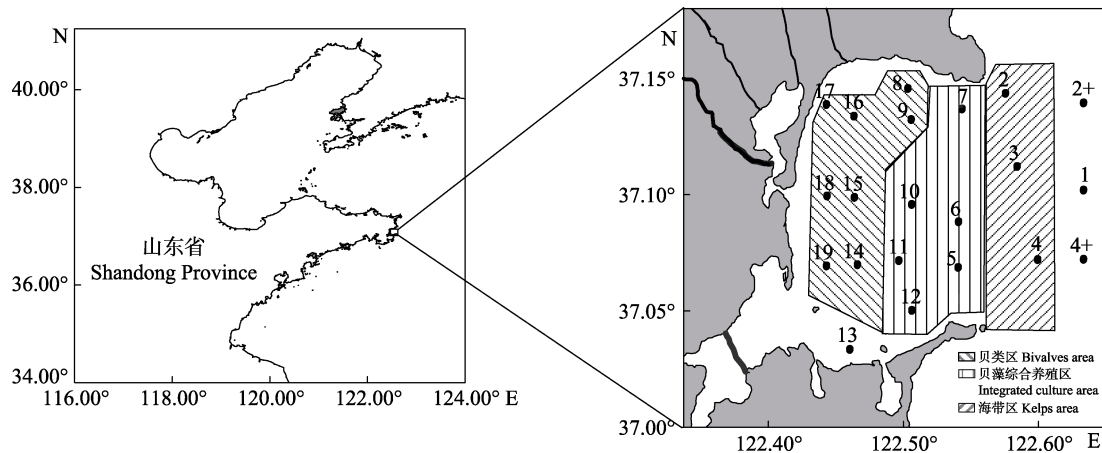


图1 桑沟湾水域调查站位分布

Fig.1 Location of sampling station in the Sanggou Bay

温度、pH、盐度和溶解氧使用经标定后的便携式水质分析仪(美国 YSI 公司, Professional Plus)现场测定,SD 采用透明度盘现场测定。使用 Niskin 采水器采集距表层 0.2 m 处水样,2.5 L 用于浮游植物的鉴定和计数,使用 5% 的甲醛溶液固定保存,运回实验室后观察。同时,另取 2.5 L 水样用于营养盐测定,测定方法按照《海洋调查规范》(GB12763-2007)中的要求进行:经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤后,分别采用次溴酸钠氧化法、锌镉还原法、重氮偶氮法和磷钼蓝法测定 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 和 PO₄³⁻-P。

1.2 数据处理与分析

群落优势种选用 McNaughton 优势度指数(*Y*) (*Y*>0.02 为优势种),物种多样性指数采用 Shannon-Wiener 多样性指数(*H'*),物种均匀度指数采用 Pielou 指数(*J*),计算公式分别为:

$$Y = \frac{n_i}{N} f_i \quad (1)$$

$$J = \frac{H'}{\log_2 S} \quad (2)$$

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i \quad (3)$$

式中, Y 为优势度, n_i 为第 i 个种的丰度, N 为样品的总丰度, f_i 为该种的站位出现频率。 H' 为生物多样性指数, S 为样品中的种类总数, P_i 为第 i 种的个体数与总个体数的比值。

数据处理采用 Excel 2016, 站位图绘制采用 Surfer 12.0 软件, 数据统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 进行 Pearson 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 表层海水主要理化环境参数时空变化特征

桑沟湾水域主要水质参数见表 1。表层水温的年变化范围为 9.14℃~22.40℃, 其中, 冬季温度较低。

表 1 桑沟湾主要水质参数
Tab.1 Main parameters of water quality in Sanggou Bay

参数 Parameters	季节 Season			
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
水温 T (°C)	9.26±2.37	22.40±3.13	14.14±1.01	3.51±1.27
溶解氧 DO (mg/L)	—	7.41±0.21	8.16±0.51	10.84±0.52
pH	7.84±0.13	8.02±0.08	8.06±0.09	8.16±1.30
盐度 Salinity	32.31±0.03	31.85±0.08	32.02±0.16	32.72±0.08
透明度 SD (m)	0.88±0.64	2.90±1.50	1.47±0.84	1.49±1.23
NH_4^+ -N ($\mu\text{mol/L}$)	1.73±0.63	3.14±1.53	3.81±1.63	3.02±1.26
NO_2^- -N ($\mu\text{mol/L}$)	0.28±0.05	0.35±0.04	1.86±0.28	0.86±0.15
NO_3^- -N ($\mu\text{mol/L}$)	2.34±1.18	5.64±4.87	7.92±2.69	7.63±1.95
DIN ($\mu\text{mol/L}$)	4.35±1.24	8.80±2.01	13.59±3.27	11.52±3.11
PO_4^{3-} -P ($\mu\text{mol/L}$)	0.26±0.21	0.13±0.12	0.21±1.17	0.38±0.27

如表 2 所示, 桑沟湾浮游植物优势种明显, 优势种在各个季节中既有交叉又有演替, 从每个季节来看, 通常有 2~4 种优势种, 且皆为硅藻类, 从全年来看, 优势种占据了全部浮游植物 69.3%~89.5% 的数量。其中, 具槽帕拉藻在 4 个季节中均为优势种, 平均密度在 $0.24 \times 10^3 \sim 3.89 \times 10^3$ 个/L 之间, 各站位数量百分比在 18.6%~84.9% 之间, 特别是春季, 具槽帕拉藻占据绝对优势。夏季, 角毛藻属优势种较多, 数量百分比达到 35.8%。另外, 奇异菱形藻 (*Nitzschia paradoxa*)、小环藻 (*Cyclotella* sp.) 在秋季和冬季均为优势种。

桑沟湾出现的甲藻为大角角藻 (*Ceratium macroceros*)、三角角藻 (*C. tripos*)、夜光藻 (*Noctiluca scintillans*)、透明原多甲藻 (*Protoperdinium*), 各季节平均浓度在 $0 \sim 0.02 \times 10^3$ 个/L 之间; 金藻为球等边金藻 (*Isochrysis galbana*)、小等刺硅鞭藻 (*Dictyocha fibula*), 各站季节平均浓度在 $0 \sim 0.13 \times 10^3$ 个/L 之间;

溶解氧的年平均值为 8.80 mg/L, 冬季溶解氧含量较高; pH 的年变化范围为 7.84~8.16, 春季 pH 较低。盐度的年平均变化范围为 31.8~32.7, 季节变化不大。透明度的年平均变化范围为 0.88~2.90 m, 其中, 夏季透明度较高, 春季较低。

2.2 表层海水浮游植物群落结构时空变化特征

2.2.1 浮游植物的种类组成 本研究鉴定的浮游植物属于硅藻 (Diatom)、蓝藻 (Cyanophyta)、绿藻 (Chlorophyta)、甲藻 (Dinoflagellate)、金藻 (Chrysophyta) 等 5 个门类, 共计 31 属 5 种。硅藻 24 属 43 种, 其中, 圆筛藻属 (*Coscinodiscus*) 和角毛藻属 (*Chaetoceros*) 种类最多, 各为 6 种。甲藻 3 属 4 种, 绿藻 2 属 2 种, 金藻 2 种, 蓝藻 1 种。种类多属温带近岸广布种, 但种类组成上存在季节性演替。

绿藻为单角盘星藻 (*Pediastrum simplex*)、二形栅藻 (*Scenedesmus dimorphus*), 各季节平均浓度在 $0 \sim 0.13 \times 10^3$ 个/L 之间; 蓝藻为卷曲鱼腥藻 (*Anabaena circinalis*), 各季节平均浓度在 $0 \sim 0.48 \times 10^3$ 个/L 之间。与往年的优势种相比, 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、针杆藻 (*Synedra* sp.)、丹麦细柱藻 (*Leptocylindrus danicus*) 等往年出现的优势种在本年度只是少量出现, 而具槽帕拉藻、角毛藻、菱形藻、圆筛藻则是常年出现的优势种。

2.2.2 浮游植物的丰度分布 如图 2 所示, 春季浮游植物细胞丰度在 $0.28 \times 10^3 \sim 10.48 \times 10^3$ 个/L 之间, 平均值为 4.44×10^3 个/L, 共发现 22 种藻类, 其中, 硅藻占 99.7%, 甲藻占 0.3%, 具槽帕拉藻为主要优势种, 占 84.9% 的数量。春季的浮游植物高值区出现在湾内东南区, 丰度以该区域为中心向湾内及湾外递减。

夏季浮游植物细胞在 $0.16 \times 10^3 \sim 6.60 \times 10^3$ 个/L 之

表 2 桑沟湾浮游植物优势种组成
Tab.2 The dominant species of phytoplankton in Sanggou Bay

季节 Season	优势种 Dominant species	优势度 Dominance	平均密度 Average density ($\times 10^3$ cells/L)	数量百分比 Quantity percentage (%)	
				单种 Single	合计 Total
春季 Spring	具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	0.679	3.77	84.9	89.5
	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> sp.	0.037	0.21	4.6	
夏季 Summer	旋链角毛藻 <i>Chaetoceros curvisetus</i>	0.192	0.66	38.5	69.3
	扭链角毛藻 <i>Chaetoceros tortissimus</i>	0.050	0.28	16.7	
	具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	0.042	0.24	14.1	
秋季 Autumn	具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	0.335	1.62	41.9	77.3
	奇异菱形藻 <i>Nitzschia paradoxa</i>	0.147	0.63	16.3	
	柔弱几内亚藻 <i>Guinardia delicatula</i>	0.060	0.58	15.0	
	小环藻 <i>Cyclotella</i> sp.	0.029	0.16	4.1	
冬季 Winter	具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	0.363	3.89	58.1	77.4
	小环藻 <i>Cyclotella</i> sp.	0.047	0.36	5.4	
	曲舟藻 <i>Pleurosigma</i> sp.	0.036	0.65	9.7	
	奇异菱形藻 <i>Nitzschia paradoxa</i>	0.032	0.29	4.2	

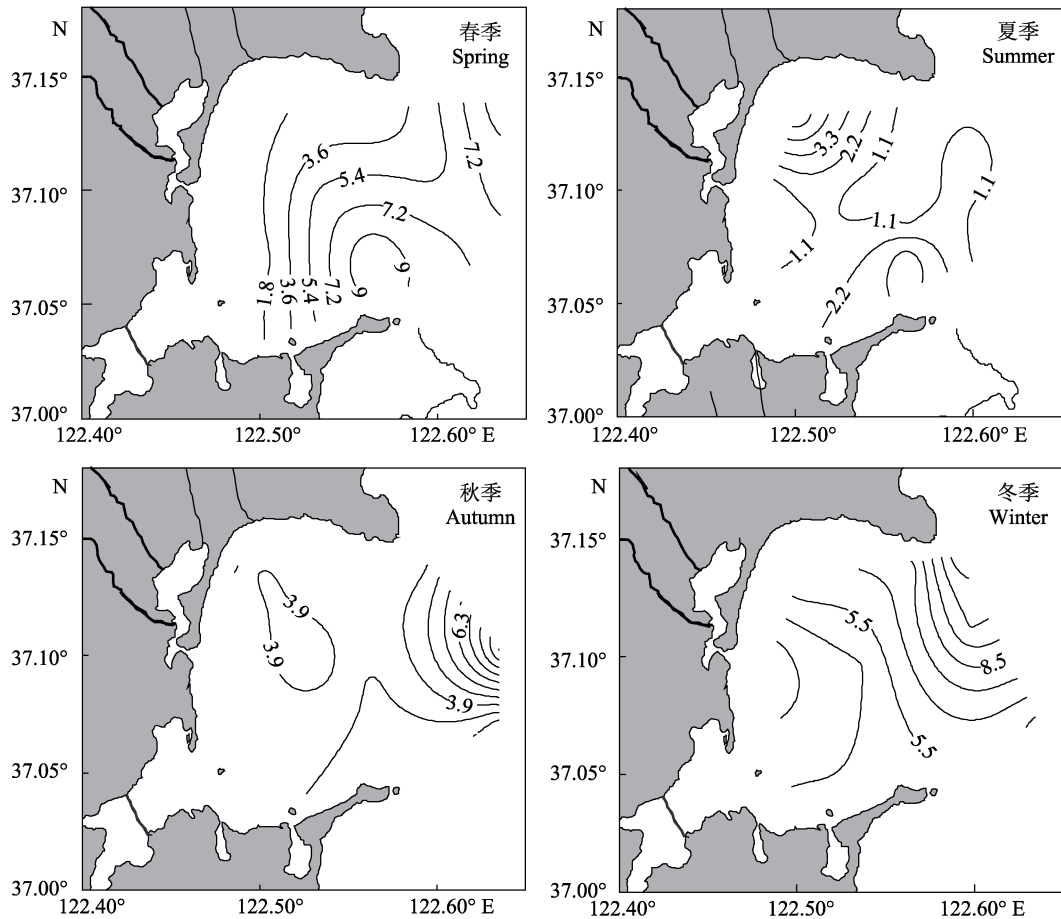


图 2 桑沟湾浮游植物细胞数量丰度($\times 10^3$ 个/L)分布的季节变化
Fig.2 Seasonal variation of the abundance of phytoplankton cells ($\times 10^3$ cells/L) in Sanggou Bay

间, 平均值为 1.70×10^3 个/L, 共发现 20 种藻类, 其中, 硅藻占 99.8%, 蓝藻占 0.2%, 旋链角毛藻

(*Chaetoceros curvisetus*) 是主要优势种, 占 38.5% 的数量。夏季出现 2 个浮游植物高值区, 其中一个与春季

位置相似,出现在湾内东南区,另一个出现在湾西北区,丰度从这2个区域向湾中部和湾外递减。

秋季浮游植物细胞丰度在 $1.5 \times 10^3 \sim 9.8 \times 10^3$ 个/L 之间,平均值为 3.87×10^3 个/L,共发现 29 种藻类,硅藻占 96.9%,蓝藻占 2.7%,具槽帕拉藻为主要优势种,占 41.9% 的数量。秋季丰度高值区在湾外外海区,丰度自冬向西逐渐递减。

冬季浮游植物细胞丰度在 $2.8 \times 10^3 \sim 12.2 \times 10^3$ 个/L 之间,平均值为 6.69×10^3 个/L,共发现 29 种藻类,其中,硅藻占 89.0%,蓝藻占 7.1%,绿藻占 3.7%,具槽帕拉藻为主要优势种,占 58.1% 的数量,除去具槽

帕拉藻的浮游植物丰度在 $0.7 \times 10^3 \sim 6.4 \times 10^3$ 个/L 之间。冬季丰度高值区出现在湾外东北侧外海区,丰度向湾内逐渐递减。

2.2.3 浮游植物的物种多样性 桑沟湾水域年平均浮游植物多样性指数为 1.01。如图 3 所示,春季多样性指数在 0.29~1.55 之间,平均值为 0.69,自西北向东南方向递减;夏季多样性指数在 0.35~1.48 之间,平均值为 1.03,自西向东递减;秋季多样性指数在 0.89~1.90 之间,平均值为 1.35,自西南向东北递减;冬季多样性指数在 0.47~1.53 之间,平均值为 0.96,自西南向东北递减。

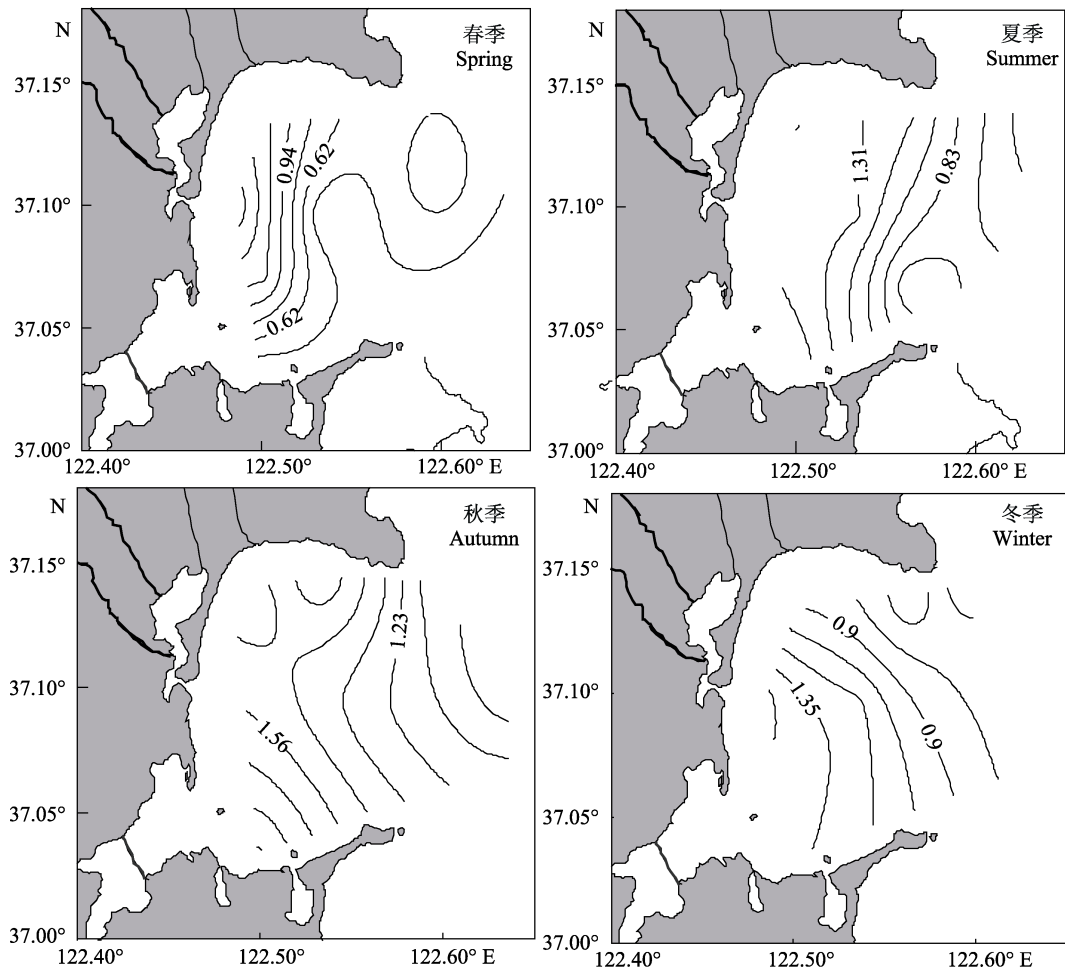


图 3 桑沟湾浮游植物多样性指数(香浓-威纳指数)季节分布

Fig.3 Seasonal distribution of phytoplankton diversity index (Shannon-Wiener index) in Sanggou Bay

均匀度指数在 0~1 之间时, J 值大,体现种间个体数分布较均匀, J 值小则反映种间个体数分布欠均匀。如果采样点种间个体数分布的差别大,则 J 值偏低。桑沟湾海域浮游植物的年平均均匀度指数为 0.59。如图 4 所示,春季均匀度指数在 0.19~0.68 之间,平均值为 0.42,自西北向东南递减;夏季均匀度指数在 0.44~1.00 之间,平均值为 0.70,自西向东递

减;秋季均匀度指数在 0.41~0.87 之间,平均值为 0.71,自湾西部、南部向东部、北部递减;冬季均匀度指数在 0.27~0.86 之间,平均值为 0.53,自西南向东北递减。

2.3 浮游植物群落与环境因子相关性

由表 3 可以看出,各个季节影响浮游植物丰度的

因素不同, 春季浮游植物丰度与水温、盐度、pH 等呈现较强负相关。夏季与溶解氧呈负相关, 与磷酸盐呈较强正相关, 秋季未表现出与某一因子有较强相关性, 而冬季则与亚硝态氮呈较强负相关。同时发现,

各个季节浮游植物丰度与氨氮都呈现负相关, 除秋季外, 浮游植物与磷酸盐皆呈正相关, 其中夏季有很强的相关性($P < 0.01$)。并且, 除夏季外, 浮游植物群落丰度都与透明度呈负相关。

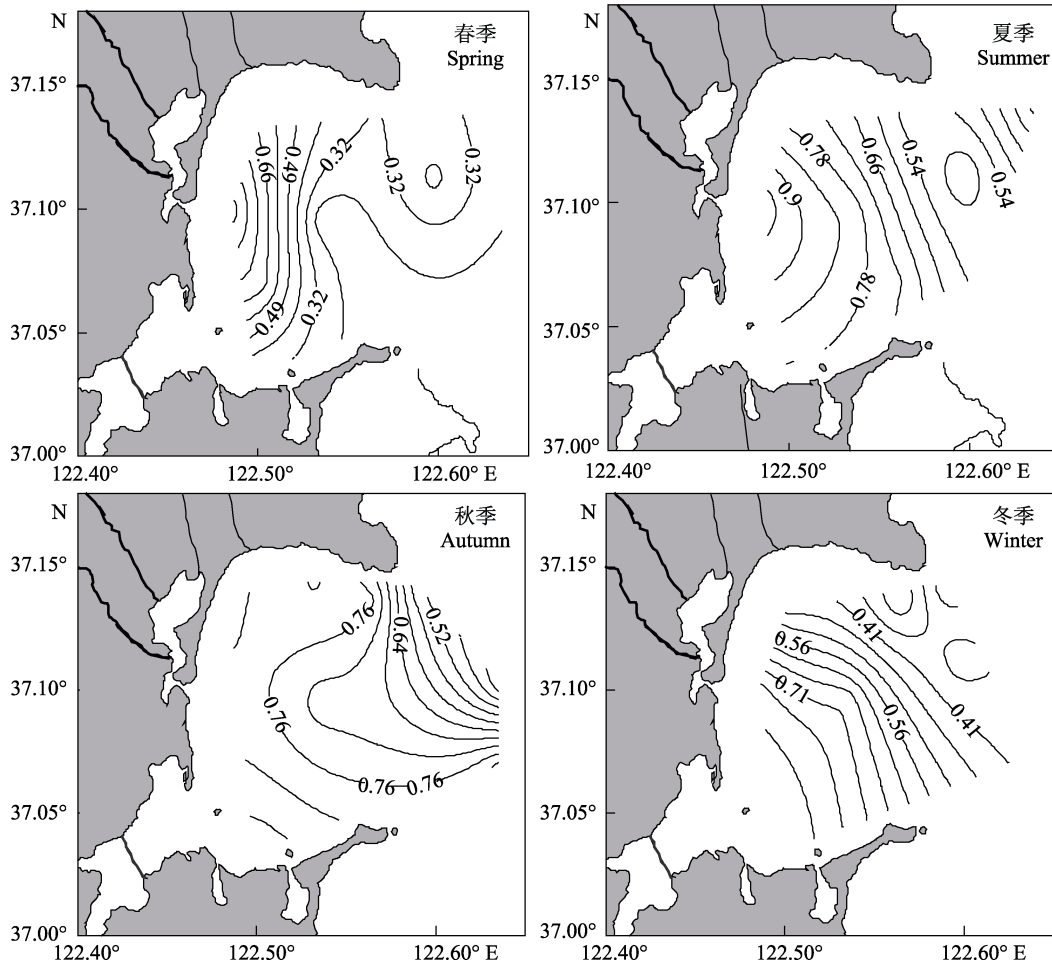


图 4 桑沟湾浮游植物均匀度指数(Pielou 指数)季节分布

Fig.4 Seasonal distribution of phytoplankton evenness index (Pielou index) in Sanggou Bay

表 3 浮游植物丰度与环境因子的相关性

Tab.3 Pearson correlation between the phytoplankton cell abundance and environmental factors

环境因子 Environmental factors	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn		冬季 Winter	
	R^2	P	R^2	P	R^2	P	R^2	P
水温 T	-0.637*	0.048	0.473	0.168	-0.259	0.470	0.315	0.447
透明度 SD	-0.508	0.134	0.410	0.239	-0.198	0.583	-0.642	0.086
盐度 $Salinity$	-0.648*	0.043	-0.548	0.101	0.264	0.527	0.476	0.233
溶解氧 DO	-	-	-0.649*	0.042	0.367	0.297	-0.594	0.121
pH	-0.847**	0.002	-0.423	0.223	0.616	0.058	-0.313	0.450
$NO_2^- - N$	0.278	0.437	0.000	0.999	-0.427	0.219	-0.700	0.053
$NO_3^- - N$	0.188	0.602	-0.269	0.453	-0.167	0.645	0.206	0.625
$NH_4^+ - N$	-0.134	0.712	-0.351	0.320	-0.157	0.665	-0.235	0.575
$PO_4^{3-} - P$	0.437	0.206	0.895**	0.001	-0.236	0.512	0.066	0.877

注: * $P < 0.05$ 差异显著; ** $P < 0.01$ 差异极显著

Note: * $P < 0.05$, significant difference; ** $P < 0.01$, highly significant difference

3 讨论

3.1 海区营养盐结构及年际变化特点

水体中,营养盐的浓度和结构影响着浮游植物的群落结构。浮游植物的氮限制浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 磷限制浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ (Dortch *et al.*, 1992), 此外, 常用氮磷比来判断浮游植物的营养限制因子, 氮磷原子比为 $16:1$, 即与微藻细胞氮磷比一致时, 微藻能均衡发展(Redfield *et al.*, 1963), 当比值显著小于 $16:1$ 时, 氮为限制因子, 反之磷为限制因子。

通过对桑沟湾历年氮磷浓度和结构长期观测(表 4), 可以发现, 历年无机氮浓度春季较低, 秋季

最高。除个别季节外, 桑沟湾氮磷比均 >16 , 无机氮浓度均高于氮限制浓度, 而较多季节磷酸盐浓度低于或接近磷限制浓度。本次调查也符合近年来氮磷变化特点, 2017~2018 年各站位无机氮在 $3.30\sim 20.36 \mu\text{mol/L}$ 之间, 浓度均高于限制浓度, 而无机磷浓度在 $0.01\sim 0.97 \mu\text{mol/L}$ 之间, 全年平均值为 $0.25 \mu\text{mol/L}$, 有较多区域浓度接近限制浓度。各季节氮磷比平均值在 $19.66\sim 87.34$ 之间, 除春季极个别站位外, 比值均 >16 。相关性分析(表 3)显示, 各个季节浮游植物丰度与氮氨都呈负相关, 除秋季外, 浮游植物与磷酸盐皆呈正相关。可以看出, 磷酸盐是桑沟湾浮游植物生长的主要限制营养盐, 这也符合黄海初级生产力在一定程度上受到磷限制这一现象(金杰, 2014)。

表 4 桑沟湾氮磷浓度和结构的长期观测数据

Tab.4 Long-term observation data of nitrogen and phosphorus concentration and structure in Sanggou Bay

调查时间 Investigation time	溶解无机氮 DIN($\mu\text{mol/L}$)				磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{mol/L}$)				氮磷比 N/P				参考文献 Reference
	春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter	春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter	春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter	
1994	3.39	5.87	20.48	2.81	0.24	0.19	0.54	0.48	14.10	30.90	37.90	5.90	宋云利等(1996)
1997	3.96	7.21	20.43	10.01	-	-	-	-	-	-	-	-	连岩等(1998)
2003~2004	4.85	16.83	22.59	6.73	0.11	0.24	0.31	0.26	44.10	70.10	72.90	26.90	孙丕喜等(2007)
2006~2007	3.08	7.97	15.84	11.38	0.24	0.18	0.88	0.60	15.71	76.99	19.03	21.78	张继红等(2010)
	3.86	9.06	14.4	9.17	0.09	0.12	0.68	0.32	55.00	105	21.70	27.20	孙珊等(2010)
2013~2014	5.57	3.19	13.8	8.02	0.31	0.13	0.58	0.33	19	32	24	33	李瑞环(2014)
2014~2015	8.75	9.02	13.35	8.33	0.41	0.42	0.70	0.59	27.37	28.41	20.42	18.28	徐东会等(2017)
2017~2018	4.35	8.80	13.59	11.52	0.26	0.13	0.21	0.38	19.66	75.36	87.34	47.93	本研究 This study

桑沟湾的海带养殖对营养盐, 尤其是无机氮, 有着重要的影响。春季水温回升, 光照增强, 海带进入快速生长期, 海带有较强的无机氮吸收能力(毛玉泽等, 2018), 能够在春季大量吸收无机氮(武晋宣, 2005)。秋季海带已完全收获, 海水中无机氮受到的移除作用大大降低, 进而导致秋季无机氮浓度最大, 并且由于外海营养盐补充是桑沟湾内无机氮营养盐的主要来源, 桑沟湾全年通过与黄海的水交换获得的无机氮占营养盐总收入量的 33.6% , 在整个海带生长期, 外海对桑沟湾无机氮的补充更是占全年外海补充的 87.2% (史洁等, 2010), 持续的无机氮输入使得其浓度始终高于限制浓度。

3.2 浮游植物群落结构的年度变化特点与潜在成因

通常来说, 群落中的一种或几种种类优势越明显, 则群落结构越简单, 物种多样性越低, 群落稳定性也越低。历史资料显示, 桑沟湾浮游植物群落物种

数具有明显变化(表 5), 从 20 世纪 80 年代至今, 桑沟湾海区浮游植物的物种数、多样性指数都有较明显的递减趋势, 与 1983~1984 年相比, 浮游植物物种数下降了约 71.8% 。

桑沟湾多年来开展的大规模海水养殖活动是导致出现这一现象的原因之一。自 20 世纪 80 年代发展至今, 养殖面积已占水域面积的 $70\%\sim 80\%$ (傅明珠等, 2013), 主要养殖物种海带、长牡蛎和栉孔扇贝的年产量分别为 84500 、 60000 和 15000 t (Jiang *et al.*, 2015), 桑沟湾养殖生态系统受到中等程度的压力, 其中, 较高的养殖密度、较大的养殖面积是重要影响因素(傅明珠等, 2013)。

在滤食性贝类区, 浮游植物的群落结构受滤食性贝类摄食作用的下行控制效应和营养盐等因素的上行控制效应影响。一方面, 滤食性贝类有着很强的滤水能力, 局部高密度养殖的滤食性贝类的摄食作用会对浮游植物的数量造成压制, 本研究发现, 浮游植物

表5 桑沟湾浮游植物物种组成长期变化

Tab.5 Long-term changes of the species composition of phytoplankton in Sanggou Bay

调查时间 Investigation time	浮游植物种类组成 Phytoplankton species composition				Shannon 多样性指数 Shannon's diversity index		参考文献 Reference
	总数 Total	硅藻 Diatom	甲藻 Dinoflagellate	其他 Others	范围 Range	平均值 Mean	
1983~1984	181	145	34	2	—	1.71	毛兴华等(1988)
1989~1990	118	103	14	1	—	2.10	宋洪军等(2007)
1999~2000	148	117	25	6	—	1.98	宋洪军等(2007)
2003~2004	75	65	9	1	—	1.58	宋洪军等(2007)
2006~2007	92	74	11	7	1.91~2.74	—	李超伦等(2010)
2015.5	70	60	7	3	0.49~2.31	1.21	钱罡等(2017)
2017~2018	51	43	4	5	0.30~1.92	1.01	本研究 This study

丰度均值的最高值出现在滤食性贝类摄食能力低的冬季;除夏季外,浮游植物丰度的高值区均出现在非贝类养殖区,这些现象都印证了以上观点。另一方面,贝类的代谢产物带来的营养物质又会促进浮游植物的生长(Asmus *et al.*, 1991; 王俊等, 2001; 董双林等, 1999), 刺激初级生产。董双林等(1999)指出, 放养适量的滤食性贝类以维持一定的浮游植物数量对保持养殖水体的良好水质是必要的, 并且初级生产力的升与降取决于放养的密度和环境因子。已有研究表明, 目前, 桑沟湾牡蛎养殖区的养殖密度已超过生态容量(Gao *et al.*, 2020), 加之桑沟湾的养殖规划尚存在不合理的情况, 局部区域养殖密度过高, 超出养殖容量的现象仍然存在。在这样规模化、超容量养殖条件下, 滤食性贝类摄食作用的下行控制效应占主导地位, 使得浮游植物群落结构难以尽快恢复。由此开展养殖容量的研究, 控制合理的养殖密度, 是防止此类现象发生的有效途径。

浮游植物现存量是滤食性贝类养殖容量评估的重要参数之一。目前, 对于浮游植物种类、营养盐等水环境信息的获取手段主要依赖于大面航次调查、传统显微镜分类等, 数据的同步性、客观性和精确性存在局限, 随着科技手段的不断进步, 开展基于藻细胞形态的浮游植物显微图像自动识别、荧光光谱识别等技术的实时、连续、多站位同步观测将是下一步的重点工作方向。

参 考 文 献

- Asmus RM, Asmus H. Mussel beds: Limiting or promoting phytoplankton? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991, 148(2): 215–232
- Dong SL, Wang F, Wang J, *et al.* Effects of bay scallop on plankton and water quality of mariculture pond. *Acta Oceanologica Sinica*, 1999, 21(6): 138–144 [董双林, 王芳, 王俊, 等. 海湾扇贝对海水池塘浮游生物和水质的影响. *海洋学报*, 1999, 21(6): 138–144]
- Dortch Q, Whitley TE. Does nitrogen or silicon limit phytoplankton production in the Mississippi River plume and nearby regions? *Continental Shelf Research*, 1992, 12(11): 1293–1309
- Fang J, Zhang J, Xiao T, *et al.* Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Sanggou Bay, China. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016, 8: 201–205
- Fu MZ, Pu XM, Wang ZL, *et al.* Integrated assessment of mariculture ecosystem health in Sanggou Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(1): 238–248 [傅明珠, 蒲新明, 王宗灵, 等. 桑沟湾养殖生态系统健康综合评价. *生态学报*, 2013, 33(1): 238–248]
- Gao YP, Fang JG, Lin F, *et al.* Simulation of oyster ecological carrying capacity in Sanggou Bay in the ecosystem context. *Aquaculture International*, 2020, 28(5): 2059–2079
- Hao LH, Sun PX, Hao JM, *et al.* The spatial and temporal distribution of chlorophyll-*a* and its influencing factors in Sanggou Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(2): 338–345 [郝林华, 孙丕喜, 郝建民, 等. 桑沟湾海域叶绿素 *a* 的时空分布特征及其影响因素研究. *生态环境学报*, 2012, 21(2): 338–345]
- Jiang ZJ, Li J, Qiao X, *et al.* The budget of dissolved inorganic carbon in the shellfish and seaweed integrated mariculture area of Sanggou Bay, Shandong, China. *Aquaculture*, 2015, 446: 167–174
- Jin J. Response of phytoplankton to phosphorus and nutrient dynamics in the typical marginal seas. Doctoral Dissertation of Ocean university of China, 2014 [金杰. 典型海域浮游植物对磷的响应及营养盐动力学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014]
- Li CL, Zhang YS, Sun S, *et al.* Phytoplankton species composition, quantity distribution and seasonal variation in the Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4):

- 1-8 [李超伦, 张永山, 孙松, 等. 桑沟湾浮游植物种类组成、数量分布及其季节变化. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 1-8]
- Li RH. Nutrient dynamics under the impact of eco-aquaculture—A case study in Sanggou Bay. Doctoral Dissertation 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. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014]
- Lian Y, Wang LC. An investigation on chemistry of seawater of Sanggou Bay. *Advances in Marine Science*, 1998(3): 60-66 [连岩, 王立超. 桑沟湾海水化学调查. 海洋科学进展, 1998(3): 60-66]
- Liu H, Fang JG, Dong SL, *et al.* Study on phytoplankton in raft-culture areas of Laizhou Bay and Sanggou Bay II. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(3): 20-28 [刘慧, 方建光, 董双林, 等. 莱州湾和桑沟湾养殖海区浮游植物的研究 II. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 20-28]
- Mao XH, Zhang WX, Zhang JZ, *et al.* A comprehensive investigation and study on the culture environment of the Sanggou Bay. Qingdao: Qingdao Press, 1988 [毛兴华, 张为先, 张建中, 等. 桑沟湾增养殖环境综合调查研究. 青岛: 青岛出版社, 1988]
- Mao YZ, Li JQ, Xue SY, *et al.* Ecological functions of the kelp *Saccharina japonica* in intergrated multi-trophic aquaculture, Sanggou Bay, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(9): 242-249 [毛玉泽, 李加琦, 薛素燕, 等. 海带养殖在桑沟湾多营养层次综合养殖系统中的生态功能. 生态学报, 2018, 38(9): 242-249]
- Qian G, Wei YQ, Sun J. Study on phytoplankton communities in the Sanggou Bay in spring, 2015. *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 44-52 [钱罡, 魏玉秋, 孙军. 2015年春季桑沟湾浮游植物群落研究. 海洋科学, 2017, 41(2): 44-52]
- Redfield AC, Ketchum BH, Richard FA. The influence of organism on the composition of seawater in the sea. *John Wiley*, 1963(2): 26-77
- Shi J, Wei H, Zhao L, *et al.* Study on ecosystem model of multi-species culture in Sanggou Bay: II Simulation of ecosystem and the circulation of nutrients. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 38-44 [史洁, 魏皓, 赵亮, 等. 桑沟湾多元养殖生态模型研究: II 生态环境模拟与生源要素循环. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 38-44]
- Song HJ, Li RX, Wang ZL, *et al.* The interannual variation of phytoplankton diversity in Sanggou Bay. *Advances in Marine Science*, 2007, 25(3): 332-339 [宋洪军, 李瑞香, 王宗灵, 等. 桑沟湾浮游植物多样性年际变化. 海洋科学进展, 2007, 25(3): 332-339]
- Song YL, Cui Y, Sun Y, *et al.* Study on nutrient state and influencing factors in Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 41-51 [宋云利, 崔毅, 孙耀, 等. 桑沟湾养殖海域营养状况及其影响因素分析. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 41-51]
- Sun PX, Zhang ZH, Hao LH, *et al.* Analysis of nutrients distribution and potential eutro-phication in seawater of bay. *Advances in Marine Science*, 2007, 25(4): 436-445 [孙丕喜, 张朝晖, 郝林华, 等. 桑沟湾海水中营养盐分布及潜在性富营养化分析. 海洋科学进展, 2007, 25(4): 436-445]
- Sun S, Liu SM, Ren JL, *et al.* Distribution features of nutrients and flux across the sediment-waterinterface in the Sanggou Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 32(6): 108-117 [孙珊, 刘素美, 任景玲, 等. 桑沟湾养殖海域营养盐和沉积物-水界面扩散通量研究. 海洋学报, 2010, 32(6): 108-117]
- Wang J, Jiang ZH, Dong SL. Role of filter-feeding bivalves in proliferation of phytoplankton community. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(5): 765-768 [王俊, 姜祖辉, 董双林. 滤食性贝类对浮游植物群落增殖作用的研究. 应用生态学报, 2001, 12(5): 765-768]
- Wang XM. Studies on phytoplankton community under integrated multi-trophic aquaculture modes in Sanggou Bay, 2017. Master's Thesis of Jinan University, 2017 [王晓敏. 桑沟湾多营养级综合养殖模式下浮游植物群落结构研究. 暨南大学硕士学位论文, 2017]
- Wu JX. Development and applications of dynamic model for dissolved nitrogen and phosphate budgets in Sungo Bay. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2005 [武晋宣. 桑沟湾养殖海域氮、磷收支及环境容量模型. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2005]
- 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 JH, Jiang ZJ, Wang W, *et al.* Seasonal distribution and variation of nutrients and nutrients limitation in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 16-25 [张继红, 蒋增杰, 王巍, 等. 桑沟湾营养盐时空分布及营养盐限制分析. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 16-25]

(编辑 冯小花)

Temporal and Spatial Variation in Phytoplankton Community Structure and Their Relationship with Environmental Factors in Sanggou Bay

HOU Xing^{1,2}, GAO Yaping², DU Meirong², JIANG Weiwei², LI Fengxue², DONG Shipeng^{1,2},
LI Wenhao^{1,2}, MENG Shan^{1,2}, WANG Junwei⁴, ZHANG Yitao⁴, JIANG Zengjie^{2,3①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Rongcheng Chudao Aquaculture Corporation, Rongcheng 264312)

Abstract In order to better understand the temporal and spatial variation in characteristics of phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in Sanggou Bay, four seasonal cruises were carried out at 21 sites in April (spring), July (summer) and November (autumn) 2017 and in January 2018 (winter). Analysis identified 51 species from 31 phytoplankton genera in the surveyed area. Among these, 43 species were from 24 genera of diatoms, 4 species from 3 genera of dinoflagellates, 2 species from 2 genera of Chlorophyta, and 1 species of Cyanophyta. Seasonal analysis showed that there were 22 species in spring, 20 species in summer, 23 species in autumn, and 20 species in winter. The dominance index showed that diatoms comprised the dominant species, and that *Paralia sulcata* was the dominant species throughout the year, with percentages ranging between 18.6% and 84.9%. The abundance of phytoplankton cells ranged from 0.16×10^3 cells/L to 12.2×10^3 cells/L (winter > spring > autumn > summer). The species diversity index (Shannon-Wiener index) varied from 0.69 to 1.35 (autumn > summer > winter > spring). The species evenness index J (Pielou) ranged from 0.42 to 0.70. Phosphate is the main limiting nutrient for phytoplankton growth in Sanggou Bay. The results reveal the spatial and temporal variation characteristics of phytoplankton community in a typical large-scale mariculture bay and provide the basic data for in depth understanding of the structure and function of the mariculture ecosystem.

Key words Phytoplankton; Community structure; Inorganic nutrients; Filter-feeding bivalves; Sanggou Bay

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200202003

http://www.yykxjz.cn/

吴斌, 王伟萍, 贺刚, 王海华. 不同模拟情景下长江江豚种群生存力分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 28–35

Wu B, Wang WP, He G, Wang HH. Analysis of population viability analysis of Yangtze finless porpoise in different simulated scenarios. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 28–35

不同模拟情景下长江江豚种群生存力分析*

吴斌 王伟萍 贺刚 王海华^①

(江西省水产科学研究所 南昌 330039)

摘要 为了探讨长江江豚(*Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis*)种群的生存动态和管护对策,本研究利用漩涡模型(Vortex 10.3.7.0)对长江江豚种群生存力进行了回顾和现状分析。结果发现,以 1999 年作为回顾分析起点,长江江豚的灭绝概率最可能为 0.0754,且不低于 0.5629。平均灭绝时间最可能为 93.5 年,且不少于 87.9 年。以 2017 年作为现状分析起点,长江江豚种群灭绝概率为 0.3551~0.6985,平均灭绝时间为 83.5~88.0 年。在特定情景下,设定新生幼豚雄性所占比例分别为 0.55、0.50 和 0.45,经模拟计算得出,雄性化让灭绝概率由 0.6985 增加到 0.9157,雌性化使其下降到 0.3664。同时,数据比较发现,新生幼豚雄性所占比例下降 10%,成年雌豚生殖率提高 10%,二者最终效果相当。上述研究结果表明,长江江豚种群生存风险较大,需重点保护,修复其生境,尤其是母子豚相关生境有利于长江江豚的保护。

关键词 长江江豚; 种群生存力; 漩涡模型; 死亡率; 生殖率

中图分类号 Q145.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0028-08

种群生存力分析(Population viability analysis, PVA)是以物种生活史信息为参数,运用计算机模型来估计濒危物种种群未来大小和灭绝风险的一种方法,多用于模拟孤立小种群的生存动态过程,可以预测种群数量变化和灭绝概率(Brook *et al.*, 2000a、b)。应用这一理论,发展了许多计算机应用程序,包括 RAMAS(Ferson *et al.*, 1989)、NEMESIS(Gilpin, 1993)、ALEX(Possingham *et al.*, 1992)和 Vortex (Lacy *et al.*, 1993)等,其中, Vortex 模型(漩涡模型)应用最为广泛。国内学者已经利用该模型对白鳍豚(*Lipotes vexillifer*) (张先锋等, 1994)、长江江豚(*Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis*) (张先锋等, 1999)、普氏野马(*Equus przewalskii*) (裴鹏祖等, 2018)、川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*) (张宇等, 2018)、猕猴(*Macaca mulatta*) (楚原梦冉等, 2019)等种群动态进行模拟和研

究。张先锋等(1999)采用漩涡模型(Vortex 7.3)模拟长江江豚的种群生存力,预测了长江江豚未来的种群动态。20 年来,长江江豚种群结构发生了新变化,种群生态学研究也取得了新成果(杨健等, 2000; 于道平等, 2005; 张新桥, 2011; Kimura *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2014、2017; Zhou *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2018),有必要对长江江豚种群生存状况进行再评估和再认识。为此,本研究利用漩涡模型(Vortex 10.3.7.0)对长江江豚种群生存力及其致危因素进行分析,以期对未来种群管理和有效保护提供有益参考。

1 种群生存力分析的种群参数及其估计

1.1 种群描述

长时间以来,长江和海洋江豚的分类关系一直存

* 国家自然科学基金(31972795)和“社会化参与拯救长江江豚”豚越计划项目共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31972795), and “Social Participation in Saving the Yangtze Finless Porpoise” of the Tunyue Project]. 吴斌, E-mail: wubinix@163.com

^① 通讯作者: 王海华, 研究员, E-mail: haihuawang998@sina.com

收稿日期: 2020-02-02, 收修改稿日期: 2020-02-27

在争议, 曾被认为是同一个物种(3 个亚种), 后被认定为 2 个物种: 以台湾海峡为界, 以南海域是印太江豚; 以北海域包括长江流域为窄脊江豚(*Neophocaena asiaorientalis*)。2 种江豚形态上区分的显著特点是其脊背宽窄和疣粒数量多少。长江江豚是江豚的最濒危的一个亚种, 仅生活在长江中下游干流和大型通江湖泊—鄱阳湖和洞庭湖中。但目前基于江豚种群基因组学最新研究结果显示, 极度濒危的长江江豚种群应被作为一个独立的物种(Zhou *et al*, 2018)。长江江豚不仅是全世界唯一生存于淡水环境的鼠海豚科(Phocaeidae)动物, 也是长江流域极可能唯一现存的水生哺乳动物(2007 年白鬃豚功能性灭绝)。自上世纪九十年代以来, 长江江豚的数量呈现出持续性的衰减趋势, 2018 年 7 月正式发布《2017 长江江豚生态科学考察报告》, 这也是目前最新的长江江豚科考成果。江豚种群数量大幅下降的趋势得到遏制, 估算长江江豚数量约为 1012 头, 其中, 鄱阳湖约为 457 头, 是野外江豚分布密度最高的区域。长江江豚发生了一些新变化, 种群趋于向受人为扰动较少的江段集中, 过半数水域种群持续下降或没有发现种群, 种群分布呈碎片化特征(先义杰, 2018)。因其受威胁的严峻程度, 长江江豚已被按照国家一级保护动物进行保护。2018 年, 中国科学院深海科学与工程研究所海洋哺乳动物研究团队对长江江豚进行了全基因组测序, 组装得到了 2.22 Gb 的基因组草图, 对江豚基因组的研究奠定了基础(Yuan *et al*, 2018)。

本研究以 1999 年作为回顾分析的起点, 2017 年作为模拟验证时间节点和现状分析的起点, 进行长江江豚种群生存力分析。为进一步提升精度和可信度, 将迭代次数设定为 10000, 为前人同类研究的 10 倍。MVP 定义为以 95% 的概率健康存活 100 年所需的最小种群数量。估算方法为: 分析不同初始种群数量(N_i) 在 100 年内的种群生存力, 当种群存活概率达到 95% 时的 N_i 即为 MVP(Lacy *et al*, 2009、2017)。

1.2 迁移扩散

长江江豚与海江豚之间存在着显著而稳定的遗传分化, 提示它们之间缺乏基因交流而出现了生殖隔离, 长江江豚因此被认定为独立物种, 长江江豚和海江豚最明显的差别是一个生活在淡水, 另一个生活在咸水。通过大数据分析, 发现长江江豚和海江豚在进化上显著不同, 特别是基因上体现对水环境的适应性差异, 表明了长江江豚和其他江豚之间, 已经不可能出现基因交流和种群间混合, 因此, 不存在迁移扩散问题(Zhou *et al*, 2018)。

1.3 种群繁殖参数

长江江豚为混交制, 雌性可能先于雄性性成熟, 雌性首次生育为 4~6 龄, 雄性为 4.5~7 龄(郝玉江等, 2006)。Shirakihara 等(1993)发现, 2 头 21 龄和 23 龄的个体可以怀孕和哺乳。长江江豚无论野外还是人工环境下均无产双胞胎记录, 因此, 在模拟中设定每胎最大产仔数为 1。长江江豚新生婴豚的性比为 1:1, 雌性首次生育年龄为 4 龄, 雄性为 5 龄, 最高繁殖年龄约为 20 龄。该物种的种群增长应为密度制约型, 即参加繁殖的雌性数占全部成年雌性数的比例 [$P(N)$] 随种群大小 (N) 的变化而变化。Fowler(1981)认为, 描述这种变化强度的参数 B 取值 2 能更好地模拟密度制约型种群的增长, 描述雌性交配率降低的参数 A 取值也为 2。假设 N 接近环境容纳量 K 时, 繁殖雌性的比例 $P(K)$ 为 25%; 当 N 接近 0 时, $P(0)$ 为 70%(张先锋等, 1999)。

1.4 繁殖率

张先锋等(1992)研究指出, 长江江豚繁殖周期一般为 2 年, 年生殖率为 20%。2020 年 1 月公开报道显示, 湖北石首天鹅洲迁地保护区内, 江豚种群 5 年内净增长 108%。因此, 推测对仍处于种群数量下降趋势的长江江豚来说, 目前可能的繁殖率只相当于其理论值的一半左右, 即成年雌豚生殖率可能为 20%~25%。目前, 关于长江江豚流产率和幼豚夭折率及流产或幼豚夭折等对其繁殖周期的影响还不全面, 进一步深入研究有助于提升相关参数估算的精度。

1.5 死亡率

张先锋等(1999)研究发现, 长江江豚 0~1 和 1~2 年龄组的死亡率为 20%, 其他年龄组的死亡率为 15%。20 世纪 90 年代以来, 长江江豚种群下降速率每年约为 6.3%, 并推测幼体死亡率较高可能是决定其种群动态的重要因素(梅志刚等, 2011)。在模拟中设定 0~1 年龄组的死亡率为 20%~30%, 1~2 年龄组的死亡率为 20%, 其他年龄组为 15%。

1.6 灾害

张先锋等(1999)设置 2 种灾害类型, 发生频率为 10%, 以死亡率均值为存活率下降率(95%), 用成年雌性死亡率表示繁殖率下降率(95%)。2016 年, 习近平总书记在重庆召开推动长江经济带发展座谈会, 提出要把修复长江生态环境摆在压倒性位置, “共抓大保护、不搞大开发”。农业农村部发布《关于长江流

表 2 长江江豚种群生存力回顾分析结果
Tab.2 Results of the retrospective analysis on the survival ability of Yangtze finless porpoise populations

项目 Items	情景 1 Scenario 1	情景 2 Scenario 2	情景 3 Scenario 3	情景 4 Scenario 4	情景 5 Scenario 5	情景 6 Scenario 6	情景 7 Scenario 7	情景 8 Scenario 8
r	-0.0381	-0.0622	-0.0381	-0.0622	-0.0304	-0.0549	-0.0231	-0.0479
λ	0.9626	0.9397	0.9626	0.9397	0.9701	0.9466	0.9772	0.9532
R_o	0.7184	0.5747	0.7184	0.5747	0.7697	0.6158	0.8211	0.6568
平均世代雌性 Average generation female	8.68	8.90	8.68	8.90	8.61	8.84	8.55	8.77
平均世代雄性 Average generation male	9.53	9.73	9.53	9.73	9.47	9.67	9.41	9.61
N-extant±SD	40.30 ±35.44	8.20 ±6.08	40.57 ±34.86	8.22 ±6.51	86.84 ±70.77	11.74 ±9.73	184.16 ±139.75	17.72 ±15.71
N-all±SD	37.64 ±35.60	2.03 ±4.36	37.60 ±35.09	2.10 ±4.57	85.75 ±70.96	5.42 ±8.53	183.92 ±139.81	12.23 ±15.19
PE	0.0683	0.7828	0.0754	0.7746	0.0128	0.5629	0.0013	0.3232
GeneDiv±SD	0.8801 ±0.0829	0.6990 ±0.1455	0.8822 ±0.0803	0.6990 ±0.1411	0.9290 ±0.0533	0.7533 ±0.1282	0.9585 ±0.0301	0.8028 ±0.1132
平均 TE Mean TE	93.3	84.4	93.5	84.5	94.4	87.9	95.4	90.5
2017 年预测头数±SD Predicted value of 2017±SD	1021.36 ±260.19	662.07 ±178.28	1015.90 ±262.61	661.71 ±181.40	1167.91 ±304.61	756.99 ±206.54	1329.71 ±343.37	854.52 ±230.54

注: r : 内禀增长率; λ : 周限增长率; R_o : 净生殖率; N-extant: 平均现存种群数量; N-all: 平均种群数量; PE: 灭绝概率; GeneDiv: 遗传多样性; TE: 灭绝时间(年)。表 5 同

Note: r : Annual internal growth rate; λ : Finite rate of increase; R_o : Net reproduction rate; N-extant: Average number of existing populations; N-all: Average population number; PE: Extinction probability; GeneDiv: Genetic diversity; TE: Extinction time (years). Same in the Tab.5

1305 头, 具体结果见表 3。同理, 采取渐进逼近的方法发现, 情景 5 条件下, 满足 MVP 为 1305 头的最小环境容量为 2300 头。

2.3 不同模拟情景下长江江豚种群生存力现状分析

首先, 在回顾分析中情景 3 基础上, 以 2017 年作为现状分析的起点, 设置初始头数为 1012 头, 环境容纳量为 5000 头和 4000 头, 发现灭绝概率分别为 0.7012 和 0.6950。在情景 5 的基础上, 设定环境容纳量为 4000 头, 环境容纳量分别每年变动-1%、0%和 1%, 连续变动 10 年, 发现灭绝概率分别为 0.4635、0.4592 和 0.4588。随后, 环境容纳量设定为 4000 头, 每年增加 1%, 连续变动 10 年, 以 2017 年作为起点进行不同模拟情景的生存动态分析, 具体见表 4。长江江豚种群 100 年的内禀增长率 r 为 -0.0733~-0.0207, 周限增长率 λ 为 0.9293~0.9795, 净增值率

R_o 为 0.5235~0.8413, 平均世代雌性为 8.36~8.83 年, 雄性为 9.23~9.66 年, 平均现存种群数量 5.49±3.58~110.81±108.10 头, 平均种群数量为 0.11±0.80~107.91±108.10 头, 遗传多样性为 0.5801±0.1671~0.9169±0.0659。灭绝概率为 0.0264~0.9860, 平均首次灭绝时间为 68.4~91.9 年, 具体见表 5。

在现状分析情景 6 的基础, 设定性比雄性化、雌性化偏离 10%, 即雄性所占比例分别为 0.55、0.50 和 0.45, 模拟计算得出, 长江江豚种群 100 年的内禀增长率 r 分别为 -0.0608、-0.0493 和 -0.0386, 周限增长率 λ 分别为 0.9410、0.9519 和 0.9621, 净增值率 R_o 分别为 0.5889、0.6543 和 0.7198, 平均世代雌性分别为 8.71、8.61 和 8.51 年, 雄性分别为 9.56、9.46 和 9.37 年, 平均现存种群数量分别为 7.30±5.69、11.67±10.17 和 22.42±22.58 头, 平均种群数量分别为 0.76±2.66、3.75±7.66 和 14.42±20.39 头, 遗传多样性

表 3 特定情景下长江江豚种群 MVP 模拟分析
Tab.3 Simulation analysis of MVP of Yangtze finless porpoise population under specific scenarios

初始头数 Initial population size, N_i	1325	1320	1315	1310	1305
PE	0.0460	0.0484	0.0476	0.0540	0.0549

表4 长江江豚种群生存力现状分析的不同模拟情景

Tab.4 Different simulation scenarios for the analysis of the current viability of Yangtze finless porpoise population

项目 Items	情景1 Scenario 1	情景2 Scenario 2	情景3 Scenario 3	情景4 Scenario 4	情景5 Scenario 5	情景6 Scenario 6	情景7 Scenario 7	情景8 Scenario 8
0~1 龄组死亡率 Mortality in the 0~1 age group (%)	25	25	25	25	30	30	30	30
成年雌豚生殖率 Breeding rate of adult female (%)	20	25	27.5	30	20	25	27.5	30
初始头数 Initial population size, N_i	1012	1012	1012	1012	1012	1012	1012	1012
初始年份 Initial year	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017

表5 长江江豚种群生存力现状分析结果

Tab.5 Analysis results of current viability of finless porpoise population in the Yangtze River

项目 Items	情景1 Scenario 1	情景2 Scenario 2	情景3 Scenario 3	情景4 Scenario 4	情景5 Scenario 5	情景6 Scenario 6	情景7 Scenario 7	情景8 Scenario 8
r	-0.0660	-0.0416	-0.0308	-0.0207	-0.0733	-0.0493	-0.0386	-0.0287
λ	0.9361	0.9593	0.9697	0.9795	0.9293	0.9519	0.9621	0.9717
R_0	0.5609	0.7011	0.7712	0.8413	0.5235	0.6543	0.7198	0.7852
平均世代雌性 Average generation female	8.76	8.54	8.44	8.36	8.83	8.61	8.51	8.43
平均世代雄性 Average generation male	9.60	9.40	9.31	9.23	9.66	9.46	9.37	9.30
N-extant \pm SD	6.32 \pm 4.47	18.18 \pm 17.56	42.13 \pm 42.94	110.81 \pm 108.10	5.49 \pm 3.58	11.67 \pm 10.17	22.16 \pm 22.07	51.10 \pm 52.51
N-all \pm SD	0.34 \pm 1.58	10.08 \pm 15.65	35.83 \pm 42.24	107.91 \pm 108.10	0.11 \pm 0.80	3.75 \pm 7.66	14.50 \pm 20.52	45.58 \pm 51.98
PE	0.9589	0.4588	0.1523	0.0264	0.9860	0.6985	0.3551	0.1098
GeneDiv \pm SD	0.6113 \pm 0.1620	0.7745 \pm 0.1303	0.8532 \pm 0.1026	0.9169 \pm 0.0659	0.5801 \pm 0.1671	0.7191 \pm 0.1483	0.7976 \pm 0.1225	0.8677 \pm 0.0981
平均 TE Mean TE	73.4	87.1	89.8	91.9	68.4	83.5	88.0	90.2

分别为 0.6490 ± 0.1597 、 0.7191 ± 0.1483 和 0.7950 ± 0.1237 。灭绝概率为 0.9157、0.6985 和 0.3664，平均首次灭绝时间为 76.5、83.5 和 88.0 年。

3 讨论

本研究以 1999 年作为回顾分析的起点，2017 年为模拟验证时间节点，在综合分析历史文献资料以及最新研究成果的基础上，围绕环境容纳量、0~1 龄组死亡率、成年雌豚生殖率设定了回顾分析 8 种不同情景，长江江豚种群 100 年灭绝概率为 0.0013~0.7828，平均灭绝时间为 84.4~95.4 年。以 2017 年长江江豚数量约为 1012 头作为模拟验证来看，情景 2 和 4 与实际情况不吻合，情景 3 模拟结果与实际调查情况吻合度最好，情景 1 次之，情景 5 也较理想。情景 5 和 7 的种群存活概率达到 95% 以上。提示上述情景 3 中模拟参数与历史生境及长江江豚种群特性的契合度较好，在该情景下进行深入系统分析具有较强的理论和

实际价值。通过 Vortex 模拟计算可知，环境容纳量为 5000 头和 4000 头，发现灭绝概率分别为 0.7012 和 0.6950。进一步设定环境容纳量为 4000 头，环境容纳量分别每年变动 -1%、0% 和 1%，连续变动 10 年，发现灭绝概率分别为 0.4635、0.4592 和 0.4588，提示环境容纳量小范围变动对长江江豚种群生存力影响不大。从回顾分析结果来看，长江江豚的灭绝概率最可能为 0.0754，且不高于 0.5629。平均灭绝时间最可能为 93.5 年，且不少于 87.9 年。0~1 龄组死亡率最可能为 30% 左右，成年雌豚生殖率最可能为 25% 左右。杨光等(1998)研究指出，长江江豚 0~2 龄组死亡率为 0.308，繁殖率可高达 0.7。张先锋等(1999)研究发现，长江江豚 0~1 龄组的死亡率为 20%，年生殖率为 20%。因此，模拟计算确认的长江江豚 0~1 龄组死亡率最可能为 30% 左右，成年雌豚生殖率最可能为 25% 左右，在合理范围之内。通过进一步分析，不难发现，成年雌豚生殖率和 0~1 龄组死亡率与种群生存

力关系密切,模拟计算出,成年雌豚生殖率为 25%时,长江江豚 0~1 龄组死亡率由 30%分别下降为 25%和 20%时,灭绝概率由 0.0754 下降为 0.0128 和 0.0013。0~1 龄组死亡率为 30%时,成年雌豚生殖率由 25%下降为 20%时,灭绝概率由 0.0754 增高为 0.7746。因此,长江江豚种群所面临灭绝“漩涡”,直接原因应该是“一低一高”,即成年雌豚生殖率低,而 0~1 龄组死亡率高,但除了长江江豚自身生理生态以及进化演化适应方面的原因,长江江豚的生境干扰、破坏,特别是适合母子豚栖息、抚幼以及幼豚生长发育生境的数量减少和质量下降,导致其种群被动碎片化分布,个体水平可能有利于减小生存压力。但从种群水平来说,繁殖、遗传方面等风险加剧,“一低一高”现象持续恶化。另一方面,饵料鱼类资源下降,特别是渔汛等减少,捕食成本大幅提高,而长江江豚作为淡水水生哺乳动物,能量需求相对较大,特别是求偶、怀孕和哺乳等特定生理阶段,饵料相对不足,必将严重影响繁殖活动,并对幼仔生存带来巨大挑战,最终可能让长江江豚陷入种群灭绝“漩涡”。在回顾分析中,求取了情景 5,即最可能达到情景下的 MVP,为 1305 头,且满足该条件的最小环境容纳量为 2300 头。提示在进行长江江豚保护时,长江干流、鄱阳湖以及洞庭湖等水域在加强重点水域重点保护的同时,必须强化长江中下游水域大范围的“互联互通”,单一特定水域难以承载长江江豚的持续生存繁衍。

本研究中,从 0~1 龄组死亡率和成年雌豚生殖率的角度设定了 8 种不同模拟情景,环境容纳量设定为 4000 头,每年增加 1%,连续变动 10 年,以 2017 年作为现状分析的起点,从上述回顾分析的结果来看,现状分析中的情景 6 和情景 7 是最可能情景,即长江江豚种群灭绝概率可能为 0.3551~0.6985,平均灭绝时间可能为 83.5~88.0 年。而情景 1 和情景 5 是小概率情景,情景 2 和情景 3 是可能性较低情景,情景 4 和情景 8 是相对理想情景。长江江豚新生幼豚性比(雄性所占比例)对模拟结果具有较大影响,性比雄性化、雌性化偏离 10%,灭绝概率由 0.6985 分别增加为 0.9157 和下降为 0.3664。提示长江江豚新生幼豚性比研究对于长江江豚保护具有特别意义,通过比较相关数据,现状分析中情景 6 新生幼豚性比雌性化 10%,与情景 7 模拟结果相当,即在情景 6 时,新生幼豚性比雌性化 10%与成年雌豚生殖率提高 10%,效果是相当的,提示人为诱导甚至控制长江江豚新生幼豚性比可能是进行长江江豚抢救性保护的措施之一。当种群面临灭绝漩涡风险时,重点保护、修复母子豚栖息区等特定自然生境,缓解甚至逆转长江江豚成年雌豚生

殖率低,而 0~1 龄组死亡率高的现状,有利于长江江豚的保护,当然这需要对长江江豚生理生态学、行为生态学、繁殖生态学等进行深入而系统的研究。需要特别指出的是,我国实施伏季休渔制度已有 20 多年,在缓解捕捞对渔业资源带来的巨大压力和资源养护方面发挥了积极作用(胡芷君等, 2019),长江十年禁捕等战略性政策的落地,必将有效增加长江江豚饵料资源,对其保护意义重大。本文模型使用的参数是由系统整理前人长江江豚研究结果获得的,特别是繁殖率和最高繁殖年龄的设定是整体权衡的结果,单一参数可能存在较大误差,但参数组合误差相对较小,且本研究首次运用迭代 1 万次的方法进行相关模拟和估计,迭代次数为前人研究的 10 倍,一定程度上减小了系统误差,能够为长江江豚种群生存力分析及相关濒危机制探讨,特别是长江江豚种群的保护提供一定借鉴和管护依据。同时,有报道使用灰色预测模型,分析影响资源丰度变化因子,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,应用效果较好,提示多种模型协同应用可能是未来种群生存力分析的发展方向之一(闫永斌等, 2019)。

参 考 文 献

- Brook BW, Burgman M, Frankham R. Differences and congruencies between PVA packages: The importance of sex ratio for predictions of extinction risk. *Conservation Ecology*, 2000a, 4(1): 920
- Brook BW, O'Grady JJ, Chapman AP, *et al.* Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature*, 2000b, 404(6776): 385-387
- Chuyuan MR, Zan QJ, Yang Q, *et al.* Population dynamic and viability analysis of *Rhesus macaque (Macaca mulatta)* in Neilingding Nature Reserve, Guangdong Province. *Chinese Journal of Wildlife*, 2019, 2: 259-266 [楚原梦冉, 管启杰, 杨琼, 等. 广东内伶仃岛猕猴种群动态及种群生存力分析. *野生动物学报*, 2019, 2: 259-266]
- Ferson S, Ginzburg L, Silvers A. Extreme event risk analysis for age-structured populations. *Ecological Modelling*, 1989, 47(1-2): 175-187
- Fowler CW. Density dependence as related to life history strategy. *Ecology*, 1981, 62: 602-610
- Gaskin DE, Smith GJD, Watson AP, *et al.* Reproduction in the porpoise Phocoeridae: Implication for manayement. *Repint Whalcann*, 1984(S6): 135-148
- Gilpin M. NEMESIS. Version 1.0 users guide. *Conservation biology simulations: Process simulations of dynamics at the level of genes, individuals, populations and metapopulations.* Michael Gilpin, 1993, 419 W. Harrison, Bozeman, Montana 59715 USA

- Hao YJ, Wang D, Zhang XF. Review on breeding biology of Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*). *Acta Theriologica Sinica of China*, 2006, 26(2): 191–200 [郝玉江, 王丁, 张先锋. 长江江豚繁殖生物学研究概述. *兽类学报*, 2006, 26(2): 191–200]
- Hu ZJ, Shan XJ, Yang T, *et al.* Preliminary evaluation of summer fishing moratorium in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 13–21 [胡芷君, 单秀娟, 杨涛, 等. 渤海伏季休渔效果初步评价. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 13–21]
- Kasuya T, Kureha K. The population of finless porpoise in Inland Sea of Japan. *Scientific Reports of the Whales Research Institute Tokyo*, 1979, 31: 1–44
- Kimura S, Akamatsu T, Li SH, *et al.* Seasonal changes in the local distribution of Yangtze finless porpoises related to fish presence. *Marine Mammal Science*, 2012, 28(2): 308–324
- Lacy RC, Borbat M, Pollak JP. *Vortex: A stochastic simulation of the extinction process. Version 9.95.* Chicago Zoological Society. Brookfield, Illinois, USA, 2009
- Lacy RC, Pollak JP. *Vortex: A stochastic simulation of the extinction process. Version 10.2.14.* Chicago Zoological Society. Brookfield, Illinois, USA, 2017
- Lacy RC. *Vortex: A computer simulation model for population viability analysis.* *Wildlife Research*, 1993, 20: 45–65
- Mei ZG, Chen M, Li YT, *et al.* Habitat preference of the Yangtze finless porpoise in a minimally disturbed environment. *Ecological Modelling*, 2017, 353, 47–53
- Mei ZG, Hao YJ, Zheng JS, *et al.* Research progress on the decline mechanism of finless porpoises in the Yangtze River. *Chinese Life Sciences*, 2011, 5: 519–524 [梅志刚, 郝玉江, 郑劲松, 等. 长江江豚种群衰退机理研究进展. *生命科学*, 2011, 5: 519–524]
- Mei ZG, Zhang XQ, Huang SL, *et al.* The Yangtze finless porpoise: On an accelerating path to extinction? *Biological Conservation*, 2014, 172: 117–123
- O'Grady JJ, Brook BW, Reed DH, *et al.* Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological Conservation*, 2006, 133: 42–51
- Pei PZ, Wang L, Shao YP, *et al.* Re-introduced Przewalski's horses' breeding success and population viability analysis in Anxi National Nature Reserve. *Acta Theriologica Sinica of China*, 2018, 2: 128–138 [裴鹏祖, 王亮, 邵亚平, 等. 安西极旱荒漠国家级自然保护区重引入普氏野马繁殖成效与种群生存力分析. *兽类学报*, 2018, 2: 128–138]
- Possingham HP, Davies I, Noble IR, *et al.* A metapopulation simulation model for assessing the likelihood of plant and animal extinctions. *Mathematics and Computers in Simulation*, 1992, 33(5–6): 367–372
- Ralls K, Ballou JD, Templeton A. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology*, 1988, 2: 185–193
- Shirakihara M, Takemura A, Shirakihara K. Age, growth, and reproduction of the finless porpoise. *Nephocaena phocaenoides*, in the coastal waters of western Kyuhu, Japan. *Marine Mammal Science*, 1993, 9(4): 392–406
- Tian Y, Wu JG, Kou XJ, *et al.* Methods and applications of population viability analysis (PVA). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(11): 257–267 [田瑜, 邬建国, 寇晓军, 等. 种群生存力分析(PVA)的方法与应用. *应用生态学报*, 2011, 22(11): 257–267]
- Xian YJ. Ecological scientific investigation of Yangtze finless porpoise in 2017. *Man and the Biosphere*, 2018(5): 27 [先义杰. 2017年长江江豚生态科学考察. *人与生物圈*, 2018(5): 27]
- Yan YB, Chen XJ, Wang JT, *et al.* 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 [闫永斌, 陈新军, 汪金涛, 等. 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]
- Yang G, Zhou KY, Gao AL, *et al.* Study on life table and population dynamics of finless porpoises. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 18(1): 1–7 [杨光, 周开亚, 高安利, 等. 江豚生命表和种群动态的研究. *兽类学报*, 1998, 18(1): 1–7]
- Yang J, Xiao W, Kuang XA, *et al.* Studies on the distribution, population size and the active regularity of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides*. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2000, 9(4): 444–450 [杨健, 肖文, 匡兴安, 等. 洞庭湖、鄱阳湖白鱀豚和长江江豚的生态学研究. *长江流域资源与环境*, 2000, 9(4): 444–450]
- Yu DP, Wang J, Yang G, *et al.* Primary analysis on habitat selection of Yangtze finless porpoise in spring in the section between Hukou and Digang. *Acta Theriologica Sinica of China*, 2005, 25(3): 302–306 [于道平, 王江, 杨光, 等. 长江湖口至荻港段江豚春季对生境选择的初步分析. *兽类学报*, 2005, 25(3): 302–306]
- Yuan Y, Zhang PJ, Wang K, *et al.* Genome sequence of the freshwater Yangtze finless porpoise. *Genes*, 2018, 9: 213
- Zhang XF, Wang D, Wang KX. *Vortex* model and its application on the management of Chinese river dolphin (*Lipotes vexillifer*) population. *Chinese Biodiversity*, 1994, 2(3): 133–139 [张先锋, 王丁, 王克雄. 漩涡模型及其在白暨豚种群管理中的应用. *生物多样性*, 1994, 2(3): 133–139]
- Zhang XF, Wang KX. Viability analysis of finless porpoise populations in the Yangtze River. *Chinese Acta Ecologica Sinica*, 1999, 19(4): 529–533 [张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析. *生态学报*, 1999, 19(4): 529–533]
- Zhang XF. Study on age identification, growth and reproduction of finless porpoises. *Chinese Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(4): 289–297 [张先锋. 江豚的年龄鉴定、生长和繁殖的研究. *水生生物学报*, 1992, 16(4): 289–297]
- Zhang XQ. Population ecology of Yangtze finless porpoise in Dongting Lake and adjacent waters. Doctoral Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences,

- 2011 [张新桥. 洞庭湖及邻近水域长江江豚种群生态学研究. 中国科学院水生生物研究所博士研究生学位论文, 2011]
- Zhang Y, Li J, Xue YD, *et al.* Population viability analysis of Sichuan golden snub-nosed monkey in context of climate change in Hubei Province, China. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 11: 3333–3341 [张宇, 李佳, 薛亚东, 等. 气候变化背景下湖北川金丝猴种群生存力分析. *生态学杂志*, 2018, 11: 3333–3341]
- Zhou XM, Guang XM, Sun D, *et al.* Population genomics of finless porpoises reveal an incipient cetacean species adapted to freshwater. *Nature Communications*, 2018, 9: 1276

(编辑 冯小花)

Analysis of Population Viability Analysis of Yangtze Finless Porpoise in Different Simulated Scenarios

WU Bin, WANG Weiping, HE Gang, WANG Haihua^①

(*Jiangxi Institute for Fisheries Sciences, Nanchang 330039*)

Abstract To study the population dynamics and conservation strategies of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*), Vortex (v.10.3.7.0) was used to analyze the population viability. Taking 1999 as the starting point, a retrospective analysis revealed that the extinction probability of finless porpoise was most likely to be 0.0754 and was not higher than 0.5629. The mean extinction time was most likely to be 93.5 years and not less than 87.9 years. Taking 2017 as the starting point, through the analysis of the current situation, it was found that the extinction probability of the Yangtze finless porpoise population was 0.3551~0.6985, and the average extinction time was 83.5~88.0 years. In certain situations, the proportion of newborn male Yangtze finless porpoise was 0.55, 0.50, and 0.45, respectively. The results showed that masculinization increased the probability of extinction from 0.6985 to 0.9157, and feminization brought it down to 0.3664. At the same time, comparison of the data found that a 10% decrease in the proportion of newborn males and a 10% increase in the breeding rate of adult females had the same effect. The above results suggested that the extinction risk of the finless porpoise population in the Yangtze River was relatively high. Focusing on the protection and restoration of high-quality habitats, especially those related to parents–children, is important for the protection of the Yangtze finless porpoise.

Key words Yangtze finless porpoise; PVA; Vortex model; Mortality; Breeding

^① Corresponding author: WANG Haihua, E-mail: haihuawang998@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191212002

http://www.yykxjz.cn/

邓裕坚, 易木荣, 李波, 刘思杓, 邱康文, 沈春燕, 何雄波, 颜云榕. 北部湾春季多齿蛇鲻生物学特征及其年际变化. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 36-44
Deng YJ, Yi MR, Li B, Liu SB, Qiu KW, Shen CY, He XB, Yan YR. Biological characteristics and inter-annual changes of *Saurida tumbil* in spring in the Beibu Gulf, South China Sea. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 36-44

北部湾春季多齿蛇鲻生物学特征及其年际变化*

邓裕坚¹ 易木荣^{1,2} 李波¹ 刘思杓¹ 邱康文¹
沈春燕^{1,3} 何雄波^{1①} 颜云榕^{1,2,3,4①}



1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088;
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)南海资源大数据中心 湛江 524013;
3. 广东省南海深远海渔业管理与捕捞工程技术研究中心 湛江 524088;
4. 广东海洋大学深圳研究院海洋渔业信息化技术中心 深圳 518120)

摘要 根据北部湾渔港采样及海上调查生物学测定与数据分析,研究了北部湾多齿蛇鲻(*Saurida tumbil*)春季生物学特征及其年际变化。结果显示,2008~2018年春季,多齿蛇鲻个体呈小型化趋势,各年度平均体长范围为15.8~16.9 cm,平均体质量范围为48.8~77.5 g,2018年的平均体长和平均体质量比2008年分别降低了6.5%和34.5%。体长-体质量关系式中的异速生长参数 b 的范围为3.03~3.42,表明春季群体主要呈正异速生长状态($b>3$)。性成熟体长年际变化分析表明,北部湾多齿蛇鲻存在性成熟提前的现象,雌性群体50%性成熟体长从2008年(19.0 cm)至2018年(16.6 cm)整体呈减小趋势,10年间减小比例为12.6%,其中,2011~2015年海上采样的样品对比显示,50%性成熟体长减小比例为3.8%。2008~2018年北部湾多齿蛇鲻的肥满度整体呈下降趋势,均值变化范围为1.09~1.29,渔港采样样品和海上采样样品的肥满度年际变化皆呈下降趋势。

关键词 北部湾;多齿蛇鲻;生物学特征;50%性成熟体长;肥满度;年际变化

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0036-09

鱼类生物学特征是评价渔业资源现状的重要内容,其指标的对比分析可反映种群结构以及资源动态,对渔业资源利用评价和科学管理策略制定具有重要的参考意义(黄硕琳等,2019)。体长和体质量是鱼类的基本生物学特征,能反映鱼类个体生理状态和种群结构变动(Andersen *et al*, 2016);体长-体质量关系在一定程度上能反映鱼类的生长状况(詹秉义,1995);

鱼类50%性成熟体长(L_{50})是研究渔业资源质量和评估管理的基础指标之一(詹秉义,1995);肥满度则是反映鱼类营养状况的重要指标(戴强等,2006)。

多齿蛇鲻(*Saurida tumbil*)(Bloch, 1795),隶属狗母鱼科,为暖水性底层鱼类,分布于印度洋和太平洋西岸,在我国主要分布于东海和南海,是北部湾海域底拖网渔业的重要经济种(陈再超等,1982;刘金殿,

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900905)、南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)资助项目(ZJW-2019-08)和广东省科技计划项目(2018B030320006)共同资助 [This study was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900905), the Fund of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang) (ZJW-2019-08), and Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province (2018B030320006)].

邓裕坚, E-mail: yujiandeng@126.com

① 通讯作者:颜云榕,教授, E-mail: tuna_ps@126.com;何雄波, E-mail: xiongbo98@163.com

收稿日期:2019-12-12, 收修改稿日期:2020-05-12

2009; 傅昕龙等, 2019)和传统优势种(乔延龙等, 2008; 王雪辉等, 2011、2012)。国内外学者对多齿蛇鲻的生长特征(Singh *et al.*, 1995; 舒黎明等, 2004; 侯刚等, 2014)、年龄结构(Rao, 1984; Ambak *et al.*, 1986)、鳞片特征(张其永等, 1987; Jawad *et al.*, 2007)、摄食习性(颜云榕等, 2010; 杨璐等, 2016)和种群动态(Jaiswar *et al.*, 2003)等方面开展过大量研究。研究发现, 近几十年来, 多齿蛇鲻已出现不同程度的资源衰退现象, 主要表现为种群结构低龄化、小型化, 资源量和资源密度下降等(卢振彬等, 1999; 王跃中等, 2008)。孙典荣(2008)和Wang等(2012)分别从资源量和种群动力学方面评估多齿蛇鲻的资源状况, 发现北部湾多齿蛇鲻已遭过度开发, 出现资源衰退的趋势。渔业资源衰退除资源量下降和开发率过高等表现外, 物种的生物学特征也会发生显著变化。近10年来, 对于北部湾衰退资源种多齿蛇鲻的生物学特征产生的变化仍不清楚, 这制约着对多齿蛇鲻的管理和保护, 其衰退趋势是否有所改观, 仍有待进一步研究。

本研究根据北部湾春季沿岸渔港采样(2008、2018年)和底拖网调查采样(2011、2015年)数据, 分别采用体长-体质量关系参数、性成熟比例、50%性成熟体长和肥满度参数等生物学指标, 通过对比分析, 研究

该海域多齿蛇鲻生物学特征及其年际变化, 探明资源衰退下生物学特征的变化幅度及趋势, 旨在为北部湾多齿蛇鲻资源的合理利用和有效管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与数据来源

分别于2008、2011、2015和2018年春季对南海北部湾多齿蛇鲻进行采样。其中, 2008和2018年为渔港定点采样, 采样站点分别为广东湛江江洪港和广西北海侨港, 对底拖网上岸渔获物进行随机抽样; 2011和2015年的样品通过海上调查采集(表1)。4个年度共采样1063尾。按《海洋调查规范》(国家海洋局, 2007)进行生物学测定与解剖, 测定指标有体长、体质量和性成熟度等, 其中, 体长精确到0.1 cm, 体质量精确到0.1 g。性成熟度分期主要参照刘筠(1993)的方法分为6期。由于2008和2011年的样本量与2015和2018年的样本量相差较大, 本研究利用软件SPSS 19.0, 采用按月分层随机抽样方法(袁兴伟等, 2011), 对2008和2011年的数据抽样, 使相同采样方式得到相同样品量, 以消除样本量差异对多齿蛇鲻生物学分析结果的影响, 即2008年抽取57尾, 2011年抽取48尾。

表 1 北部湾多齿蛇鲻底拖网样品采样信息
Tab.1 Sampling information of *S. tumbil* using bottom trawl in the Beibu Gulf

年度 Year	月份 Month	地点 Locations	样品数 Samples	分层抽样数 Stratified sampling size
2008	3~4	渔港采样: 北海侨港、湛江江洪 Fishing port sampling: Qiaogang Town, Beihai City; Jianghong Town, Zhanjiang City	353	57
2011	4	海上采样: 17°~22°N; 105°~110°E Marine survey: 17°~22°N; 105°~110°E	605	48
2015	4	海上采样: 17°~22°N; 105°~110°E Marine survey: 17°~22°N; 105°~110°E	48	48
2018	3~4	渔港采样: 北海侨港、湛江江洪 Fishing port sampling: Qiaogang Town, Beihai City; Jianghong Town, Zhanjiang City	57	57

1.2 数据处理与分析

体长-体质量关系采用幂函数表示:

$$W=aL^b$$

式中, W 为体质量(g); L 为体长(cm); a 、 b 为该公式的参数, 其中, b 又被称为异速生长参数。当 $b=3$ 时, 鱼类个体呈等速生长; $b>3$ 时, 呈正异速生长; $b<3$ 时, 呈负异速生长(Froese, 2006; Pitcher *et al.*, 1982)。

50%性成熟体长: 以长度 1.0 cm 为间隔, 对体长数据进行分组, 对不同体长组的性成熟个体百分比拟合逻辑斯蒂曲线, 确定其 50%性成熟体长:

$$P_i = \frac{1}{1 + e^{-(a+bl_i)}}$$

$$L_{50} = a/b$$

式中, P_i 为性成熟个体在该体长组内样本中所占百分比; l_i (cm) 为各体长组中值; a 、 b 为估算参数; L_{50} 为 50%性成熟体长。

肥满度采用 Fulton 状态指数 K (Fulton, 1911)表示:

$$K=(W/L^3)\times 100$$

式中, W 为体质量(g), L 为体长(cm)。

数据分析使用软件 SPSS 19.0, 平均体长、平均体质量和肥满度的年间差异使用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验, 体长-体质量关系参数的年间差异使用协方差分析(ANCOVA)检验。

2 结果

2.1 体长和体质量的分布特征

2008 和 2018 年渔港采样中, 北部湾春季多齿蛇鲻体长范围为 10.3~29.8 cm, 体质量范围为 9.7~366.1 g, 体长和体质量优势组分别为 14.0~18.0 cm 和 30.0~70.0 g, 体长优势组分别占比 56.1%和 63.2%, 体质量优势组分别占比 57.9%和 59.6%。平均体长分别为 16.9 和 15.8 cm, 平均体质量为分别为 77.5 和 50.8 g; 与 2008 年相比, 2018 年平均体长下降 6.5%, 平均体质量下降 34.5%(图 1, 表 2)。

2011和2015年海上采样中, 样品体长范围为 12.0~23.6 cm, 体质量范围为 17.8~160.7 g, 体长和体质量优势组分别为 14.0~18.0 cm和30.0~70.0 g, 体长优势组分别占比68.8%和75.0%, 体质量优势组分别占比72.9%和75.0%。平均体长分别为 16.0和16.3 cm, 平均体质量为分别为 52.9和48.8 g; 与2011年相比,

2015 年平均体长增加比例为 1.9%, 平均体质量下降 7.8%(图 1, 表 2)。

北部湾多齿蛇鲻的体长分布范围为 10.3~29.8 cm, 体质量分布范围为 9.7~366.1 g, 各年度的体长优势组和体质量优势组无明显变化, 分别为 14.0~18.0 cm 和 30.0~70.0 g。平均体长和体质量呈波动下降趋势, 平均体长最大值为 2008 年的 16.9 cm, 最小值为 2018 年的 15.8 cm, 平均体质量最大值为 2008 年的 77.5 g, 最小值为 2015 年的 48.8 g。2008~2018 年平均体长和平均体质量分别下降 6.5%和 34.5%(图 1, 表 2)。

单因素方差检验表明, 平均体长除 2018 年显著小于 2008 年外($P<0.05$), 各年间差异不显著($P>0.05$); 2008 年平均体质量显著大于其余年度($P<0.05$), 2011、2015 和 2018 年间差异不显著($P>0.05$)。

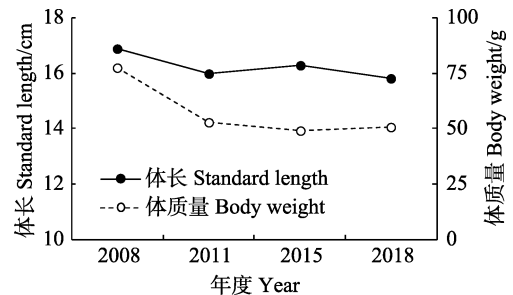


图 1 多齿蛇鲻平均体长和体质量年际变化
Fig.1 Inter-annual changes in the average standard length and body weight of *S. tumbil* in the Beibu Gulf

表 2 多齿蛇鲻体长和体质量分布特征

Tab.2 Distribution characteristics of standard length and body weight of *S. tumbil*

项目 Item		年度 Year			
		2008	2011	2015	2018
体长 Standard length (SL) (cm)	范围 Range	11.7~29.8	12.2~23.6	12.0~20.5	10.3~21.5
	平均值 Mean	16.9	16.0	16.3	15.8
	标准偏差 SD	4.5	2.2	1.8	2.2
	优势组 Dominant	14.0~18.0	14.0~18.0	14.0~18.0	14.0~18.0
	优势组比例 Percentage (%)	56.1	68.8	75.0	63.2
体质量 Body weight (BW) (g)	范围 Range	19.8~366.1	19.8~160.7	17.8~95.3	9.7~126.6
	平均值 Mean	77.5	52.9	48.8	50.8
	标准偏差 SD	80.2	28.5	17.0	24.3
	优势组 Dominant	30.0~70.0	30.0~70.0	30.0~70.0	30.0~70.0
	优势组比例 Percentage (%)	57.9	72.9	75.0	59.6

2.2 体长-体质量关系

2008~2018 年北部湾春季多齿蛇鲻体长-体质量关系参数 a 的范围为 0.0037~0.0119, 年际变化总体呈下降趋势; 其中, 最大值出现在 2008 年, 最小值

出现在 2018 年。异速生长参数 b 的范围为 3.03~3.42, 群体主要呈正异速生长状态, 年际变化总体呈上升趋势, 最高值为 2018 年的 3.42, 最低值为 2008 年的 3.03; 2008 和 2018 年的参数 b 差异极显著($P<0.01$), 2011 与 2015 年差异不显著($P>0.05$)(表 3)。

表 3 多齿蛇鲷的体长-体质量关系参数

Tab.3 Relationship parameters of standard length-body weight for *S. tumbil*

年度 Year	<i>a</i>	95%置信区间 95%CL	<i>b</i>	95%置信区间 95%CL	相关系数 R^2
2008	0.0119	0.0085~0.0167	3.03	2.91~3.15	0.98
2011	0.0070	0.0072~0.0172	3.19	2.87~3.52	0.89
2015	0.0059	0.0033~0.0106	3.22	3.01~3.43	0.95
2018	0.0037	0.0019~0.0073	3.42	3.18~3.67	0.93

注: *a*, *b*: 体长(cm)-体质量(g)关系参数

Note: *a*, *b*: Standard length-body weight relationship parameters

2.3 性成熟比例

2008 和 2018 年渔港采样中, 北部湾多齿蛇鲷性成熟比例分别为 29.8%和 25.0%, 与 2008 年相比, 2018 年下降 4.8%(图 2)。2011 和 2015 年海上采样中, 性成熟比例分别为 22.9%和 16.7%, 与 2011 年相比, 2015 年下降 6.2%(图 2)。

北部湾多齿蛇鲷春季性成熟比例范围基本保持在 20%左右, 不同年度性成熟个体比例为 16.7%~29.8%, 平均值为 23.6%, 比例最高的年度为 2008 年, 比例最低的年度为 2015 年, 年际变化总体呈先减小后增大的趋势(图 2)。

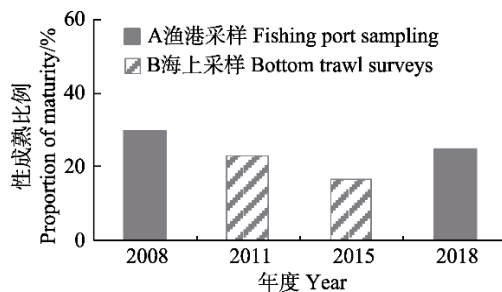


图 2 北部湾多齿蛇鲷性成熟比例年际变化
Fig.2 Inter-annual changes in proportion of maturity *S. tumbil* in the Beibu Gulf

2.4 50%性成熟体长

2008和2018年渔港采样中, 多齿蛇鲷雌性群体的50%性成熟体长分别为19.0和16.6 cm, 与2008年相比, 2018年下降12.6%(图3)。2011和2015年海上采样中, 多齿蛇鲷雌性群体50%性成熟体长分别为18.6和17.9 cm, 与2011年相比, 2015年下降3.8%(图3)。多齿蛇鲷雌性群体 50%性成熟体长年际变化范围为16.6~19.0 cm, 呈下降趋势(图 3, 图 4)。最大值出现在 2008 年, 最小值出现在 2018 年, 10 年间 50%性成熟体长降幅达 12.6%。

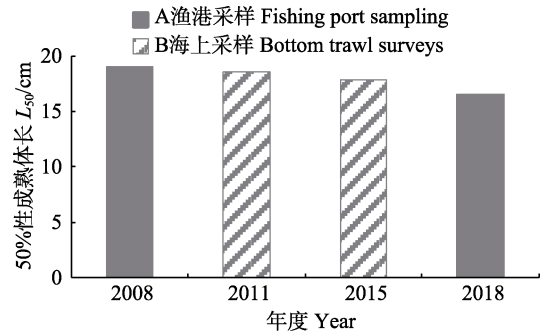


图 3 北部湾多齿蛇鲷雌性群体 50%性成熟体长年际变化
Fig.3 Inter-annual changes in the length at 50% maturity of female *S. tumbil* in the Beibu Gulf

2.5 肥满度的年际变化

2008 和 2018 年渔港采样中, 多齿蛇鲷肥满度的均值分别为 1.29 和 1.19。与 2008 年相比, 2018 年肥满度下降 7.8%。2011 和 2015 年海上采样中, 多齿蛇鲷肥满度均值分别为 1.21 和 1.09。与 2011 年相比, 2015 年肥满度下降 9.5%。经单因素方差检验, 除 2011 与 2018 年差异不显著外, 其余各年度肥满度差异显著($P<0.01$)(图 5)。

2008~2018 年的年际变化呈先减小后增大的趋势, 变化范围为 1.09~1.29。2008 年样品的肥满度整体水平最高, 最低点出现在 2015 年(图 5)。

随着体长增长, 多齿蛇鲷的肥满度呈逐渐增大的趋势(图 6)。渔港采样部分(图 6A), 2008 年不同体长组的肥满度均值范围为 1.19~1.39, 最低值出现在 22~24 cm 体长组, 最大值出现在 28~30 cm 体长组; 2018 年的范围为 0.88~1.29, 最低值出现在 10~12 cm 体长组, 最大值出现在 16~18 cm 体长组。海上采样部分(图 6B), 2011 年不同体长组肥满度均值的范围为 1.12~1.48, 最低值出现在 18~20 cm 体长组, 最大值出现在 20~22 cm 体长组; 2015 年的范围为 1.04~1.14, 最低值出现在 10~12 cm 体长组, 最大值出现在 18~20 cm 体长组。

3 讨论

3.1 生物学特征

在长时间的高强度捕捞压力下, 鱼类的表型特征会对所处的环境产生响应性变化, 其中, 体长和体质量的变化是最直接的响应(Law, 2000; Conover *et al*, 2002)。本研究表明, 10 多年来北部湾多齿蛇鲷个体呈现一定程度的小型化现象, 渔港采样部分平均体长和体质量变化显著; 而海上采样部分可能因为采样时间间隔相对较短, 种群生物学特性变化不明显, 平均

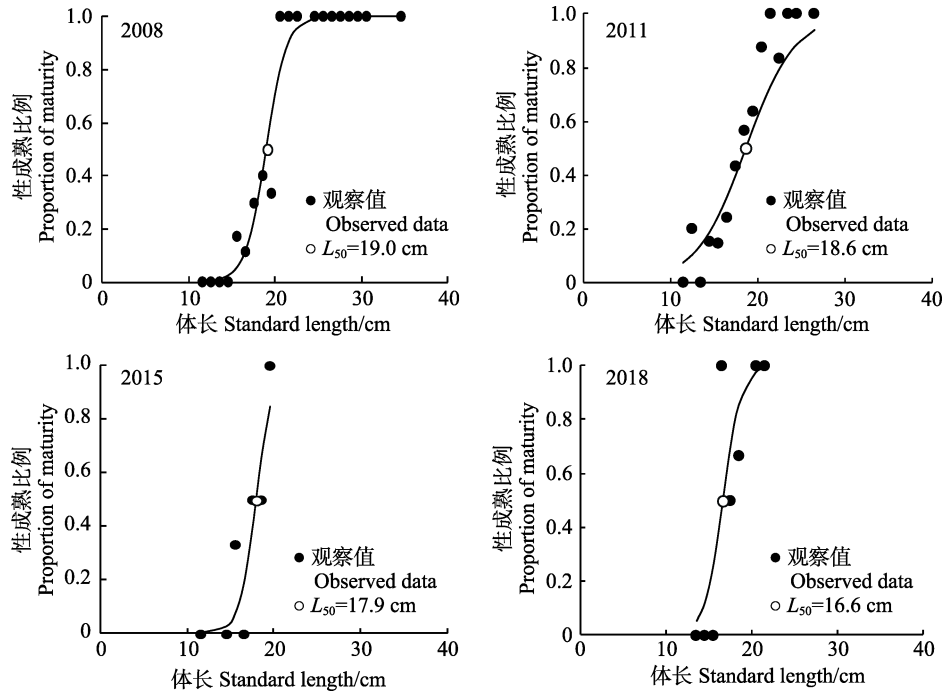


图 4 北部湾多齿蛇鲻个体性成熟比例与体长拟合的逻辑斯蒂曲线

Fig.4 Logistics model fitted for the relationship between standard length and percentage of mature *S. tumbil* in the Beibu Gulf

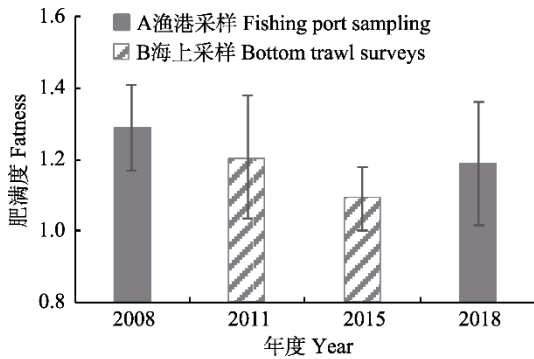


图 5 北部湾多齿蛇鲻肥满度年度变化
Fig.5 Inter-annual changes in fatness of *S. tumbil* in the Beibu Gulf

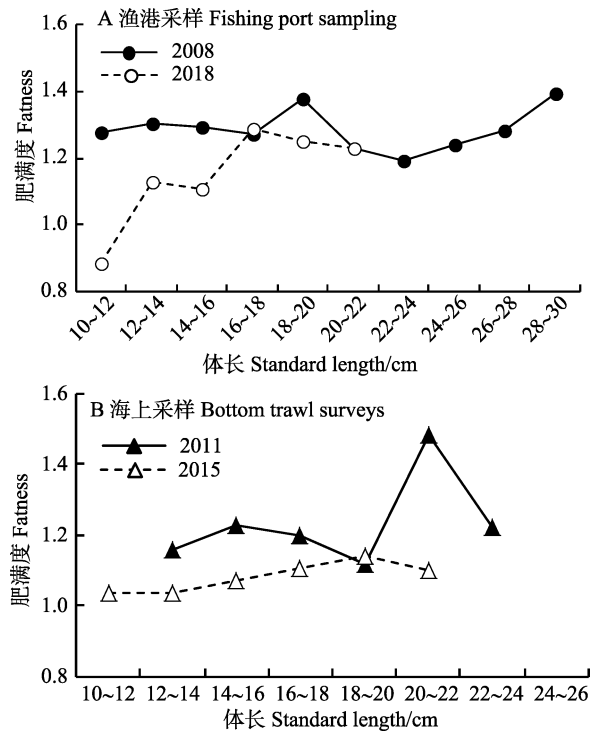


图 6 北部湾多齿蛇鲻不同体长肥满度变化
Fig.6 The change in fatness of *S. tumbil* of different standard length in the Beibu Gulf

体长和平均体质量变化幅度相对较小。与黄梓荣 (2002)的研究对比,本研究 2018 年春季多齿蛇鲻平均体长比 2001 年小 10.7% (1.9 cm)。类似地,王雪辉等 (2012)研究发现,1997~1999 年到 2006~2007 年期间南海海域多齿蛇鲻渐进体长下降了 47%。研究发现,北部湾大部分传统经济鱼类存在生物学衰退的现象,有学者提出鱼类生物学衰退的原因是过度捕捞(张魁等, 2016a、b; 耿平等, 2018)。除过高的捕捞压力外,也有学者认为,生物学衰退的表现跟人类的选择性捕捞活动有关(Rutter, 1902)。不同尺寸的网囊对渔获物的选择能力有所差别(许庆昌等, 2020),且大多数网具对鱼类具有“捕大留小”的选择性,导致生长慢的

基因得以保存,且得到更多表达,而生长较快的基因逐渐被淘汰,剩余群体逐渐向小型化的趋势发展 (Pitcher *et al*, 1982; Conover *et al*, 2002)。

除此之外,有研究表明北部湾部分经济鱼类存在一定程度的性成熟提前现象,如深水金线鱼(*Nemipterus bathybius*)(陈作志等,2012a)和二长棘犁齿鲷(*Evynnis cardinalis*)(张魁等,2016a),过度捕捞导致 L_{50} 下降。本研究发现,近年来,北部湾多齿蛇鲻同样发生了性成熟提前,渔港采样部分2018年的 L_{50} 比2008年小2.4 cm,2015年海上采样部分比2011年小0.7 cm,总体上, L_{50} 呈逐渐减小趋势,与同是蛇鲻属的花斑蛇鲻(*Saurida undosquamis*)的变化趋势一致(陈作志等,2012b)。在捕捞压力影响下,为了种群的延续,鱼类会产生性成熟提前的适应性变化,国际上称为捕捞诱导进化(Heino *et al.*, 2015; 单秀娟等, 2020)。而对于在捕捞活动终止后,性成熟提前是否会发生逆转,相关学者提出了不同的观点。de Roos等(2006)通过生态动力学模型和进化动力学方法,发现鱼类的群体结构及表征容易受捕捞压力的影响,产生不可逆的响应。但也有学者认为是可逆的,Conover等(2009)研究发现,在过高捕捞压力下产生适应性响应的鱼类,在停止捕捞活动后,这种响应机制将在新的12个世代后发生逆转。黄梓荣(2002)研究发现,在实施休渔政策后,南海北部海域多齿蛇鲻资源有一定程度的恢复,说明捕捞强度的降低或有效控制有利于鱼类小型化趋势的逆转。

3.2 体长-体质量的关系及肥满度

本研究多齿蛇鲻的异速生长参数 b 值范围为 3.03~3.42,与 Carlander (1969)研究发现的的大部分鱼类 b 值落在 2.5~3.5 之间的结果一致。且 b 值均大于 3,说明春季多齿蛇鲻处于正异速生长状态,与王理想(2009)对北部湾春季多齿蛇鲻异速生长参数的研究结果一致(表 4)。而其他学者关于多齿蛇鲻年度异速生长参数的估算大部分接近 3,呈匀速生长(表 4)。相对于其他季节,春季的 b 值偏大,可能是由于多齿蛇鲻在春季处于育肥阶段,所摄取的能量主要用于性腺的发育,个体体长增长率相对小于体质量增长率,表现为正异速生长。Froese(2006)研究发现, b 值变化受生长发育及环境等因素影响。从生长发育来看,北部湾多齿蛇鲻全年存在 3 个繁殖高峰期,春季属于主要繁殖期之一,且繁殖期间并未停止进食或降低摄食强度(颜云榕等,2010),为性腺发育提供大量能量(Hofer *et al.*, 1985),从而表现出体质量的增速相对高于体长的增速;从环境因素来看,多齿蛇鲻主要栖息于近海底层,分布水深约为 40~150 m,处于沿岸水与外海水交界,小型鱼类资源种类及营养物质丰富,是生物量最高的海域(贾晓平等,2005),是多齿蛇鲻摄食与繁殖发育的主要场所,为多齿蛇鲻的快速生长提供了有利条件。

表 4 南海多齿蛇鲻异速生长参数的差别
Tab.4 Difference of allometric parameters for *S. tumbil* in South China Sea

采样时间 Sampling time		海域 Sea area	异速生长参数 b Allometric parameter b	参考文献 References
年度 Year	月份 Month			
1964~1965	1~12	南海北部海南岛以东 The northern part of the South China Sea, east of Hainan Island	3.17	中华人民共和国水产部 南海水产研究所(1966)
1964~1965	1~2, 5~12	南海北部海南岛以东 The northern part of the South China Sea, east of Hainan Island	3.01	舒黎明等(2004)
1981~1982	-	南海北部大陆架 The northern shelf of the South China Sea	2.98	舒黎明等(2004)
1997~1999	-	南海北部大陆架 The northern shelf of the South China Sea	3.06	舒黎明等(2004)
2006	4	北部湾 Beibu Gulf	3.40	王理想(2009)
2006~2008	1~12	北部湾 Beibu Gulf	3.27	刘金殿等(2009)
2006~2007	1、4、7、10	北部湾 Beibu Gulf	3.05	Wang 等(2012)
2008	3~4	北部湾 Beibu Gulf	3.03	本研究 This study
2011	4	北部湾 Beibu Gulf	3.19	本研究 This study
2015	4	北部湾 Beibu Gulf	3.22	本研究 This study
2018	3~4	北部湾 Beibu Gulf	3.42	本研究 This study

鱼类在过度捕捞压力下, 剩余群体所摄取的能量主要用于生长和性腺发育, 导致其肥满度降低(李忠炉等, 2011)。本研究中, 2008年多齿蛇鲻的肥满度为最大值, 随后出现降低, 至2018年有回升的迹象; 另外, 对渔港采样和海上采样数据进行单独分析, 肥满度的年际变化皆呈下降趋势。此外, 随着体长增长, 多齿蛇鲻的肥满度呈逐渐增长的趋势。Panda等(2016)认为, 小尺寸的群体生存状况较差, 肥满度小; 而Fulton(1904)则认为, 鱼类早期生长速度相对较快, 从而表现出小尺寸群体的肥满度较低。本研究数据支持Fulton的观点, 判断鱼类在特定阶段生存状态的好坏, 仍需考虑环境条件或自身生理状态的影响。

参 考 文 献

- Ambak MA, Mohammad Mohsin AK, Mohd Said MZ. Growth characteristics of lizard fish (Fam: Synodontidae) in the South China Sea. *Pertanika*, 1986, 9(2): 261–263
- Andersen KH, Jacobsen NS, Farnsworth KD, *et al.* The theoretical foundations for size spectrum models of fish communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, 73(4): 575–588
- Carlander KD. *Handbook of freshwater fishery biology*. Iowa: Iowa State University Press, 1969
- Chen ZC, Liu JX. *Economic fish in South China Sea*. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1982, 56–59 [陈再超, 刘继兴. 南海经济鱼类. 广州: 广东科技出版社, 1982, 56–59]
- Chen ZZ, Kong XL, Xu SN, *et al.* Dynamic changes of population parameters of *Nemipterus bathybius* in the Beibu Gulf. *Journal of Fisheries of China*, 2012a, 36(4): 584–591 [陈作志, 孔啸兰, 徐姗楠, 等. 北部湾深水金线鱼种群参数的动态变化. 水产学报, 2012a, 36(4): 584–591]
- Chen ZZ, Qiu YS, Xu SN, *et al.* Evolution of biological characteristics of *Saurida undosquamis* (Richardson) in the Beibu Gulf, South China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012b, 19(2): 321–328 [陈作志, 邱永松, 徐姗楠, 等. 北部湾花斑蛇鲻生物学特征的演化. 中国水产科学, 2012b, 19(2): 321–328]
- Conover DO, Munch SB, Arnott SA. Reversal of evolutionary downsizing caused by selective harvest of large fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 276(1664): 2015–2020
- Conover DO, Munch SB. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science*, 2002, 297(5578): 94–96
- Dai Q, Dai JH, Li C, *et al.* Discussion on relative fatness. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(5): 715–718 [戴强, 戴建洪, 李成, 等. 关于肥满度指数的讨论. 应用与环境生物学报, 2006, 12(5): 715–718]
- de Roos AM, Boukal DS, Persson L. Evolutionary regime shifts in age and size at maturation of exploited fish stocks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 273(1596): 1873–1880
- Froese R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(4): 241–253
- Fu XL, Xu ZL, Que JL, *et al.* Temporal-spatial distribution characteristics of fish stocks in north-west coastal waters of Beibu Gulf. *Fisheries Science*, 2019, 38(1): 10–18 [傅昕龙, 徐兆礼, 阙江龙, 等. 北部湾西北部近海鱼类资源的时空分布特征研究. 水产科学, 2019, 38(1): 10–18]
- Fulton TW. The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland, 1904(3): 141–241
- Fulton TW. *The sovereignty of the sea*. London and Edinburgh: Williana Blackwood and Sons, 1911
- Geng P, Zhang K, Chen ZZ, *et al.* Interannual change in biological traits and exploitation rate of *Decapterus maruadsi* in Beibu Gulf. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(6): 1–9 [耿平, 张魁, 陈作志, 等. 北部湾蓝圆鲹生物学特征及开发状态的年际变化. 南方水产科学, 2018, 14(6): 1–9]
- Heino M, Pauli BD, Dieckmann U. Fisheries-induced evolution. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics*, 2015, 46(1): 461–480
- Hofer R, Krewedl G, Koch F. An energy budget for an omnivorous cyprinid: *Rutilus rutilus* (L.). *Hydrobiologia*, 1985, 122(1): 53–59
- Hou G, Liu JD, Feng B, *et al.* Applying multi-model inference to estimate growth parameters of greater lizard fish *Saurida tumbil* in Beibu Gulf, South China Sea. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(3): 843–849 [侯刚, 刘金殿, 冯波, 等. 应用多模型推论估算北部湾多齿蛇鲻的生长参数. 应用生态学报, 2014, 25(3): 843–849]
- Huang SL, Tang Y. Review and prospect of theories of fisheries management and China's practice. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 211–231 [黄硕琳, 唐议. 渔业管理理论与中国实践的回顾与展望. 水产学报, 2019, 43(1): 211–231]
- Huang ZR. Effect of close season on Bloch et Schneider (*Saurida tumbil*) stock in the North of South China Sea. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2002, 22(6): 26–31 [黄梓荣. 休渔对南海北部多齿蛇鲻资源的影响. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(6): 26–31]
- Jaiswar AK, Chakraborty SK, Prasad RR, *et al.* Population dynamics of lizard fish *Saurida tumbil* (Teleostomi: Synodontidae) from Mumbai, west coast of India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2003, 32(2): 147–150
- Jawad LA, Al-Jufaili SM. Scale morphology of greater lizardfish *Saurida tumbil* (Bloch, 1795) (Pisces: Synodontidae). *Journal of Fish Biology*, 2007, 70(4): 1185–1212
- Jia XP, Li CH, Qiu YS. Investigation and evaluation of marine fishery resources of Guangdong Province and countermeasures for sustainable utilization. Beijing: China Ocean Press, 2005 [贾晓平, 李纯厚, 邱永松. 广东海洋渔业资源调查评估与可持续利用对策. 北京: 海洋出版社,

- 2005]
- Law R. Fishing, selection, and phenotypic evolution. *ICES Journal of Marine Science*, 2000, 57(3): 659–668
- Li ZL, Jin XS, Shan XJ, *et al.* Inter-annual changes on body weight-length relationship and relative fatness of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 602–610 [李忠炉, 金显仕, 单秀娟, 等. 小黄鱼体长-体质量关系和肥满度的年际变化. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 602–610]
- Liu J. Reproductive physiology of Chinese farmed fish. Beijing: China Agriculture Press, 1993, 20–73 [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 20–73]
- Liu JD, Lu HS, Zhu LX, *et al.* The difference of growth, mortality and group composition between female and male *Saurida tumbil* in the Beibu Gulf. *Marine Fisheries*, 2009, 31(3): 243–253 [刘金殿, 卢伙胜, 朱立新, 等. 北部湾多齿蛇鲷雌雄群体组成、生长、死亡特征的差异. *海洋渔业*, 2009, 31(3): 243–253]
- Liu JD. Analysis of fishery risk management and fishery biology of the greater lizardfish *Saurida tumbil* (1795) in the Beibu Gulf. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2009 [刘金殿. 北部湾多齿蛇鲷渔业生物学及渔业风险管理分析. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Lu ZB, Dai QS, Zhu JF, *et al.* Change in structure of the fisheries resources and ecology of the major population in Fujian offshore waters. *Journal of Fujian Fisheries*, 1999(3): 1–7 [卢振彬, 戴泉水, 朱进福, 等. 福建近海渔业资源结构及其主要种群生态的变化. *福建水产*, 1999(3): 1–7]
- Panda D, Jaiswar A, Sarkar SD, *et al.* Growth, mortality and exploitation of bigeye scad, *Selar crumenophthalmus* off Mumbai, north-west coast of India. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2016, 96(7): 1411–1416
- Pitcher TJ, Hart PJB. *Fisheries ecology*. London: Croom Helm, 1982, 1–414
- Qiao YL, Lin ZJ, Qiu YS. Change of fishery species community structure during autumn and winter in Beibu Gulf. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science)*, 2008, 26(1): 100–104 [乔延龙, 林昭进, 邱永松. 北部湾秋、冬季渔业生物群落结构特征的变化. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 26(1): 100–104]
- Rao KV. Age and growth of lizardfishes (*Saurida* spp.) from the Northwestern Bay of Bengal. *Indian Journal of Fisheries*, 1984, 31(1): 19–30
- Rutter C. Natural history of the quinnat salmon: A report on investigations in the Sacramento River, 1896–1901. *Bulletin of the United States Fish Commission*, 1902, 22: 65–141
- Shan XJ, Hu ZJ, Shao CW, *et al.* Progress in the study of fishing-induced evolution of fish biological characteristics. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 165–175 [单秀娟, 胡芷君, 邵长伟, 等. 捕捞诱导鱼类生物学特征进化研究进展. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 165–175]
- Shu LM, Qiu YS. Biology analysis of *Saurida tumbil* in northern South China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(2): 154–158 [舒黎明, 邱永松. 南海北部多齿蛇鲷生物学分析. *中国水产科学*, 2004, 11(2): 154–158]
- Singh VN, Acharya P, Jaiswar AK. Preliminary observations on the morphometric characteristics, length weight relationship, food and feeding habits and fecundity of *Saurida tumbil* (Bloch) off Bombay coast. *Journal of the Indian Fisheries Association*, 1995(25): 93–97
- South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences. Investigation report on bottom trawl fish resources in the northern part of the South China Sea, east of Hainan Island, volume 2, 1966 [中华人民共和国水产部南海水产研究所. 南海北部底拖网鱼类资源调查报告(海南岛以东). 第2册下, 1966]
- State Oceanic Administration. Specifications for oceanographic survey part VI: Marine biological survey, GB/T 12763. 6–2007. Beijing: Standards Press of China, 2007 [国家海洋局. 海洋调查规范第六部分: 海洋生物调查, GB/T 12763. 6–2007. 北京: 中国标准出版社, 2007]
- Sun DR. A study on fishery resources and sustainable fishery development in the Beibu Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 [孙典荣. 北部湾渔业资源与渔业可持续发展研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Wang LX. Preliminary study on fish communities during spring and autumn in water of Beibu Gulf. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [王理想. 北部湾海域春、秋季鱼类群落结构初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Wang XH, Qiu YS, Du FY, *et al.* Dynamics of demersal fish species diversity and biomass of dominant species in autumn in the Beibu Gulf, northwestern South China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(2): 333–342 [王雪辉, 邱永松, 杜飞雁, 等. 北部湾秋季底层鱼类多样性和优势种数量的变动趋势. *生态学报*, 2012a, 32(2): 333–342]
- Wang XH, Qiu YS, Du FY, *et al.* Population parameters and dynamic pool models of commercial fishes in the Beibu Gulf, northern South China Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(1): 105–117
- Wang XH, Qiu YS, Du FY, *et al.* Spatio-temporal variability of fish diversity and dominant species in the Beibu Gulf. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 427–436 [王雪辉, 邱永松, 杜飞雁, 等. 北部湾鱼类多样性及优势种的时空变化. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 427–436]
- Wang YZ, Yuan WW. Changes of demersal trawl fishery resources in northern South China Sea as revealed by demersal trawling. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(2): 26–33 [王跃中, 袁蔚文. 南海北部底拖网渔业资源的数量变动. *南方水产*, 2008, 4(2): 26–33]
- Xu QC, Li XS, Sun S, *et al.* Selectivity of codend mesh of beam trawl in Laizhou Bay in autumn. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 19–27 [许庆昌, 李显森, 孙珊, 等. 秋季莱州湾弓子网网囊网目尺寸选择性研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 19–27]
- Yan YR, Wang TT, Hou G, *et al.* Feeding habits and monthly

- and ontogenetic diet shifts of the greater lizardfish *Saurida tumbil* in the Beibu Gulf of the South China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(7): 1089–1098 [颜云榕, 王田田, 侯刚, 等. 北部湾多齿蛇鲷摄食习性及随生长发育的变化. *水产学报*, 2010, 34(7): 1089–1098]
- Yang L, Cao WQ, Lin YS, *et al.* Preliminary study on feeding habits and trophic niche of nine economic fish species in Beibu Gulf in summer. *Journal of Tropical Oceanography*, 2016, 35(2): 66–75 [杨璐, 曹文清, 林元烧, 等. 夏季北部湾九种经济鱼类的食性类型及营养生态位初步研究. *热带海洋学报*, 2016, 35(2): 66–75]
- Yuan XW, Liu Y, Cheng JH. Error analysis on stratified sampling and its application in fishery statistics. *Marine Fisheries*, 2011, 33(1): 116–120 [袁兴伟, 刘勇, 程家骅. 分层抽样误差分析及其在渔业统计中的应用. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 116–120]
- Zhan BY. Fish stock assessment. Beijing: China Agriculture Press, 1995, 1–353 [詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995, 1–353]
- Zhang K, Chen ZZ, Qiu YS. Decadal changes in growth, mortality and maturity parameters of *Evynnis cardinalis* in Beibu Gulf. *South China Fisheries Science*, 2016a, 12(6): 9–16 [张魁, 陈作志, 邱永松. 北部湾二长棘犁齿鲷生长、死亡和性成熟参数的年际变化. *南方水产科学*, 2016a, 12(6): 9–16]
- Zhang K, Chen ZZ, Wang YZ, *et al.* Population structure of *Priacanthus macracanthus* in the Beibu Gulf, and parameters for its growth, mortality and maturity. *Journal of Tropical Oceanography*, 2016b, 35(5): 20–28 [张魁, 陈作志, 王跃中, 等. 北部湾短尾大眼鲷群体结构及生长、死亡和性成熟参数估计. *热带海洋学报*, 2016b, 35(5): 20–28]
- Zhang QY, Xu XC. Scanning electron microscopic observation of the scale structure of *Saurida tumbil*. *Acta Zoologica Sinica*, 1987, 33(2): 162–165 [张其永, 徐旭才. 多齿蛇鲷鳞片表面结构的扫描电镜观察. *动物学报*, 1987, 33(2): 162–165]

(编辑 马璀璨)

Biological Characteristics and Inter-Annual Changes of *Saurida tumbil* in Spring in the Beibu Gulf, South China Sea

DENG Yujian¹, YI Murong^{1,2}, LI Bo¹, LIU Sibiao¹, QIU Kangwen¹, SHEN Chunyan^{1,3}, HE Xiongbo^{1①}, YAN Yunrong^{1,2,3,4①}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Marine Resources Big Data Center of South China Sea, Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524013; 3. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center of Far Sea Fisheries Management and Fishing of South China Sea, Zhanjiang 524088; 4. Center of Marine Fisheries Information Technology, Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518120)

Abstract Using data from the spring fishing port samples and bottom trawl surveys in the Beibu Gulf, the biological characteristics and inter-annual changes of *Saurida tumbil* were investigated. The population structure of *S. tumbil* in the Beibu Gulf had a miniaturization trend - the average standard length (SL) and body weight (BW) decreased from 2008 to 2018, with ranges of 15.8~16.9 cm and 48.8~77.5 g, respectively. There were also temporal variations in SL and BW; the average values decreased by 6.5% and 34.5% from 2008 to 2018, respectively. The range of the allometric parameter b was 3.03~3.42, indicating that *S. tumbil* had positive allometric growth ($b>3$) in the Beibu Gulf in spring. Analysis of the inter-annual change in length at 50% maturity (L_{50}) in females showed that the *S. tumbil* population matured before the L_{50} , decreasing 12.6% from 2008 (19.0 cm) to 2018 (16.6 cm). Compared to 2011 (18.6 cm), the 2015 female L_{50} reduced by 3.8% (17.9 cm). Fatness also declined from 2008 to 2018 (range: 1.09~1.29), as evidenced by consistent downward trends in the fatness samples from both fishing methods. However, fatness had an overall increasing trend with increasing SL.

Key words Beibu Gulf; *Saurida tumbil*; Biological characteristics; Length at 50% maturity; Fatness; Inter-annual change

① Corresponding author: YAN Yunrong, E-mail: tuna_ps@126.com; HE Xiongbo, E-mail: xiongbo98@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200312001

http://www.yykxjz.cn/

郝先才, 冯博, 邵长伟, 王倩. 半滑舌鲷 *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 基因的克隆及其温度响应的表达规律. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 45–54

Hao XC, Feng B, Shao CW, Wang Q. Molecular characterization and expression patterns of *hsd11b1l* and *hsd11b2* and their response to high temperature stress in Chinese tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 45–54

半滑舌鲷 *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 基因的克隆 及其温度响应的表达规律*



郝先才^{1,2} 冯 博^{1,2} 邵长伟^{1,2} 王 倩^{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 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 皮质醇在鱼类应对外界环境压力的过程中起到重要调控作用, 而 *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 具有调节体内皮质醇浓度的重要功能。本研究克隆了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 基因的 cDNA 全长序列, 分析了其序列特征, 研究了其时空表达特征及温度响应的表达规律。结果显示, *hsd11b1l* cDNA 全长为 1650 bp, 开放性阅读框长度为 864 bp, 编码 287 个氨基酸; *hsd11b2* cDNA 全长为 4526 bp, 开放性阅读框长度为 1209 bp, 编码 402 个氨基酸。半滑舌鲷不同组织和性腺发育时期的表达分析结果显示, *hsd11b1l* 在肝脏中表达量最高, 在卵巢的表达量是精巢的 2 倍, 且在 6 月龄和 3 龄鱼的卵巢中呈现较高表达; 而 *hsd11b2* 主要在精巢中表达, 在 6 月龄鱼的精巢中表达量最高, 随后表达量急剧降低, 在卵巢中各个时期几乎不表达。半滑舌鲷温度响应的表达结果显示, 高温(28℃)处理 2 个月后, 与正常温度(22℃)对照组相比, *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 在雄鱼中的表达量均显著降低($P < 0.05$); 高温短期应激 48 h, *hsd11b1l* 表达在雌鱼和雄鱼中均显著降低, *hsd11b2* 表达仅在雄鱼中有显著下调($P < 0.05$)。本研究探讨了 *hsd11b1l* 和 *hsd11b2* 基因在半滑舌鲷性别分化过程中的表达规律, 为研究环境温度与半滑舌鲷性别分化之间的关系奠定了基础。

关键词 半滑舌鲷; 性别决定; 温度; *hsd11b1l* 基因; *hsd11b2* 基因

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0045-10

脊椎动物的性别通常由基因型决定, 其性别一旦形成就很难发生改变, 这种性别决定方式称为遗传型性别决定(Genetic sex determination, GSD)。但在一些爬行类、两栖类、鱼类等相对低等的脊椎动物中, 外界环境因素, 诸如温度、pH、密度及社会性等都有

可能影响性别, 而这种性别决定方式称为环境型性别决定(Environmental sex determination, ESD) (Francis 1984; Rubin, 1985; Francis *et al.*, 1993; Tabata, 1995)。前期研究发现, 皮质醇在 ESD 型物种响应外界环境压力方面起到重要作用(Sadoul *et al.*, 2019)。在鱼类

* 国家自然科学基金(31722058; 31802275)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD19)和南海水产经济动物增殖重点实验室(广东海洋大学)开放课题(KFKT2019ZD03)共同资助 [This work was funded by National Natural Science Foundation of China (31722058; 31802275), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD19), Guangdong South China Sea Key Laboratory of Aquaculture for Aquatic Economic Animals, Guangdong Ocean University (KFKT2019ZD03)]. 郝先才, E-mail: best_hxc@163.com

① 通讯作者: 王 倩, E-mail: wangqian2014@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-12, 收修改稿日期: 2020-03-20

中,温度是主要的外界压力源,外界温度的变化会显著增加机体或细胞的皮质醇水平,从而对鱼类生殖生长、性别分化等产生影响(Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al*, 1999)。在大西洋鲑(*Salmo salar*)幼鱼时期,注射皮质醇后发现,雄鱼的比例增加并且卵巢生长受到抑制(van den Hurk *et al*, 1985)。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)性别决定时期,高温引起皮质醇的增加,进而导致雌性比例升高(Yamaguchi *et al*, 2010)。截至目前,皮质醇介导温度进而影响性别决定的机制尚不完全清楚。

羟基类固醇11 β 脱氢酶(Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase, HSD11 β)属于氧化还原酶家族,调控活性和无活性皮质酮间的相互转化,同时,还参与类固醇代谢的生理过程(Krozowski, 1999)。在哺乳动物中,羟基类固醇11 β 脱氢酶存在2个亚型,分别为11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*hsd11b1*)和*hsd11b2*。*hsd11b1*的功能是将无活性的皮质酮转化为有活性的皮质醇,*hsd11b2*的功能则相反(Albiston *et al*, 1994; Hu *et al*, 2019)。鱼类不存在*hsd11b1*基因,而存在其同源基因Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 like (*hsd11b1l*)(Tsachaki *et al*, 2017)。在斑马鱼(*Danio rerio*)和虱目鱼(*Chanos chanos*)中,*hsd11b1l*可以增加皮质醇的水平,这与哺乳动物中*hsd11b1*的功能相似(Baker, 2010; Hu *et al*, 2019)。*hsd11b2*可以降低鱼类组织皮质醇水平,从而保护组织免受皮质醇的伤害,并参与雄激素的合成(Alderman *et al*, 2012; Tokarz *et al*, 2013)。研究表明,高水平的雄激素可以直接影响鱼类的性别决定和分化(Miura *et al*, 2008; Hattori *et al*, 2009; Blasco *et al*, 2010)。牙汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)高温诱导雄性化过程中,皮质醇通过调节*hsd11b2*高表达促进雄激素生成,从而驱动精巢发生(Fernandino *et al*, 2012)。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的经济鱼类。研究表明,半滑舌鲷的性别决定类型是ZZ/ZW型,但其性别分化也受到外界环境的直接影响。在半滑舌鲷性别决定和分化的关键时期,高温可以诱导遗传雌性向表型雄性逆转(Chen *et al*, 2014)。因此,半滑舌鲷是理解温度与性别分化关系的理想模型。在本研究中,通过RACE克隆获得半滑舌鲷*hsd11b1l*和*hsd11b2*的cDNA全长,并对序列特征进行生物信息学分析,进而通过荧光定量PCR技术,分析其时空表达特征及温度响应的表达规律,可为后续深入探究温度与性别分化的关系提供基础信息。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验用半滑舌鲷均取自山东海阳黄海水产有限公司。随机选取3龄半滑舌鲷雌鱼和雄鱼各3条,解剖后取脑、心脏、肠、鳃、脾脏、肾脏、肝脏、皮肤、精巢及卵巢。此外,取不同发育时期(30日龄、50日龄、3月龄、6月龄、2龄和3龄)半滑舌鲷性腺或性腺区域。将280尾30日龄的半滑舌鲷鱼苗随机等分为2组,分别采用高温(28 $^{\circ}$ C)及常温(22 $^{\circ}$ C)处理2个月,并在3月龄时解剖取性腺组织样品;另取140尾3月龄半滑舌鲷鱼苗,随机等分为2组,分别进行高温(28 $^{\circ}$ C)与常温(22 $^{\circ}$ C)处理,48 h后解剖取性腺组织样品。将上述样品液氮速冻后放入超低温冰箱保存。所有半滑舌鲷同时取尾鳍组织保存于酒精中,通过实验室前期建立的性别特异分子标记方法进行遗传性别鉴定(Jiang *et al*, 2017; Cui *et al*, 2018),对于3月龄半滑舌鲷,进一步结合*dmrt1*基因的相对表达量剔除伪雄鱼(Cui *et al*, 2017)。

1.2 半滑舌鲷*hsd11b1l*和*hsd11b2*的全长克隆

使用RNAPrep pure Tissue Kit (Tiangen, 中国)提取3龄半滑舌鲷的精巢组织总RNA,并使用PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)完成cDNA反转录。根据半滑舌鲷基因组中的*hsd11b1l* (GenBank ID: XM_025065042)和*hsd11b2* (GenBank ID: XM_008310169)基因序列,利用Primer 6.0设计引物(*hsd11b1l*-F/R和*hsd11b2*-F/R)(表1)。利用SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)进行5'和3'RACE克隆。RACE引物如表1所示。PCR产物经纯化,克隆到pEasy-T1载体(TransGen, 中国)并进行测序。

1.3 *hsd11b1l*和*hsd11b2*基因序列的生物信息学分析

通过在线工具SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测了*hsd11b1l*和*hsd11b2*的蛋白质结构。使用AliBaba2.1(<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)对*hsd11b1l*和*hsd11b2*基因启动子区域(转录起始位点上游500 bp和5'UTR区域)进行转录因子结合位点预测。从NCBI下载不同物种的蛋白质序列,然后用根据软件MEGAX使用Neighbor-Joining (NJ)法构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

1.4 半滑舌鲷*hsd11b1l*和*hsd11b2*基因的表达分析

选取各样本高质量的RNA 1 μ g,利用PrimeScript

表 1 实验所用到的引物
Tab.1 Primers used in the experiments

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Utilization
hsd11b1l-F	GCATGGTTGGGGGTCACGGT	Fragment PCR
hsd11b1l-R	GTGCTGGCCCGTACTGTCTGG	Fragment PCR
hsd11b2-F	AGGCCCTGCTAACACCGCAG	Fragment PCR
hsd11b2-R	TTGGTCAGCGGGATCGGCAA	Fragment PCR
hsd11b1l-5-GSP	CCGTTCAAGGTGTGTTTGGTCGAGCTG	RACE
hsd11b1l-5-NGSP	CAACCTGCTGTAACATCGCTTCTC	RACE
hsd11b1l-3-GSP	CCCAGCCACAGACGCAGCCTTGAACA	RACE
hsd11b1l-3-NGSP	GACTGTAACCAAAGACTGGACCCCT	RACE
hsd11b2-5-GSP	GGAGAGTGATGTGTGGGCAATAAAAGGAGG	RACE
hsd11b2-5-NGSP	GGGCTAACCATGACGGGGG	RACE
hsd11b2-3-GSP	GTCATTTCAATTGGTCCTGGCTCCTGCTG	RACE
hsd11b2-3-NGSP	GCTCCCTCCAGAGGTGTAGGCTGT	RACE
hsd11b1-l-qF	AGAGTCTCTCAGAGGAGCCA	qRT-PCR
hsd11b1-l-qR	ACAACCTGCTGTAACATCGC	qRT-PCR
hsd11b2-qF	TCCATCATCCTGCCCTCATC	qRT-PCR
hsd11b2-qR	TGAGGTCTGGGTTAGCTTGG	qRT-PCR
β -actin-qF	GCTGTGCTGTCCCTGTA	qRT-PCR
β -actin-qR	GAGTAGCCACGCTCTGTC	qRT-PCR

RT reagent Kit (Takara, 日本)试剂盒反转录生成 cDNA。设计 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 的荧光定量检测引物(表 1), 进行实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)表达分析。使用 QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 德国)试剂盒, 反应体系为 20 μ l, 分别包含 1 μ l cDNA 模板、10 μ l SYBR Green PCR Master Mix (2 \times)、2 μ l QN ROX Reference Dye 及 0.7 μ mol/L 的正向和反向引物。反应在 ABI StepOnePlus_Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 美国)进行, 程序为 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, +1 $^{\circ}$ C/min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。内参用 β -actin 基因片段 (β -actin-qF/R, 表 1)。每个反应体系设置 3 个技术重复。使用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析 *hsd11b1* 以及 *hsd11b2* 基因在半滑舌鳎雌雄各组织、不同发育时期及温度处理样品中的表达水平(Livak *et al*, 2001; Li *et al*, 2010)。利用 *T*-检验分析显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 克隆和序列分析

通过 RACE 克隆获得半滑舌鳎 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因的 cDNA 全长。*hsd11b1* 的 cDNA 全长为 1650 bp, 包含 97 bp 的 5'UTR 和 689 bp 的 3'UTR, 开放性阅读框(Open Reading Frame, ORF)为 864 bp, 编码 287 个

氨基酸, 蛋白质的分子量为 31.79 kDa, 预测理论等电点(pI)为 7.65(图 1)。启动子区域转录因子结合位点预测分析显示, *hsd11b1* 启动子区域存在 NF-kappaB、AP-1、E2、GATA-1、GR、PR、C/EBPalp、C/EBPbeta、TBP、HNF1、HNF3 等转录因子结合位点。*hsd11b2* 基因的 cDNA 全长为 4526 bp, 包括 1209 bp 的 ORF, 5'UTR 和 3'UTR 长度分别为 403 bp 和 2914 bp, 编码 402 个氨基酸, 预测分子量为 44.5 kDa, 理论等电点为 8.38(图 2)。启动子区域转录因子结合位点预测分析显示, *hsd11b2* 启动子区域包含 GR、TBP、Sp1、Ahr、PR、Sox-2、C/EBPalp、Elk-1、HNF-3、COUP、GATA-1 等转录结合位点。将 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* mRNA 比对到对应 DNA 序列, 显示 *hsd11b1* 包含 6 个外显子, *hsd11b2* 包含 5 个外显子(图 3A)。

2.2 多序列比对和系统进化树分析

利用 SMART 预测了半滑舌鳎 HSD11B1L 和 HSD11B2 的蛋白结构。结果显示, 这 2 个蛋白都存在于 1 个保守的结构域, 为短链脱氢酶(adh_short), 其中, HSD11B1L 还具有信号肽, HSD11B2 包含 2 个跨膜结构域(图 3B)。根据 ExPASy (<https://www.expasy.org/>)的 GOR IV 工具预测 HSD11B1L 和 HSD11B2 蛋白的二级结构, 结果表明, HSD11B2 蛋白的 α -螺旋和无规卷曲含量比 HSD11B1L 高, 而延伸链的比例少。

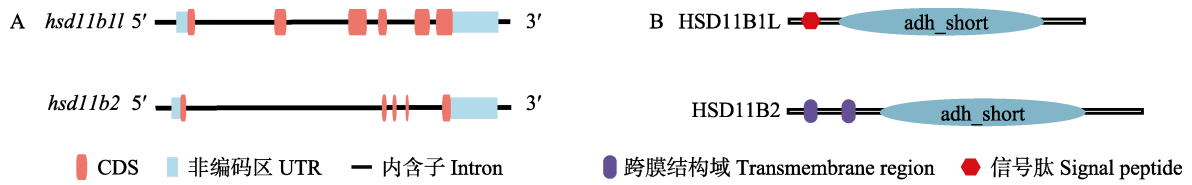


图 3 半滑舌鳎 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 的基因结构分析及蛋白结构域预测

Fig.3 The gene structure analysis and protein domain prediction of *C. semilaevis hsd11b1* and *hsd11b2*

A: 基因结构示意图, 外显子用红色框表示, DNA 序列用黑线表示, UTR 用蓝框表示;

B: HSD11B1L 和 HSD11B2 保守结构域

A: Schematic representation of genomic structure. The exons were represented by red boxes, DNA sequences were indicated by lines, and UTRs were shown as blues boxes; B: The predicted conserved domain of HSD11B1L and HSD11B2

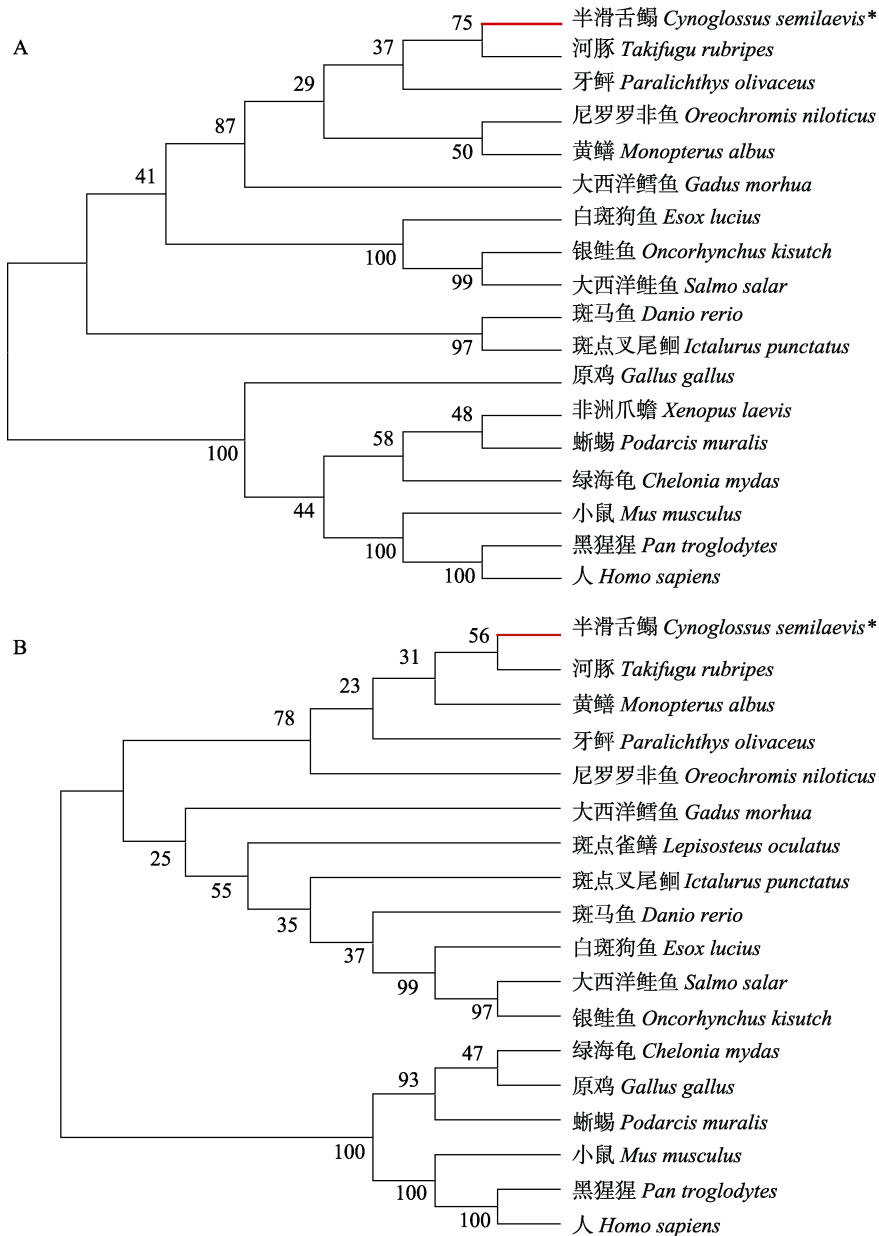
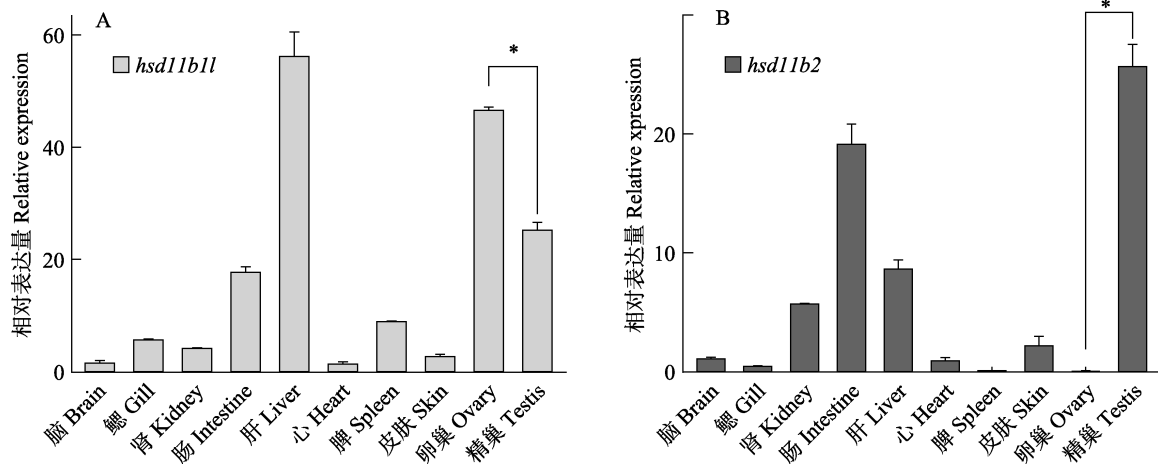


图 4 HSD11B1L 和 HSD11B2 蛋白系统发育树

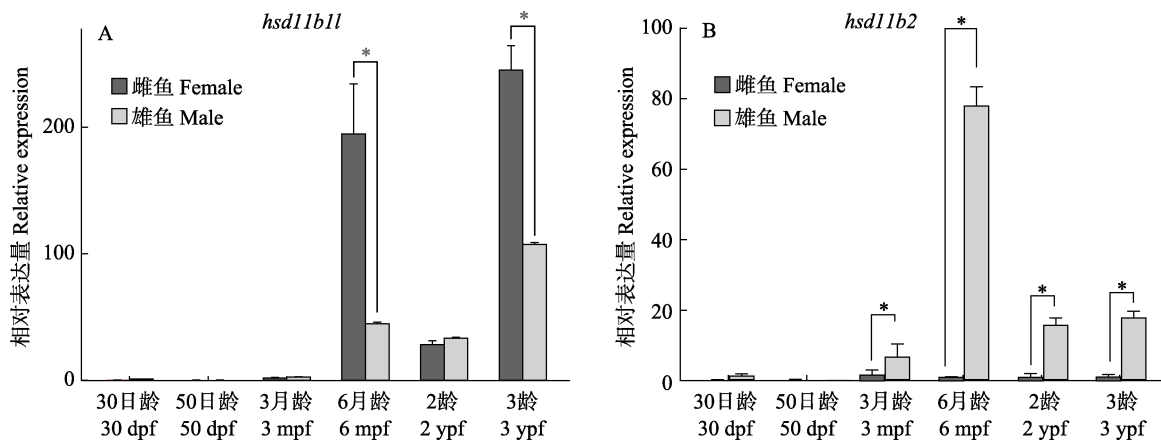
Fig.4 Phylogenetic analysis of HSD11B1L and HSD11B2 proteins

A: HSD11B1L; B: HSD11B2

图 5 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因在半滑舌鲷中的组织表达模式Fig.5 Tissue expression analysis of *hsd11b1* and *hsd11b2* in *C. semilaevis*

数据用 3 个独立个体的 Mean±SE 表示($n=3$)。*表示显著差异。下同

The mean±SE values from three separate individuals ($n=3$) are shown. Asterisks indicate significant differences ($P<0.05$). The same as below

图 6 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 在性腺发育阶段的表达模式Fig.6 The *hsd11b1* and *hsd11b2* expression in gonad development stage

为常温对照组的 25.65% ($P<0.05$), 在雌鱼中的表达量无显著差异(图 7C、D)。

3 讨论

本研究克隆获得了半滑舌鲷 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因的 cDNA 全长, 分析了基因序列特征。研究发现, 2 个基因都含有 1 个保守的短链脱氢酶结构域, 该结构域属于链脱氢酶/还原酶家族(SDR), 是一种重要的氧化还原酶家族(Ghosh *et al*, 1994), 表明 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因在皮质醇的生理过程中具有氧化还原酶的作用。此外, *hsd11b1* 基因启动子序列中包含糖皮质激素受体(GR)、雌激素(E2)、TATA 结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)等转录结合位点,

hsd11b2 启动子区域包含糖皮质激素受体(GR)、雄激素受体(AHR)和 TBP 等转录结合位点。皮质醇是一种糖皮质激素, 可以与糖皮质激素受体结合, 在生长、生殖等生理活动中起到重要作用(Mommsen *et al*, 1999)。在牙鲆、青鳉(*Oryzias latipes*)、牙汉鱼等鱼类中, 皮质醇参与高温诱导雄性化(Hattori *et al*, 2009; Hayashi *et al*, 2010; Yamaguchi *et al*, 2010)。雄激素和雌激素受体可以直接参与鱼类的性别发育调节。TBP 则是一类可以与 RNA 聚合酶 II 共同发挥作用的转录因子, 在精子形成期过量表达, 参与精细胞的形成(Schmidt *et al*, 1997)。

本研究分析了半滑舌鲷 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因的时空表达特征。组织表达结果显示, *hsd11b1*

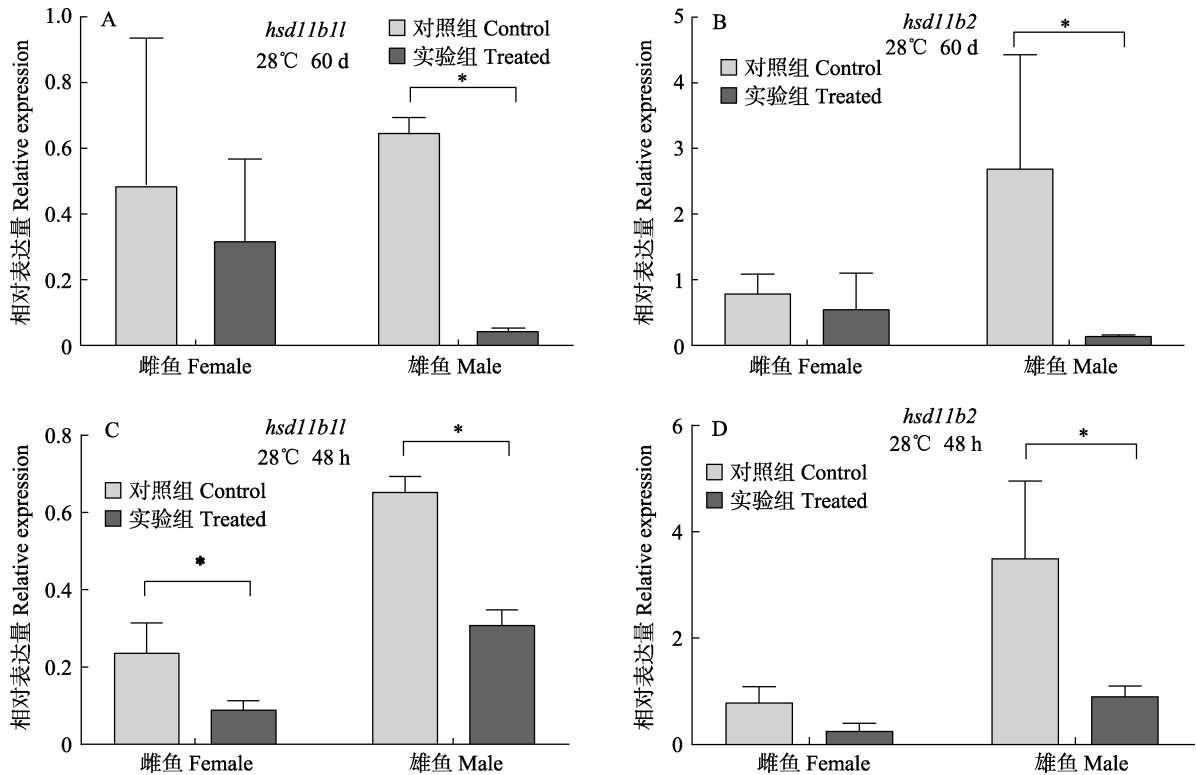


图7 高温(28°C)处理后 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因在性腺中的表达模式

Fig.7 Analysis of *hsd11b1* and *hsd11b2* expression after high temperature treatment (28°C)

基因主要在半滑舌鲷肝脏和性腺中表达,这与其他脊椎动物中的研究结果相似。HSD11B1 是一种还原型酶,可以转化生成大量皮质醇并且增强糖皮质激素的作用,这种酶存在于人类的多种组织器官中,在肝脏、脂肪等关键的代谢组织中非常丰富(White *et al.*, 1997; Tomlinson *et al.*, 2004)。本研究结果显示,半滑舌鲷 *hsd11b1* 于3月龄开始表达,在6月龄和3龄时期鱼的卵巢中显著高于其他时期和精巢。半滑舌鲷在6月龄左右开始分化形成卵母细胞,3龄已进入卵巢发育成熟期,暗示 *hsd11b1* 可能参与半滑舌鲷卵巢发育过程(Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016、2017)。前期研究表明, *hsd11b2* 不仅催化皮质酮向皮质醇的转化过程,还可催化 11-酮雄烯二酮生成 11-酮基睾酮,在雄激素的形成过程中起到至关重要的作用(Oppermann *et al.*, 1997)。牙汉鱼 *hsd11b2* 可通过合成雄激素进而参与雄性化形成(Zhang *et al.*, 2018)。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中, *hsd11b2* 在调节精子发生过程中起到重要作用,其表达模式在雄鱼发育过程中发生显著变化(Liu *et al.*, 2000; Kusakabe *et al.*, 2002)。本研究中,半滑舌鲷 *hsd11b2* 主要在精巢中表达,在卵巢中几乎不表达,也提示该基因在精巢中发挥重要作用。对精巢各发育时期的进一步分析表明, *hsd11b2*

在3月龄开始表达,在6月龄达到峰值,随后在成熟精巢中表达量下降,这一发现与半滑舌鲷精巢细胞分化时间吻合(Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2009),表明 *hsd11b2* 在生殖细胞分化增殖过程中起到重要作用。

在高温处理2个月后, *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 在雄鱼中表达量均显著降低;高温处理48 h后, *hsd11b1* 在雌、雄鱼中表达量均显著降低, *hsd11b2* 在雄鱼中表达量显著降低($P < 0.05$),表明温度可影响皮质醇和皮质酮之间的相互转化。但在牙汉鱼中,高温处理14 d后, *hsd11b2* 表达量升高,与本研究结果相反(Fernandino *et al.*, 2012)。牙汉鱼分析的是 *hsd11b2* 在幼鱼躯干部位的表达变化,包括了肝、肠、性腺等多个组织。根据 *hsd11b2* 的功能及组织表达模式,肝脏也是其发挥作用的主要器官。因此,结果的不同可能反映了不同组织在应对高温时的不同表现。后续将针对 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因在肝脏和不同性腺中的作用机制展开更深入的研究。

综上所述,本研究报道了半滑舌鲷 *hsd11b1* 和 *hsd11b2* 基因的全长序列,分析了它们在性腺发育过程以及高温胁迫后的表达规律,为进一步研究二者在温度介导半滑舌鲷性别分化过程中的机理奠定了基础。

参 考 文 献

- Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, *et al.* Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1994, 105(2): R11–R17
- Alderman SL, Vijayan MM. 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in zebrafish brain: A functional role in hypothalamus-pituitary-interrenal axis regulation. *Journal of Endocrinology*, 2012, 215(3): 393
- Baker M. Evolution of 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1 and 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 3. *Nature Precedings*, 2010: 1
- Blasco M, Fernandino JI, Guilgur LG, *et al.* Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 156(1): 110–118
- Chen SL, Tian YS, Yang JF, *et al.* Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2): 243–251
- Chen SL, Zhang G, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Cui Y, Wang WF, Ma LY, *et al.* New locus reveals the genetic architecture of sex reversal in the Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Heredity*, 2018, 121(4): 319–326
- Cui Z, Liu Y, Wang W, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213
- Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A, *et al.* The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology*, 2012, 153(12): 6003–6011
- Francis RC, Barlow GW. Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(22): 10673–10675
- Francis RC. The effects of bidirectional selection for social dominance on agonistic behavior and sex ratios in the paradise fish (*Macropodus opercularis*). *Behaviour*, 1984, 90(1–3): 25–44
- Ghosh D, Erman M, Wawrzak Z, *et al.* Mechanism of inhibition of 3 α , 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure*, 1994, 2(10): 973–980
- Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, *et al.* Cortisol-induced masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One*, 2009, 4(8): e6548
- Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, *et al.* High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77(8): 679–686
- Hu YC, Chu KF, Hwang LY, *et al.* Cortisol regulation of Na⁺, K⁺-ATPase β 1 subunit transcription via the pre-receptor 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1-like (11 β -hsd11) in gills of hypothermal freshwater milkfish, *Chanos chanos*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 192: 105381
- Jiang L, Li H. Single locus maintains large variation of sex reversal in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2017, 7(2): 583–589
- Krozowski Z. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: Functions and physiological effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 151(1–2): 121–127
- Kusakabe M, Kobayashi T, Todo T, *et al.* Molecular cloning and expression during spermatogenesis of a cDNA encoding testicular 11 β - hydroxylase (p45011 β) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 62(4): 456–469
- Li H, Xu W, Zhang N, *et al.* Two figla homologues have disparate functions during sex differentiation in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1–10
- Li H, Xu W, Zhu Y, *et al.* Characterization and expression pattern of r-spondin1 in *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(8): 772–780
- Li Z, Yang L, Wang J, *et al.* β -actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 89–93
- Liu S, Govoroun M, D'Cotta H, *et al.* Expression of cytochrome p45011 β (11 β -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 75(4–5): 291–298
- 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
- Miura S, Horiguchi R, Nakamura M. Immunohistochemical evidence for 11 β -hydroxylase (p45011 β) and androgen production in the gonad during sex differentiation and in adults in the protandrous anemonefish *Amphiprion clarkii*. *Zoological Science*, 2008, 25(2): 212–219
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1999, 9(3): 211–268
- Oppermann UC, Persson B, Jörnvall H. The 11 β - hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action: Function, gene organization and protein structures of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 249(2): 355–360
- Rubin DA. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 1985, 1985(1): 233–235
- Sadoul B, Geffroy B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, 2019, 94(4): 540–555
- Schmidt EE, Ohbayashi T, Makino Y, *et al.* Spermatid-specific overexpression of the tata-binding protein gene involves recruitment of two potent testis-specific promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(8): 5326–5334
- Tabata K. Reduction of female proportion in lower growing fish separated from normal and feminized seedlings of hirame *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 1995, 61(2): 199–201
- Tokarz J, Norton W, Möller G, *et al.* Zebrafish 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is important for glucocorticoid catabolism in stress response. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54851
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, *et al.* 11 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1: A tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(5): 831–866
- Tsachaki M, Meyer A, Weger B, *et al.* Absence of 11-keto reduction of cortisone and 11-ketotestosterone in the model organism zebrafish. *Journal of Endocrinology*, 2017, 232: 323–335
- van den Hurk R, van Oordt P. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology*, 1985, 57(2): 216–222
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591–625
- White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine Reviews*, 1997, 18(1): 135–156
- Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T, *et al.* Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology*, 2010, 151(8): 3900–3908
- Zhang Y, Hattori RS, Sarida M, *et al.* Expression profiles of *amhy* and major sex-related genes during gonadal sex differentiation and their relation with genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 265: 196–201

(编辑 冯小花)

Molecular Characterization and Expression Patterns of *hsd11b1* and *hsd11b2* and Their Response to High Temperature Stress in Chinese Tongue Sole *Cynoglossus semilaevis*

HAO Xiancai^{1,2}, FENG Bo^{1,2}, SHAO Changwei^{1,2}, WANG Qian^{2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071)

Abstract Sex determination and differentiation in fish are not only influenced by genetic factors, but also controlled by environmental factors. Previous studies have shown that cortisol plays an important role in the feedback of environmental stress in fish. Fish *hsd11b1* and *hsd11b2* can regulate the concentration of cortisol. In this study, we cloned full-length cDNA of *hsd11b1* and *hsd11b2*, and analyzed their sequence characteristics in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). We then detected their spatiotemporal expression characteristics and expression patterns after temperature stress. The full-length cDNA of *hsd11b1* was 1650 bp with 864 bp open reading frame encoding a predicted 287 amino acid protein. While the full-length of *hsd11b2* was 4526 bp with 1209 bp open reading frame encoding 402 amino acid protein. The qPCR showed that the highest expression of *hsd11b1* was within the liver and the expression level in the ovary was two-fold higher than that in testis. In particular, the expression level of *hsd11b1* in the ovary was higher than in testis at the stages of 6 mpf and 3 ypf. The *hsd11b2* was expressed mainly in the testis and expression level peaked in testis at 6 mpf. Conversely, expression of *hsd11b2* was hardly detected in any stages of ovary development. In addition, we analyzed the expression patterns of *hsd11b1* and *hsd11b2* after high-temperature (28°C) treatment. The expression levels of *hsd11b1* and *hsd11b2* was significantly reduced in the gonads of males ($P < 0.05$) after the high-temperature treatment for 2 months. For the acute high-temperature treatment (48 h), the expression of *hsd11b1* significantly decreased in the gonads of both females and males ($P < 0.05$), and the expression of *hsd11b2* was only significantly down-regulated in the male testis ($P < 0.05$). In this study, the expression patterns of *hsd11b1* and *hsd11b2* genes in the developmental stages of gonads affected by high temperature stress lays a foundation for understanding the relationship between temperature and sexual differentiation in Chinese tongue sole.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Sex determination; Temperature; *hsd11b1*; *hsd11b2*

① Corresponding author: WANG Qian, E-mail: wangqian2014@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200724001

http://www.yykxjz.cn/

徐郑鑫, 张鹏飞, 陈四清, 边力, 常青, 王志达. 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼生长、生理指标及肝脏 *hsp70* 基因表达丰度的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 55–62

Xu ZX, Zhang PF, Chen SQ, Bian L, Chang Q, Wang ZD. Effects of feeding frequency on the growth, physiology, and expression abundance of *hsp70* mRNA in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 55–62

投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼生长、生理指标及 肝脏 *hsp70* 基因表达丰度的影响*



徐郑鑫^{1#} 张鹏飞^{2#} 陈四清^{2,3} 边力² 常青^{2①} 王志达⁴

- (1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
4. 青岛悦海湾海洋产业发展有限公司 青岛 266200)

摘要 为探究投喂频率对绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*)幼鱼生长、生理指标及肝脏 *hsp70* 基因表达的影响,本研究设 5 个投喂频率,分别为 1、2、3、4 和 5 次/d(分别简称为 F1、F2、F3、F4 和 F5),每个处理组设 3 个平行,每缸养殖 30 尾鱼[(6.47±0.56) g]。实验期间,水温为 17℃~26℃,盐度为 30~31, pH 为 6.8~7.6,溶解氧≥5 mg/L,养殖周期为 30 d。结果表明,不同投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼的生长、体成分、消化酶和抗氧化酶活性均有影响。随着投喂频率的增加,绿鳍马面鲈幼鱼的摄食和生长均呈上升趋势,F5 组数值最大,摄食率为 3.95%,增重率为 347.19%,特定生长率为 5.07%/d,增重率为 F1 组的 2 倍多。F1 组的肥满度为 1.79,显著低于其他 4 组($P<0.05$);肝体比逐渐升高,F4 和 F5 组的肝体比显著高于其他 3 组($P<0.05$)。增加投喂频率,鱼体的粗蛋白含量呈先升高后降低的趋势,F2 组最高,为 59.82%;粗脂肪含量呈逐渐升高的趋势,F5 组最高,为 31.23%。胰蛋白酶活性随投喂频率增加呈先降低后增加的趋势,F3 组活性最低,为 37.48 U/μg prot;脂肪酶活性逐渐升高,F5 组最高,为 2.67 U/g prot;淀粉酶活性不受投喂频率的影响($P>0.05$)。过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量最高均在 F5 组,分别为 14.71 U/mg prot、250.32 U/mg prot 和 2.73 nmol/mg。肝脏中 *hsp70* 基因的相对表达量不受投喂频率的影响($P>0.05$)。基于绿鳍马面鲈幼鱼的生长性能和生理效应的综合考虑,其最适投喂频率为 3 次/d。

关键词 投喂频率; 绿鳍马面鲈; 生长性能; 生理指标

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0055-08

鱼类的生长受到许多方面的制约,包括饲料类型、粒径、营养含量、投喂量、投喂频率等。其中,投喂频率是一个非常重要的因素,因鱼类自身种类、规格和饲料类型而异(Kubitza *et al*, 1999; Wang *et al*,

* 山东省重点研发计划项目(2019GHY112073)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022017014)和江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19_0996)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Program of Shandong Province, Department of Science & Technology of Shandong Province (2019GHY112073), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017014), and Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX19_0996)].

#共同第一作者: 徐郑鑫, E-mail: 879453952@qq.com; 张鹏飞, E-mail: 1573852630@qq.com

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

收稿日期: 2020-07-24, 收修改稿日期: 2020-08-12

2007)。适宜的投喂频率,可提高鱼类饵料转化率,提高经济和生态效益,减少个体生长差异和水质污染。绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*)在我国的四大海域均有分布(林新濯等,1984),主要生活在水深 60~120 m 处,为外海暖温性底层鱼类(秦忆芹,1981)。其肌肉富含牛磺酸、多不饱和脂肪酸(EPA、DHA),是营养价值极高的健康食品(徐大风等,2018)。在 20 世纪 80 年代前,绿鳍马面鲈在海洋中产量很高,仅次于带鱼(*Trichiurus lepturus*)(许学龙等,1992),但近些年来,由于过度捕捞,其种群密度不断减小,产量严重衰竭,迫切需要进行人工养殖。在绿鳍马面鲈人工育苗方面已获得新的突破,但尚未实现大规模的工厂化养殖。对绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型的研究发现,其最适投喂时间为每天的 09:00~15:00(张鹏飞等,2020),但对其最适投喂频率还需进一步研究。本文通过研究不同投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼的生长性能、全鱼成分、消化酶、抗氧化酶活性及肝脏 *hsp70* 基因表达的影响,以确定其最适投喂频率,可节约养殖成本、提高生产效率、保护环境等。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

绿鳍马面鲈幼鱼购自银泽水产有限公司,养殖实验开展于青岛悦海湾海洋产业发展有限公司。养殖实验开始前,在有效容积为 39.52 m³ (长、宽、高分别为 7.6、6.5、1.5 m)的水泥池中暂养 2 周,使鱼适应养殖环境,恢复体质。暂养期间,每天于 06:00、12:00 和 18:00 饱食投喂 3 次,所用饲料为进口新爱鱼仔商品饲料(为沉性颗粒饲料,粗蛋白 49.86%,粗脂肪 9.68%,灰分 12.65%,水分 8.32%)。养殖用水经砂滤池沉淀后,再经蛋白分离器过滤后使用。

1.2 实验设计和饲养管理

实验设计 5 个处理组,分别为 F1(12:00)、F2(09:00 和 15:00)、F3(06:00、12:00 和 18:00)、F4(06:00、09:00、12:00 和 15:00)、F5(06:00、09:00、12:00、15:00 和 18:00),每个处理组设 3 个重复。选择规格整齐、表观健康的 450 尾鱼[平均体重为(6.47±0.56) g]随机分配到 15 个桶中(有效容积为 400 L),每个桶 30 尾鱼,使用流水养殖的方式进行养殖。实验鱼采用表观饱食投喂法,每天吸污 1 次,换水 1 次,周期为 30 d,期间白天采用自然光照,傍晚 18:00 投喂时开启白炽灯照明,喂完后熄灯。水温为 17℃~26℃,盐度为 30~31,pH 为 6.8~7.6,溶解氧≥5 mg/L。

1.3 样品制备和分析方法

在养殖实验结束后,将实验鱼饥饿 1 d,记录各桶中鱼的重量和数量,计算特定生长率、饲料效率等指标。每桶取 3 尾鱼用来检测全鱼营养成分。然后再从每个实验桶中随机捞出 3 尾绿鳍马面鲈幼鱼,用 MS-222 进行深度麻醉,称重后放在托盘上用尺子测量体长,求肥满度。随后从肛门处剖开腹部,取肝脏和内脏(不包含肝脏),分别称重,求肝体比和脏体比。而后将全肠放入冻存管中,取部分肝脏,分别放入两个冻存管中,-80℃保存,肠道用于测定消化酶活性,肝脏测定抗氧化酶活性和 *hsp70* 基因的表达。

全鱼样品中水分、粗蛋白和粗脂肪含量分别采用烘箱干燥法(105℃)、凯氏定氮仪法和索氏抽提法测定。蛋白定量、消化酶和抗氧化酶活性采用南京建成生物工程研究所生产的相应试剂盒测定。

肝脏中 *hsp70* 基因表达量的测定根据 Vazyme RNA-easyTM Isolation Reagent 试剂盒说明书提取绿鳍马面鲈肝脏的总 RNA,通过电泳检测 RNA 的完整性,Thermo Fisher NanoDrop 测定 RNA 的浓度。使用 TaKaRa Prime ScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,并置于-20℃保存。根据 NCBI 查找绿鳍马面鲈 *hsp70* 基因全长序列,采用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,扩增片段长度为 100~180 bp 之间(表 1),所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

β -actin 和 *hsp70* 基因丰度表达量采用 7500 实时定量 PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行 qPCR 反应。反应程序:95℃,2 min;95℃,10 s;60℃,30 s,共 40 个循环;熔解曲线:95℃,15 s;60℃,60 s;95℃,15 s。反应结束后,确认熔解曲线是否单一,并做标准曲线,计算引物的扩增效率是否在 90%~110%, r^2 在 0.95~1 之间。qPCR 的结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

表 1 实时定量 PCR 引物

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	片段大小 Fragment size(bp)
<i>β-actin</i> F	CGGAATCCACGAGACCACCTAC	139
<i>β-actin</i> R	TGCATCCTGTCGCGCATGC	
<i>hsp70</i> F	CAACCTGATGAAGCTGTG	170
<i>hsp70</i> R	TGGTGGTGTCCGTTTGAT	

1.4 计算公式

$$\text{摄食率(FIR, \%)} = 100 \times F_T / [(W_F + W_I) / 2]$$

$$\text{增重率(WG, \%)} = 100 \times (W_F - W_I) / W_I$$

$$\text{特定生长率(SGR, \% / d)} = 100 \times [\ln W_F - \ln W_I] / T_D$$

饲料效率(FCR, %) = $100 \times W_Z/F_T$

肥满度(CF) = $100 \times W_F/L^3$

肝体指数(HIS, %) = $100 \times W_H/W_F$

脏体指数(VSI, %) = $100 \times W_V/W_F$

W_F 为实验鱼结束时的重量, W_I 为实验鱼初始重量, T_D 为实验天数, L 为实验结束时鱼体的体长, W_H 为鱼体的肝脏重量, W_V 为鱼体的内脏重量, W_Z 为鱼体总增重量, F_T 为总投饲量。

1.5 数据处理与统计分析

实验数据采用 Excel 2016 分析, SPSS 20.0 进行单因素方差(One-way ANOVA)分析, 邓肯多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼生长性能和饲料利用的影响

不同投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼摄食率、增重率、特定生长率和饲料效率的影响见表 2。在投喂频率不断增加的情况下, 绿鳍马面鲈幼鱼的摄食率、增重率和特定生长率都呈现出上升的趋势。F4 和 F5 组之间在摄食率、增重率和特定生长率指标上均不存在显著性差异($P > 0.05$)。在饲料效率方面, F1 组的饲料效率显著高于其他 4 组($P < 0.05$), 其他 4 组之间差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼生长性能和饲料利用的影响(平均值±标准误)

Tab.2 Effects of feeding frequency on growth performance and feed utilization of *T. septentrionalis* juvenile (Mean±SE)

组别 Group	摄食率 FIR(%)	增重率 WG(%)	特定生长率 SGR(%/d)	饲料效率 FCR(%)
F1	2.41±0.02 ^a	138.94±5.27 ^a	2.85±0.04 ^a	113.06±2.91 ^b
F2	2.99±0.04 ^b	179.30±12.92 ^b	3.46±0.10 ^b	105.26±1.12 ^a
F3	3.58±0.04 ^c	266.50±10.75 ^c	4.52±0.04 ^{cd}	106.32±1.45 ^a
F4	3.82±0.12 ^d	323.56±16.04 ^d	4.81±0.21 ^{de}	107.68±0.81 ^a
F5	3.95±0.02 ^d	347.19±10.98 ^d	5.07±0.07 ^e	107.09±1.85 ^a

注: 同一列数值上标英文字母不同, 表示组间有显著差异($P < 0.05$), 下表同

Note: The values in the same column with different superscript indicate significant differences between groups ($P < 0.05$). The same as below

2.2 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼形态指标的影响

不同投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼形态的影响见表 3。结果显示, 在肥满度方面, F1 组显著低于其他 4 组($P < 0.05$), 而其他 4 组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。

在肝体比方面, F4 和 F5 组之间无显著性差异($P > 0.05$), 且显著高于其他 3 组($P < 0.05$)。脏体比不受投喂频率的影响($P > 0.05$)。

表 3 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼形体指标的影响

Tab.3 Effects of feeding frequency on body indices of *T. septentrionalis* juvenile

组别 Group	肥满度 CF	肝体比 HSI(%)	脏体比 VSI(%)
F1	1.79±0.5 ^a	8.87±0.29 ^a	14.57±0.29
F2	2.14±0.37 ^b	8.94±0.29 ^a	14.81±0.29
F3	2.05±0.69 ^b	9.71±0.29 ^a	14.87±0.29
F4	1.98±0.35 ^b	9.97±0.52 ^b	15.37±0.52
F5	2.06±0.16 ^b	10.65±0.12 ^b	14.97±0.12

2.3 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼体成分的影响

投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼体成分的影响见表 4。结果显示, 随着投喂频率的增加, 鱼体粗蛋白在 F1、F2 和 F3 组之间无显著性差异, F4 和 F5 组显著低于其他 3 组($P < 0.05$)。粗脂肪含量随着投喂频率的增加而增加, 而水分含量无显著性差异($P > 0.05$)。

表 4 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼体成分的影响

Tab.4 Effects of feeding frequency on composition of whole-body of *T. septentrionalis* juvenile

组别 Group	粗蛋白 Crude protein (% dry weight)	粗脂肪 Crude lipid (% dry weight)	水分 Moisture(%)
F1	58.53±0.16 ^{bc}	26.38±0.30 ^a	75.90±0.02
F2	59.82±0.66 ^c	26.30±0.41 ^a	75.66±0.85
F3	58.64±0.83 ^{bc}	28.94±0.68 ^{bc}	74.92±0.55
F4	56.90±0.40 ^{ab}	30.01±0.18 ^{bc}	74.19±0.38
F5	55.89±1.18 ^a	31.23±0.76 ^c	73.54±0.20

2.4 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼消化酶的影响

投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼消化酶的影响见表 5。从表 5 可以看出, 当投喂频率不断增加, 肠道胰蛋白酶呈先下降后上升的趋势, 脂肪酶活性呈上升趋势, 而淀粉酶活性无显著性差异($P > 0.05$)。

表 5 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼消化酶活性的影响

Tab.5 Effects of feeding frequency on digestive enzyme activity of *T. septentrionalis* juvenile

组别 Group	胰蛋白酶 Trypsin (U/μg prot)	脂肪酶 Lipase (U/g prot)	淀粉酶 Amylase (U/mg prot)
F1	47.03±0.77 ^c	1.89±0.38 ^a	3.51±0.28
F2	42.64±0.41 ^b	2.11±0.35 ^{ab}	3.95±0.45
F3	37.48±1.48 ^a	2.28±0.38 ^{ab}	3.84±0.50
F4	41.17±0.96 ^c	2.63±0.16 ^b	4.61±0.41
F5	46.87±0.51 ^c	2.67±0.34 ^b	4.01±0.85

2.5 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响见表6。当投喂频率不断增加,肝脏过氧化氢酶无显著变化($P>0.05$);超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量在F5组最高,在F3组最低。

表6 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响
Tab.6 Effects of feeding frequency on liver antioxidant enzyme activity of *T. septentrionalis* juvenile

组别 Group	过氧化氢酶 (U/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD(U/mg prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg)
F1	14.49±1.71	218.87±1.48 ^{ab}	1.93±0.04 ^a
F2	12.06±1.59	204.65±4.53 ^a	2.01±0.04 ^a
F3	14.36±1.61	202.38±4.94 ^a	1.91±0.09 ^a
F4	13.48±0.48	229.77±7.50 ^{bc}	2.42±0.14 ^b
F5	14.71±0.16	250.32±9.44 ^c	2.73±0.09 ^b

2.6 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏中 *hsp70* 基因表达的影响

由图1可知,绿鳍马面鲈幼鱼肝脏中 *hsp70* 基因相对表达量在各组之间差异不显著。

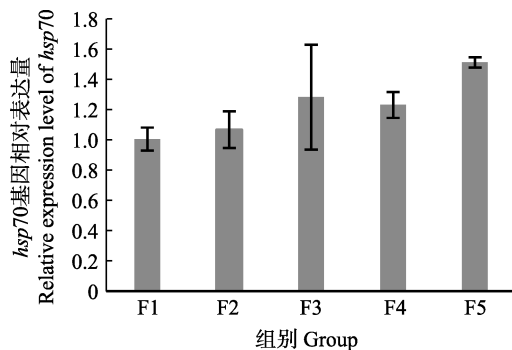


图1 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏中 *hsp70* 基因表达的影响

Fig.1 The effect of feeding frequency on expressions of *hsp70* in liver of *T. septentrionalis* juvenile

3 讨论

3.1 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼生长性能和饲料利用的影响

在一定程度上,提高投喂频率能提高鱼类的生长性能,缩短养殖周期,但超过一定的范围,再增加投喂频率,不会促进鱼类的生长性能,反而对鱼肉的品质有不利的影响(周志刚等,2003)。适宜的投喂频率与鱼种类和规格均有关系。谢苏明等(2020)研究发

现,大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)在0~60 d时,投喂频率从2次/d增加到4次/d,鱼体增重率无显著性差异,而在60~120 d时,随着投喂频率次数的增加,鱼体增重率呈逐渐减小的趋势。邱婷婷等(2019)研究发现,当投喂频率从0.5次/d增加到3次/d时,杂交鲂(*Megalobrama terminalis* Richardson ♀×*Erythroculter ilishaeformis* ♂)增重量显著上升,而从3次/d增加到4次/d时,鱼体增重率、摄食率和饲料系数都没有显著性变化。这与本研究所得结果相似,当投喂频率从1次/d提高到3次/d时,绿鳍马面鲈幼鱼的摄食率、增重率和特定生长率呈现显著性升高,但从4次/d增加到5次/d时,摄食率、增重率、特定生长率和饲料效率均无显著性变化。究其原因可归结为以下两个方面:一是投喂间隔过短会导致肠胃负担过重,排空速度加快,饲料未经完全消化就排出体外,影响营养物质的吸收(Dwyer *et al.*, 2002);二是鱼类过多的摄食行为会消耗部分能量,从而影响生长速度。

研究发现,因鱼的种类和规格的不同,投喂频率与饲料效率之间呈现出不同的关系。有些鱼类如大西洋鳕(*Hippoglossus hippoglossus*)(Schnaittacher *et al.*, 2005)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(鲍积月等,2019)等,随着投喂频率的增加,摄食率增加,饲料效率不受影响。有些鱼类如异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(Zhao *et al.*, 2016)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(Wu *et al.*, 2015)等,随着投喂频率的增加,摄食率和饲料效率也会增加。而有些鱼类,如大吻鲈(*Dicentrarchus labrax*)(Tsevis *et al.*, 1992)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(孙瑞健等,2013),随投喂频率的增加,摄食率增加,饲料效率会降低。这与本研究结果有相似之处,F1组饲料效率显著高于其他4组,而其他4组之间没有显著性差异。

3.2 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼形体指标和体成分的影响

形体指标是评价鱼体能量状态的重要参数,随着摄食量的增加,鱼类获得更多的能量,一部分过剩的能量将蓄积在内脏中,使鱼体的肝体比和脏体比上升。对大杂交鲟(*Huso dauricus* ♀×*Acipenser schrenckii* ♂)(褚志鹏等,2020)和花鲈(*Lateolabrax maculatus*)(王伟等,2018)的研究发现,投喂频率与鱼类的肝体比和脏体比呈正比关系。这和本研究结果有些许不同,绿鳍马面鲈幼鱼仅肝体比随投喂频率的增加出现显著性差异,而脏体比与投喂频率无关,这与子二代中华鲟(*Acipenser sinensis*)的结果相同(管敏等,2019)。当投喂频率不断升高时,许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)

幼鱼(冒树泉等, 2014)肝体比和脏体比呈现降低的趋势, 这可能与鱼种和饲料等有关。

鱼体营养成分决定了鱼肉的品质, 而鱼体的营养成分由品种、生长阶段等内源性因子和食物营养、投喂策略等外源性因子共同决定。不同的投喂频率对鱼体营养成分的影响不一。一般认为, 投喂频率的增加会促进鱼类摄食量, 而过剩的营养物质转化为脂肪储存在鱼体内, 从而导致鱼体脂肪含量上升, 水分含量下降。对杂交魮(邱婷婷等, 2019)、花鲈(王伟等, 2018)和牙鲆(Lee *et al*, 2010)研究发现, 随着投喂频率的增加, 粗脂肪含量逐渐增加, 水分含量逐渐减少。本研究则发现, 投喂频率的增加使绿鳍马面鲈幼鱼粗脂肪含量升高, 粗蛋白含量下降, 水分含量则无显著性变化。这与冒树泉等(2014)对许氏平鲈幼鱼的研究结果相一致。可能是由于投喂频率的不断增加, 绿鳍马面鲈可以获得更多的食物, 未被利用的能量转化成脂肪, 在机体中储存下来, 从而导致水分含量不变, 粗脂肪含量上升, 粗蛋白含量下降; 也可能是受到种类、环境、规格等因素影响, 具体原因还需要进一步研究。

3.3 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼消化酶和肝脏抗氧化酶活性的影响

鱼类消化酶主要指蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶, 这些酶的活性反映了鱼类对饲料营养物质的消化吸收能力(李希国等, 2005)。本研究发现, 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼消化酶活性有显著影响, 随着投喂频率的增加, 幼鱼肠道中胰蛋白酶活力呈先降低后升高的趋势。这与黄斑篮子(*Siganus oramin*)幼鱼(杨育凯等, 2020)、灰海马(*Hippocampus erectus*)(席寅峰等, 2013)等的结果一致。推测原因可能是由于投喂频率低, 导致摄食量不足, 机体需要产生大量的胰蛋白酶, 充分吸收利用营养物质, 这可能也是 1 次/d 组的饲料效率较高的原因; 当摄食量增加后, 机体只需要产生少量消化酶即可消化所需营养物质; 而当摄食量过多后, 食物对其机体产生一定的负担, 需要提高胰蛋白酶来充分利用营养物质。脂肪酶活性随着投喂频率的增加而增加, 这正好印证了全鱼营养成分中粗脂肪含量不断上升的趋势, 表明绿鳍马面鲈可能对脂肪有较好的利用能力。

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内一种重要的抗氧化酶, 能够催化超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)歧化生成过氧化氢(H_2O_2)和氧(O_2), 再由过氧化氢酶(CAT)把生成的过氧化氢转化成对机体无害的水和氧气, 共同保护机体免受损伤, 其酶活性的变化可以反映机体的免疫水平(饶玉才等, 2009)。丙二醛(MDA)是一种衡量自

由基与抗氧化系统平衡的指标, 当机体过氧化时, 丙二醛含量不断增加, 加速组织和细胞的损伤。对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究发现, 投喂频率在 1 次/3 d~1 次/1 d 时, 肝脏中丙二醛、超氧化物歧化酶和总抗氧化能力的差异不显著(刘淑兰等, 2019)。这与本研究结果相似, 投喂频率在 1~3 次/d 时, 超氧化物歧化酶和丙二醛的活性差异均不显著, 表明机体处于健康状态; 但投喂频率由 3 次/d 增加到 5 次/d 时, 超氧化物歧化酶和丙二醛均显著上升, 表明此时机体受到了胁迫。

3.4 投喂频率对绿鳍马面鲈幼鱼肝脏中 *hsp70* 基因表达的影响

hsp70 是热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs)家族中最为重要的一员。细胞在热休克、缺氧、低温、营养缺乏等应激条件下, 也能生成 HSPs, 因此, 也称为应激蛋白。*hsp70* 基因在硬骨鱼类的肝脏中具有高表达量, 如草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(林亚秋等, 2009)、淞江鲈(*Trachidermus fasciatus*)(刘庆全, 2013)、达氏鳊(*Huso dauricus*)(Peng *et al*, 2016)和杂交黄颡鱼(黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* ♀×瓦氏黄颡鱼 *Pelteobagrus vachelli* ♂)(朱凌威等, 2020)。这可能是因为在动物的消化、代谢、免疫和体内环境调节等方面都起到了十分重要的作用。朱凌威等(2020)研究发现, 水温从 20℃ 升高至 28℃ 时, 杂交黄颡鱼的肝脏、鳃、脑和肌肉中 *hsp70* 基因表达量显著上升。刘伟(2018)研究发现, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在养殖 10 d 时, 不同的投喂频率对肝脏中 *hsp70* 基因表达均有显著影响, 而在 20、30、40 d 时, 则无显著影响。本研究中, 随着投喂频率的增加, 鱼体肝脏中 *hsp70* 基因表达量无显著差异($P>0.05$), 但 F3、F4 和 F5 组高于 F1 和 F2 组。可能原因有两个: 一是取样时水温过低, 导致 *hsp70* 基因表达量整体下降, 进而导致各组之间差异不显著; 二是随着养殖天数的增加, 鱼体抗应激能力也相应增加。具体原因还需要进一步探究。

4 结论

综上所述, 养殖周期为 30 d, 投喂频率对初始体重为(6.47±0.56)g 的绿鳍马面鲈幼鱼在生长、形体、体成分、消化酶和抗氧化酶活性方面均有影响。考虑生长和形体, 投喂频率为 4~5 次/d 最好; 而考虑体成分和抗氧化酶活性, 3 次/d 最好。综合考虑绿鳍马面鲈幼鱼的生长、健康、生态效益和经济效益, 建议其幼鱼投喂频率为 3 次/d。

参 考 文 献

- Bao ZY, Wu LX, Chen J, *et al.* Effects of different feeding frequencies on growth and energy budget of *Paralichthys olivaceus*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(3): 198–200 [鲍积月, 吴立新, 陈晶, 等. 不同投喂频率对牙鲆生长及能量收支的影响. *现代农业科技*, 2019(3): 198–200]
- Chu ZP, Jin JL, Chen XH, *et al.* Effects of different feeding rates and frequencies on the growth performance, body composition, and biochemical parameters of juvenile hybrid sturgeon. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 177–185 [褚志鹏, 金佳利, 陈细华, 等. 不同投喂率和投喂频率对大杂交鲟幼鱼生长、体成分和生化指标的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(2): 177–185]
- Dwyer KS, Brown JA, Parrish C, *et al.* Feeding frequency affects food consumption, feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). *Aquaculture*, 2002, 213(1–4): 279–292
- Guan M, Zhang DZ, Rao J. *et al.* Effects of satiation feeding frequency on growth and gastrointestinal evacuation characteristic of juvenile F₂ Chinese sturgeon. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(4): 90–97 [管敏, 张德志, 饶军, 等. 饱食投喂频率对子二代中华鲟稚鱼生长及胃肠排空的影响. *淡水渔业*, 2019, 49(4): 90–97]
- Kubitza F, Lovshin LL. Formulated diets, feeding strategies, and cannibalism control during intensive culture of juvenile carnivorous fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 1999, 7(1): 1–22
- Lee SM, Pham MA. Effects of feeding frequency and feed type on the growth, feed utilization and body composition of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): 166–171
- Li XG, Li JR, Ou YJ. Comparative studies on the digestive enzymes activity in different parts of the alimentary canal in Yellowfin black porgy *Sparus latus* Houttuyn. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 36–40 [李希国, 李加儿, 区又君. 黄鳍鲷主要消化酶活性在消化道不同部位的比较研究. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 36–40]
- Lin XZ, Gan JB, Zheng YJ, *et al.* Study on the migration and distribution of *Navodon septentrionalis*. *Marine Fisheries*, 1984(3): 99–108 [林新濯, 甘金宝, 郑元甲, 等. 绿鳍马面鲈洄游分布的研究. *海洋渔业*, 1984(3): 99–108]
- Lin YQ, Zheng YC, Ji H. Cloning of HSP70 partial cDNA sequence and its tissue differential expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(4): 67–71 [林亚秋, 郑玉才, 吉红. 草鱼 HSP70 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异. *淡水渔业*, 2009, 39(4): 67–71]
- Liu QQ. A preliminary study of roughskin sculpin (*Trachideraus fasciatus* Heckel) HSP70 sequence cloning and expression. Master's Thesis of Fudan University, 2013 [刘庆全. 淞江鲈 (*Trachidermus fasciatus* Heckel) HSP70 全序列的克隆及其表达的初步研究. 复旦大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Liu SL, Sun GX, Li J, *et al.* Effects of feeding frequency on growth and some physiological indices in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Fisheries Science*, 2019, 38(3): 341–346 [刘淑兰, 孙国祥, 李杰, 等. 投喂频率对大西洋鲑生长和生理指标的影响. *水产科学*, 2019, 38(3): 341–346]
- Liu W. Effects of dietary protein level and feeding strategy on growth and health of genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 [刘伟. 饲料蛋白质水平与投喂策略对吉富罗非鱼生长和健康的影响研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2018]
- Mao SQ, Zou MY, Wang CS, *et al.* Optimal feeding frequency for *Sebastes schlegeli* juveniles. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2379–2385 [冒树泉, 邹明好, 王春生, 等. 许氏平鲉幼鱼适宜投喂频率的研究. *动物营养学报*, 2014, 26(8): 2379–2385]
- Peng G, Zhao W, Shi Z, *et al.* Cloning HSP70 and HSP90 genes of kaluga (*Huso dauricus*) and the effects of temperature and salinity stress on their gene expression. *Cell Stress & Chaperones*, 2016, 21(2): 349–359
- Qin YQ. Study on the feeding habits of *Thamnaconus septentrionalis* in the East China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 1981(3): 245–251 [秦忆芹. 东海海外海绿鳍马面鲈摄食习性的研究. *水产学报*, 1981(3): 245–251]
- Qiu TT, Wang XJ, Ma HJ, *et al.* Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, digestive enzyme activity and body composition of hybrid bream. *Hubei Agricultural Sciences*, 2019, 58(8): 105–109 [邱婷婷, 王秀娟, 马恒甲, 等. 投喂频率对杂交鲂生长、饲料利用、消化酶活性及鱼体生化组成的影响. *湖北农业科学*, 2019, 58(8): 105–109]
- Rao YC, Hu BQ, Wen CG. The changes of five immune enzymes from *Anodonta woodiana* infected with *Aeromonas Hydrophila*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(3): 406–412 [饶玉才, 胡宝庆, 文春根. 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌 5 种免疫相关酶活性的影响. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 406–412]
- Schnaittacher G, King W, Berlinsky DL. The effects of feeding frequency on growth of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research*, 2005, 36(4): 370–377
- Sun RJ, Zhang WB, Xu W, *et al.* Effects of dietary protein level and feeding frequency on the growth performance, body composition and protein metabolism of juvenile large yellow croakers, *Pseudosciaena crocer* R. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 281–289 [孙瑞健, 张文兵, 徐玮, 等. 饲料蛋白质水平与投喂频率对大黄鱼生长、体组成及蛋白质代谢的影响. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 281–289]
- Tsevis N, Klaoudatos S, Conides A. Food conversion budget in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns. *Aquaculture*, 1992, 101(3–4): 293–304

- Wang W, Zhang KQ, Wen HS, *et al.* Effects of feeding frequency on gastric evacuation, growth performance and body composition of juvenile *Lateolabrax maculatus*. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(6): 55–62 [王伟, 张凯强, 温海深, 等. 投喂频率对花鲈幼鱼胃排空、生长性能和体组分的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(6): 55–62]
- Wang Y, Kong LJ, Li K, *et al.* Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. *Aquaculture*, 2007, 271(1): 350–356
- Wu Y, Han H, Qin J, *et al.* Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, body composition and waste output of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) reared in net pens. *Aquaculture Research*, 2015, 46(6): 1436–1443
- Xi YF, Zhang D, Shi ZH. Effects of feeding frequency on the growth, food efficiency and digestive enzyme activity of *Hippocampus erectus* after sex differentiation. *Marine Fisheries*, 2013, 35(1): 77–85 [席寅峰, 张东, 施兆鸿. 投喂频率对雌雄分化后灰海马生长发育、饵料转换效率及消化酶活力的影响. *海洋渔业*, 2013, 35(1): 77–85]
- Xie SM, Wang YY, Nie ZJ, *et al.* Effects of feeding frequency on the growth, physiology and expression abundance of IGF-I and GH mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(4): 363–374 [谢苏明, 王裕玉, 聂志娟, 等. 投喂频率对池塘工程化循环水养殖大口黑鲈生长、生理及肝脏 GH、IGF-I 基因表达丰度的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(4): 363–374]
- Xu DF, Liu K, Wang PF, *et al.* Analysis of nutritional composition in the muscle of *Thamnaconus septentrionalis*. *Marine Sciences*, 2018, 42(5): 122–129 [徐大风, 刘琨, 王鹏飞, 等. 绿鳍马面鲈肌肉营养成分分析和营养评价. *海洋科学*, 2018, 42(5): 122–129]
- Xu XL, Zheng YJ, Liu S. Resource assessment of *Thamnaconus septentrionalis* in the East and Yellow Seas. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1992, 23(6): 651–656 [许学龙, 郑元甲, 刘松. 东、黄海绿鳍马面鲈的资源评估. *海洋与湖沼*, 1992, 23(6): 651–656]
- Yang YK, Huang XL, Lin HZ, *et al.* Optimal feeding frequency for juvenile *Siganus oramin*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(4): 1809–1816 [杨育凯, 黄小林, 林黑着, 等. 黄斑篮子鱼幼鱼适宜投喂频率的研究. *动物营养学报*, 2020, 32(4): 1809–1816]
- Zhang PF, Chang Q, Chen SQ, *et al.* Diet feeding rhythm and analysis of gastric evacuation associated mathematical models in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 104–111 [张鹏飞, 常青, 陈四清, 等. 绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 104–111]
- Zhao S, Han D, Zhu X, *et al.* Effects of feeding frequency and dietary protein levels on juvenile allogynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) var. CAS III: Growth, feed utilization and serum free essential amino acids dynamics. *Aquaculture Research*, 2016, 47(1): 290–303
- Zhou ZG, Jie SQ, Cui YB. Research on fish feeding system. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2003(5): 15–17 [周志刚, 解绶启, 崔奕波. 鱼类投喂系统的研究. *中国畜牧兽医*, 2003(5): 15–17]
- Zhu LW, Zhang CY, Liu Z, *et al.* Cloning, expression of *hsp70* core cDNA and the effects of heat stress on its tissue expression in *Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 47–55 [朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 等. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 47–55]

(编辑 冯小花)

Effects of Feeding Frequency on the Growth, Physiology, and Expression Abundance of *hsp70* mRNA in Juvenile *Thamnaconus septentrionalis*

XU Zhengxin^{1#}, ZHANG Pengfei^{2#}, CHEN Siqing^{2,3}, BIAN Li², CHANG Qing^{2①}, WANG Zhida⁴

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005;

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

3. Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Qingdao Yuehaiwan Marine Industry Development Co., Ltd., Qingdao 266200)

Abstract The effects of five different feeding frequencies on the growth performance, physiological index, and hepatic heat shock protein 70 (*hsp70*) gene expression levels of juvenile *Thamnaconus septentrionalis* [body weight of (6.47±0.56) g] were studied. The experiment design included 5 feeding frequencies, namely 1, 2, 3, 4, and 5 times/d (referred to as F1, F2, F3, F4, and F5 respectively), and each treatment group was designed with 3 parallels, and each tank was cultured 30 fish. The experimental period was 30 days and water temperature range was 17°C~26°C, the salinity was 30~31, the pH was 6.8~7.6, and the dissolved oxygen was ≥ 5 mg/L. Results showed that under different feeding frequency conditions, the growth, body composition, digestive enzymes, and antioxidant enzyme activities of the juvenile *T. septentrionalis* were affected. With the increase in feeding frequency, the feeding and growth of *T. septentrionalis* showed an upward trend. The F5 group had the largest value, with a feeding rate of 3.95%, a weight gain rate of 347.19%, a specific growth rate of 5.07%/d. The weight gain rate of the F5 group exceeded twice the value of the F1 group. The condition factor of the F1 group was 1.79, which was significantly lower than that of the other four groups ($P < 0.05$). The hepatosomatic index gradually increased, and the F4 and F5 groups exhibiting significantly higher values than the other three groups ($P < 0.05$). With an increase in the feeding frequency, the crude protein content of the experimental fish showed a trend of first increasing and then decreasing: F2 showed the highest crude protein content of 59.82%, and the crude lipid content showed a gradually increasing trend: F5 was the highest with a crude lipid content of 31.23%. Trypsin activity showed a trend of first decreasing and then increasing with the increase in feeding frequency. The F3 group had the lowest activity of 37.48 U/ μ g prot; lipase activity gradually increased, and the F5 group showed the highest activity of 2.67 U/g prot; amylase activity was not affected by the feeding frequency ($P > 0.05$). Catalase activity, superoxide dismutase activity, and the content of malondialdehyde were the highest in the F5 group, at 14.71 U/mg prot, 250.32 U/mg prot, and 2.73 nmol/mg, respectively. The relative expression levels of the *hsp70* gene in the liver was not affected by the feeding frequency ($P > 0.05$). Based the findings of this study and the comprehensive consideration of the growth performance and physiological indices of *Thamnaconus septentrionalis*, the optimal feeding frequency for this species was determined to be 3 times/d.

Key words Feeding frequency; *Thamnaconus septentrionalis*; Growth performance; Physiological index

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200202001

http://www.yykxjz.cn/

高进, 杨润清. 大菱鲆体重和体尺性状联合 GWAS 分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 63-70

Gao J, Yang RQ. Joint genome-wide association study of body mass and morphological traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 63-70

大菱鲆体重和体尺性状联合 GWAS 分析*



高进^{1,2} 杨润清^{1,2}①

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院生物技术研究中心 北京 100141)

摘要 为了揭示大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体重和体尺性状的分子遗传机制,探寻用于改良目标性状的分子标记及候选基因,本研究以大菱鲆育种群体为研究对象,分别测量其体重、体长、体宽和尾柄宽性状的表型值,利用简化基因组测序技术(2b-RAD)获得相应基因型数据,进行全基因组关联研究(Genome-wide association study, GWAS),筛选与大菱鲆体重和体尺性状显著关联的数量性状核苷酸(Quantitative trait nucleotides, QTNs)遗传位点。结果显示,以多性状线性混合模型(mvLMM)对体重-体长和体长-体宽-尾柄宽 2 个性状组合进行多性状 GWAS 分析,分别检测到 9 个和 2 个一因多效 QTNs;以单一性状线性混合模型(LMM)对各个性状进行 GWAS 分析,在体重性状中检测到 4 个与之显著关联的 QTNs,在体长和体宽性状中各检测到 1 个 QTN,而在尾柄宽性状中则没有检测到显著的遗传位点。比较 2 种模型的结果,发现 mvLMM 相较于 LMM 能够检测到更多 QTNs,且检测到的 QTNs 为更具生物学意义的一因多效 QTNs。本研究首次利用 mvLMM 和 LMM 对大菱鲆体重和体尺性状进行联合 GWAS 分析,共筛选到 17 个显著的 QTNs,其中,有 4 个 QTNs 被重复检测到。以这些检测到的 QTNs 为探针,在大菱鲆全基因组上找到了距离其最近的 12 个候选基因,它们可能是影响大菱鲆体重和体尺性状的重要候选标记和功能基因,本研究为大菱鲆体重和体尺性状的分子标记辅助选育提供了理论素材和参考。

关键词 大菱鲆; 体重和体尺性状; 全基因组关联分析; 多性状线性混合模型

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)02-0063-08

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 俗称“欧洲比目鱼”或“多宝鱼”, 是中国北部沿海地区重要的海水养殖经济鱼类。大菱鲆具有生长速度快、肉质鲜美以及抗逆性强等诸多优点, 其养殖区域迅速扩展、产量产值不断攀升(雷霖霖等, 2002、2005)。然而, 随着工厂化养殖规模和集约化程度的扩大, 特别是种质资源的退化, 成活率低、病害严重和生产缓慢等问题逐渐

显现(李杰等, 2019; 王岚等, 2017)。因此, 开展大菱鲆相关经济性状的选育研究, 培育具有强抗逆性和高生长性能的新品种对大菱鲆产业发展具有重要意义。传统的育种方法是基于目标性状的表型值来开展选育工作(Hulata, 2001), 对于高生长性能品种选育, 通常挑选符合标准的个体进行群体混养或是建立多个家系并选择优良的家系作为亲本用于进一步选育。然

*中国水产科学研究院基本科研业务费项目“鲆鲽鱼分子标记辅助配套选育技术”(2017A001)资助 [This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017A001)]. 高进, E-mail: gaojin427@126.com

① 通讯作者: 杨润清, 研究员, E-mail: runqingyang@cafs.ac.cn

收稿日期: 2020-02-02, 收修改稿日期: 2020-02-19

而,分子生物学和基因组学的快速发展则促使鱼类育种研究由传统选育和杂交育种向基于基因组信息的分子育种转变(Xu *et al.*, 2015),如以基因定位和数量性状位点(Quantitative trait locus, QTL)作图为基础的分子标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)育种(Wang *et al.*, 2015; 刘晓菲等, 2019)。利用目标性状与分子标记间的显著关联性,依据标记对后代个体进行全基因组选择或是综合标记与表型信息构建选择指数筛选个体,加速育种过程,提高选育效率。

随着测序成本的下降与高通量基因分型技术的迅猛发展,基于海量单核苷酸多态性(Single-nucleotide polymorphisms, SNP)标记的全基因组关联分析(Genome-wide association studies, GWAS)已取代利用稀疏遗传标记的 QTL 定位,成为鉴定与目标性状显著关联的遗传变异的主要方法。早期 GWAS 研究主要针对单一性状表型(Yu *et al.*, 2006; Burton *et al.*, 2007),而在进行复杂性状的遗传解析且记录有多个相关性状表型值时,考虑多个性状联合信息的多性状 GWAS 策略通常要优于逐个性状与遗传位点间的关联分析(Kim *et al.*, 2009; Bolormaa *et al.*, 2010)。相较单一性状 GWAS 分析,表型具有潜在相关性的多性状 GWAS 分析更具优势,主要是因为:当不同性状间存在遗传相关时,因考虑了单一性状分析中忽略的性状间协方差,多性状分析提高了检验功效(Stephens, 2013)和参数估计的精度(Zhu *et al.*, 2009);在多性状 GWAS 分析过程中,数量性状核苷酸(Quantitative trait nucleotides, QTNs)的统计推断只进行一次统计检验,与逐个性状单独分析相比,降低了多重检验造成的误差(Klei *et al.*, 2008);存在基因多效性时,单个遗传变异与多个性状相关联,使得多性状 GWAS 分析更具生物学意义(Chavali *et al.*, 2010);Porter 等(2017)综合比较了当下流行的多性状 GWAS 分析方法,发现大多数现存的多性状 GWAS 分析方法具有明显相似的统计检验功效,与单一性状 GWAS 相比,能够大幅增加显著遗传变异的检测效率。

本研究采用实验成本较低的简化基因组(2b-RAD)测序技术进行 SNP 分型,基于多性状线性混合模型对体重-体长和体长-体宽-尾柄宽共 2 种多性状相关表型组合进行全基因组关联分析,关联定位控制这些性状的一因多效 QTNs,为大菱鲂的体重和体尺性状改良提供理论基础。此外,对逐个性状进行了单一性状线性混合模型 GWAS 分析,并将其结果与多性状 GWAS 分析结果进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验群体及表型测量

实验用鱼共 585 条,取自 29 个全同胞家系组成的大菱鲂育种群体,4 月龄时,对群体中所有大菱鲂个体注射电子标记,并提取鳍条组织 DNA 用于后续的 2b-RAD 测序。随后,将标记后的大菱鲂随机混养在 2 个 6 m×6 m×1.5 m 具有循环水养殖系统的水泥池中,控制水温在 5℃~24℃,每天定时投喂商用饵料 2 次至饱食。实验用鱼按孵化日期至表型测量时的生长天数为 275~1001 d 不等。对实验用鱼进行 11 次不定期表型测量,每次测量前利用 50 mg/ml MS-222 鱼用安定剂麻醉待测大菱鲂个体,避免应激反应造成的鱼体损伤。利用电子秤称量每个个体的体重(Body weight, g, BM)性状,同时在统一的参考标尺下,用数码相机由固定高度向下垂直拍摄相应个体的体尺性状。根据拍摄图形,利用 ImageJ 软件标定每条大菱鲂的体长(Body length, cm, BL)、体宽(Body width, cm, BW)和尾柄宽(Caudal peduncle width, cm, CPW)共 3 个体尺性状的表型值。采用简化基因组 2b-RAD 高通量标记分型技术对具有表型测量记录的个体进行 SNP 分型,共获得 30049 个多态 SNP 分子标记,参考大菱鲂基因组(ASM318616v1)建立多态标记物理图谱。挑选生长周期为 473 d 左右(前后皆不超过 5 d)大菱鲂个体的表型观测值作为多性状 GWAS 分析的表型值,使用 PLINK v1.9 (<http://www.cog-genomics.org/plink2>)对相应样本个体的基因型数据进行质量控制。剔除低于 90%最小检出率的个体以及最小检出频率低于 95%、最小哈代温伯格平衡为 1.0×10^{-6} 、最小等位基因频率小于 3%和方差变异大于 0.05 的 SNPs,最终得到 441 个样本的 23988 个 SNP 标记用于全基因组关联分析。

1.2 关联统计分析

本研究使用 GEMMA 软件(Zhou *et al.*, 2014)中的多性状线性混合模型(Multivariate linear mixed model, mvLMM)进行多个性状表型值和 SNPs 标记的全基因组关联分析,所用模型为:

$$Y = WA + x\beta + G + E$$

式中, Y 为 $n \times t$ 维表型矩阵, n 是样本个数, t 是分析性状个数; W 为 $n \times c$ 维协变量(非遗传固定效应,如性别、年龄等)矩阵, A 为 c 维相应系数行向量, c 是包含截距项在内的协变量个数; x 为 n 维当前检验

SNP 的基因型指示变量列向量, β 为 t 维当前检验 SNP 的加性遗传效应行向量; G 为 $n \times t$ 维不包括当前检验 SNP 的剩余多基因效应矩阵, $G \sim MN(0, V_g \otimes K)$, K 是由全基因组 SNP 标记构建的基因组亲缘关系矩阵, V_g 是 $t \times t$ 维剩余多基因方差-协方差矩阵; E 为 $n \times t$ 维误差项矩阵, $E \sim MN(0, V_e \otimes I)$, V_e 是 $t \times t$ 维误差方差-协方差矩阵, I 是单位矩阵。

最终, 全基因组上每个 SNP 都能得到 1 个一因多效 Wald 统计量和相对应的统计概率 P 值。此外, 还利用因子谱分解线性混合模型(Factored spectrally transformed linear mixed model, FaST-LMM) (Lippert *et al.*, 2011) 逐个性状进行单一性状的 GWAS 分析, 检测与各个性状相关联的 QTNs。使用 R 语言绘制曼哈顿和 Quantile-Quantile (QQ) 图, 同时, 统计用于判别群体分层影响大小的膨胀系数或称基因组控制 (Genomic control, GC) 值, 在实际研究中 GC 值被定义为所有 SNP 标记的卡方统计量均值 (Price *et al.*, 2010)。

1.3 遗传参数估计和基因注释

将质量控制后的基因型数据用 PLINK 软件 (Chang *et al.*, 2015) 处理为分析所需的格式, 再利用单性状约束最大似估计法 (Restricted maximum likelihood,

REML) 逐个估计各性状的遗传参数。查找关联分析得到的显著 SNP 位点在全基因组上所处的物理位置, 于大菱鲆全基因组 (GCA_003186165.1) 上选择距离其最近的候选基因进行注释分析。

2 结果

2.1 表型值的描述性统计

选取生长天数为 473 d 左右的 441 条大菱鲆的体重、体长、体宽和尾柄宽 4 个性状进行联合 GWAS 分析。4 个性状的表型频数分布见图 1。从图 1 可以看出, 各个性状的表型值基本都符合正态分布, 具有一定的可靠性, 适合后续的 GWAS 分析。各性状的原始表型的统计分析和遗传力估计值见表 1。此外, 还对原始以及校正了性别、池子和测定日期等非遗传固定效应后的表型值进行了性状间的相关分析, 发现各性状表型值间具有较强的相关性 (表 2)。

2.2 GWAS 分析结果

根据质量控制结果, 441 条大菱鲆的 23988 个 SNPs 被用于体重和体尺性状的联合 GWAS 分析, 分别进行了 BM-BL 和 BL-BW-CPW 两个性状组合的多

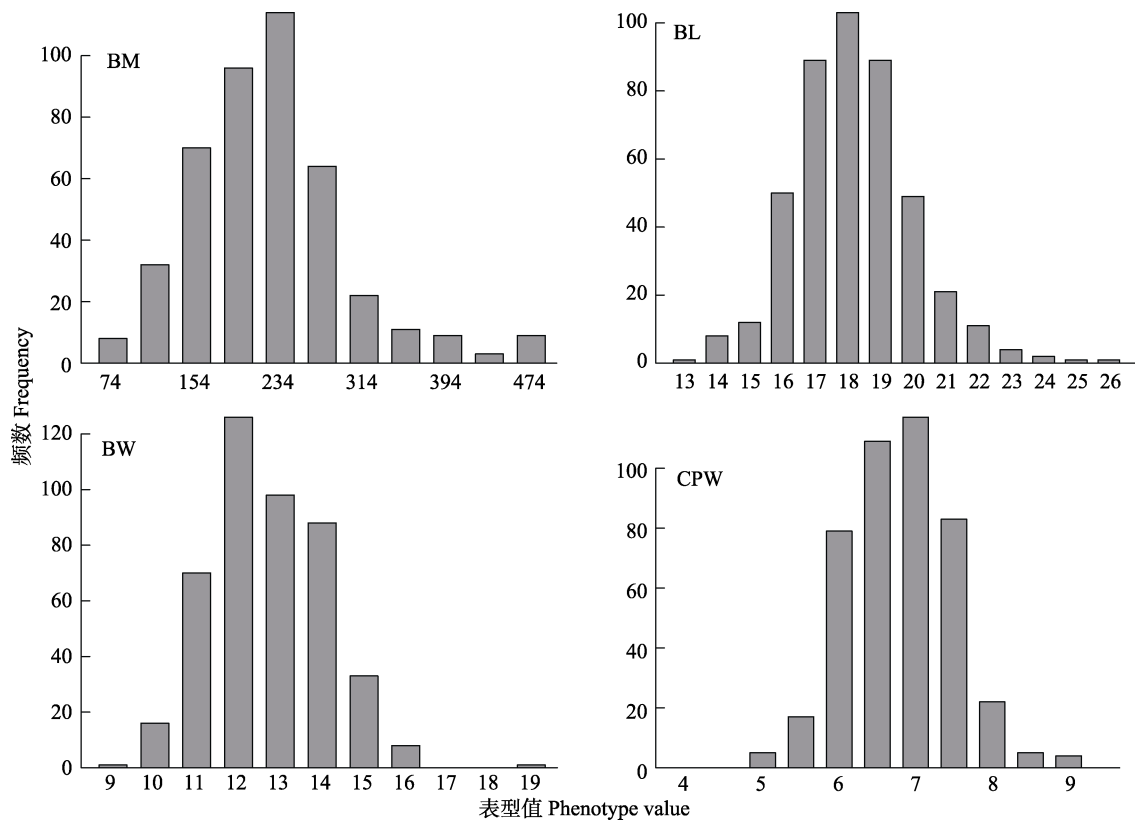


图 1 4 个性状的频数分布

Fig.1 Frequency distribution histograms of four traits

表1 大菱鲂体重和体尺性状的描述性统计
Tab.1 Descriptive statistics of body weight and morphological traits in turbot

参数 Parameter	性状 Trait			
	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体宽 Body width (cm)	尾柄宽 Caudal peduncle width (cm)
最大值 Maximum	541.60	26.71	9.16	3.62
最小值 Minimum	74.40	13.69	4.45	1.58
平均值 Mean	245.72	18.69	6.53	2.53
标准误 SE	1.77×10^{-1}	1.04×10^{-3}	1.51×10^{-3}	7.78×10^{-4}
变异系数 VC	0.32	0.10	0.10	0.14
遗传力 Heritability	0.72	0.58	0.59	0.48

性状线性混合模型以及逐个性状的单一性状线性混合模型 GWAS 分析。对 BM-BL 两个性状的多性状 GWAS 分析后(图 2 和表 3)发现, 超过基因组显著水平(5% Bonferroni 校正阈值, 即 2.084×10^{-6})的 QTN 位点共 9 个, 其中, 各有 1 个显著 QTN 位于 1、10 和 20 号染色体上, 即 SNP_1_31495825、SNP_10_6893888 和 SNP_20_18773114, 分别有 2 个显著 QTNs 位于 3 (SNP_3_21601589 与 SNP_3_24007357)、5(SNP_5_25635891 与 SNP_5_26888833)和 22(SNP_22_6190492 与 SNP_22_6380029)号染色体上。而在相同显著水准下, BL-BW-CPW 3 个体尺性状的 GWAS 分

表2 大菱鲂体重和体尺性状相关程度
Tab.2 Degree of correlation for body mass and morphological traits in turbot

相关系数 Correlation coefficient	体重 Body weight	体长 Body length	体宽 Body width	尾柄宽 Caudal peduncle width
体重 Body weight	1	0.759	0.801	0.662
体长 Body length	0.834	1	0.825	0.772
体宽 Body width	0.807	0.832	1	0.729
尾柄宽 Caudal peduncle width	0.784	0.842	0.787	1

注: 下三角中的值为性状原始表型间相关程度, 上三角中的值为校正了非遗传固定效应后表型间的相关程度

Note: Values in lower-triangular matrix represent degrees of correlation among original phenotypes, and values in up-triangular matrix mean degrees of correlation among phenotypes which were adjusted by non-genetic fixed effects

析则在 10 号染色体上检测到 2 个显著的 QTN 位点 SNP_10_2724296 和 SNP_10_6893888。2 组多性状 GWAS 分析的 GC 值分别为 BM-BL(1.035)和 BL-BW-CPW(1.044)。

对体重和体尺的逐个性状单一性状 GWAS 分析结果(图 3 和表 3)显示, 在 BM 性状中, 于 3 和 5 号染色体上各检测到 1 个显著的 QTN 位点, 即 SNP_3_21601589 和 SNP_5_26888833, 10 号染色体上检测到 2 个显著的 QTN 位点 SNP_10_2724296 和 SNP_10_6893888。BL 和 BW 性状分别在 62 和 8 号

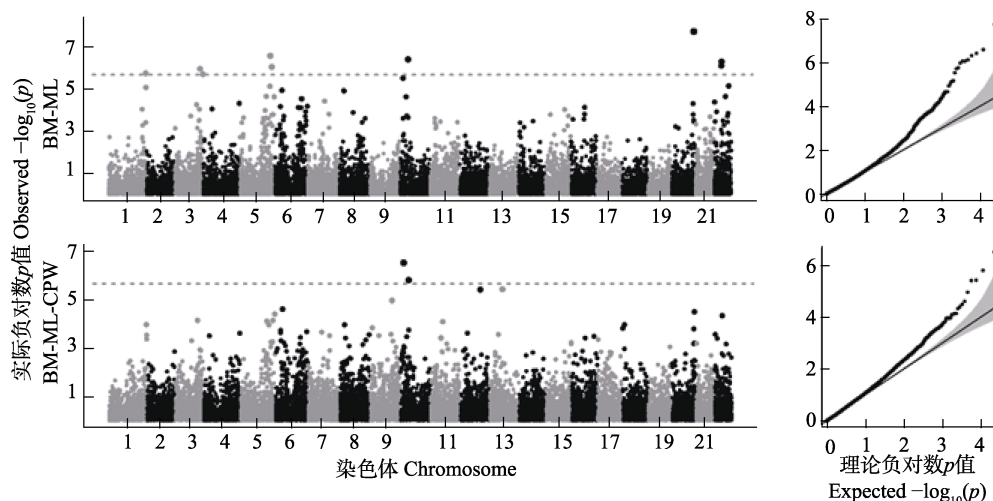


图2 大菱鲂体重与体尺多性状 GWAS 曼哈顿和 QQ 图

Fig.2 Manhattan and Q-Q plots of multi-trait GWAS on body mass and morphological traits in turbot

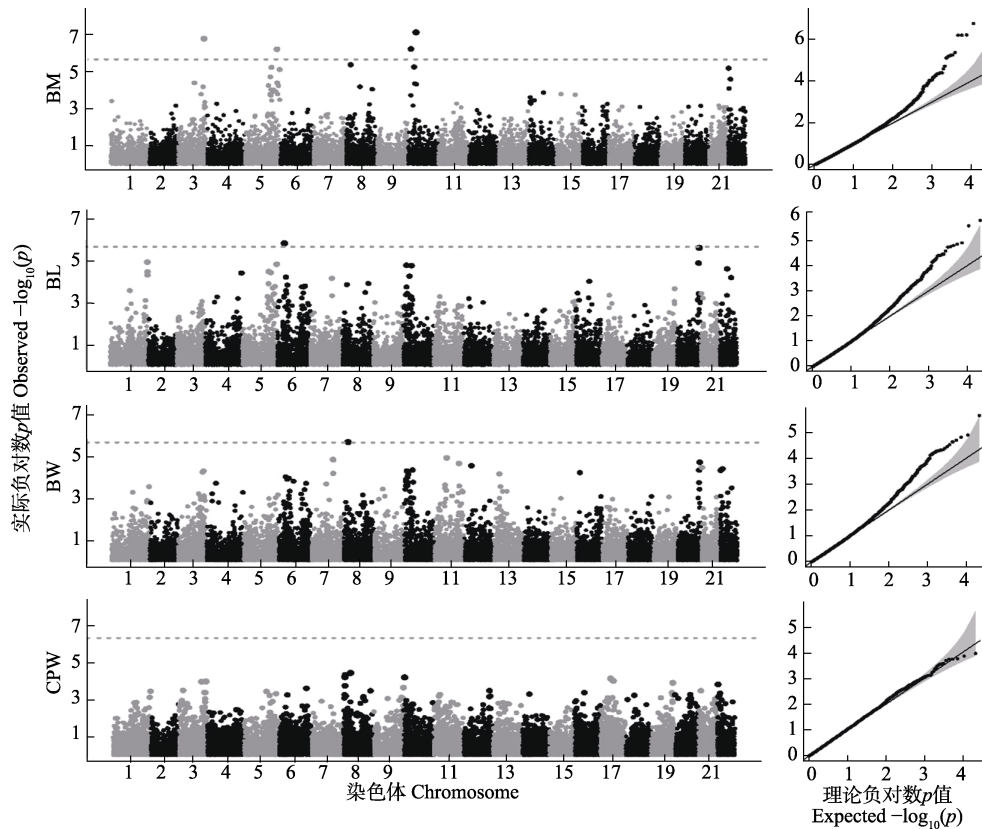


图 3 大菱鲃体重与体尺单一性状 GWAS 曼哈顿和 QQ 图

Fig.3 Manhattan and Q-Q plots of single-trait GWAS on body mass and morphological traits in turbot

表 3 大菱鲃体重和体尺性状显著关联的 QTNs 信息

Tab.3 Information of QTNs significantly associated with body mass and morphological traits in turbot

性状 Trait	SNP 位点 SNP ID	等位基因 Allele	染色体 Chr	位置 Position	P 值 P value	附近基因 Nearby gene	区域 Region (bp)
多性状线性混合模型 Multivariate Linear Mixed Models							
BM-BL	SNP_1_31495825	G/A	1	31,495,825	1.78×10^{-6}	GRIK2	31268951~31431331
	SNP_3_21601589	C/G	3	21,601,589	1.09×10^{-6}	cyp21a2	21601235~21604716
	SNP_3_24007357	G/T	3	24,007,357	1.96×10^{-6}	novel gene*	23968869~23970083
	SNP_5_25635891	A/G	5	25,635,891	2.64×10^{-7}	tshz3b	25624917~25661383
	SNP_5_26888833	C/T	5	26,888,833	8.85×10^{-7}	adamts17	26823608~26965578
	SNP_10_6893888	A/G	10	6,893,888	3.91×10^{-7}	SYT8	6878968~6899153
	SNP_20_18773114	G/A	20	18,773,114	1.88×10^{-8}	myt11a	18751768~18792541
	SNP_22_6190492	T/C	22	6,190,492	7.73×10^{-7}	psmd4a	6191068~6196105
	SNP_22_6380029	T/C	22	6,380,029	4.98×10^{-7}	novel gene*	6365881~6382399
BL-BW-CPW	SNP_10_2724296	A/C	10	2,724,296	2.83×10^{-7}	novel gene*	2717495~2721226
	SNP_10_6893888	A/G	10	6,893,888	1.48×10^{-6}	SYT8	6878968~6899153
单性状线性混合模型 Single-trait Linear Mixed Model							
BM	SNP_3_21601589	C/G	3	21,601,589	1.61×10^{-7}	cyp21a2	21540626~21547626
	SNP_5_26888833	C/T	5	26,888,833	5.94×10^{-7}	adamts17	26823608~26965578
	SNP_10_2724296	A/C	10	2,724,296	5.75×10^{-7}	novel gene*	2717495~2721226
	SNP_10_6893888	A/G	10	6,893,888	7.32×10^{-8}	SYT8	6878968~6899153
BL	SNP_6_6047375	G/A	6	6,047,375	1.42×10^{-6}	grm4	5928125~6045591
BW	SNP_8_3870447	G/A	8	3,870,447	1.98×10^{-6}	BFAR	3863424~3871475
CPW	-	-	-	-	-	-	-

注: *表示未在大菱鲃全基因组中进行功能注释的新基因

Note: * represents novel gene which has not found any gene function annotation in genome of *S. maximus*

染色体上检测到 1 个显著的 QTN 位点 SNP_6_6047375 和 SNP_8_3870447。而在 CPW 性状中则没有检测到显著的遗传变异位点。各性状单一性状 GWAS 分析的 GC 值分别为 1.026 (BM)、1.021 (BL)、1.034 (BW) 和 1.031 (CPW)。

2.3 候选基因

以大菱鲃多性状与单一性状 GWAS 获得的显著 SNP 位点为探针, 根据其在在大菱鲃全基因组的位置, 向上下游寻找距离最近的候选基因。在本研究检测到的 17 个 QTNs 附近共找到 12 个候选基因(表 3), 分别为 GRIK2 (Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2)、cyp21a2 (Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2)、tshz3b (Teashirt zinc finger homeobox 3b)、adamts17 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 17)、SYT8 (Synaptotagmin 8)、myt11a (Myelin transcription factor 1-like, a)、psmd4a (Proteasome 26S subunit, non-ATPase 4a)、grm4 (Glutamate receptor, metabotropic 4)、BFAR (Bifunctional apoptosis regulator) 和 3 个新基因。对这些候选基因进行 GO 注释分析发现, 细胞组分主要涉及核膜、细胞质膜及细胞核等; 分子功能主要涉及离子通道活性、激素活性、氧化还原酶活性、肽酶活性、核苷酸结合、蛋白结合及 G 蛋白偶联受体活性等; 而生物学进程则主要涉及离子转运、糖皮质激素生物合成过程、氧化还原过程、细胞信号转导、基因表达调控、蛋白酶解、胞外分泌、转录调控和 G 蛋白偶联受体信号通路等。其中, 3 个新基因在大菱鲃基因组中未有相关注释信息。

3 讨论

GWAS 作为一种定位影响重要经济性状分子标记的有效方法, 是以全基因组 SNPs 直接关联复杂性状表型, 广泛应用于动植物分子标记开发和辅助选择育种等方面(Santana *et al*, 2015; He *et al*, 2017)。随着诸多水产动物基因组测序工作相继完成以及测序成本的下降, 水产动物生长和抗病等复杂性状的 GWAS 分析多有研究报道。Gutierrez 等(2015)对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 在性成熟时的生长速率性状进行 GWAS 分析, 检测到多个在大西洋鲑代谢和生长发育过程中发挥重要作用的候选基因。Zhou 等(2019)利用 GWAS 揭示了半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 抗病的遗传机制, 共定位了与抗病性状显著关联的 33 个 SNP 位点, 结合基因表达和甲基化分析, 检测到数个影响半滑舌鳎抗病力的候选基因。Jiang 等(2019)则对罗非鱼

(*Tilapia*) 的耐盐性状进行 GWAS 和 QTL 定位研究, 为罗非鱼耐盐性遗传机理揭示及进一步的功能分析奠定了基础。目前, 大菱鲃生长和体尺相关性状的 GWAS 分析鲜有应用, 但 QTL 定位研究已在大菱鲃生长 (Enrique *et al*, 2011) 和气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 耐药性 (Silvia *et al*, 2011) 等相关性状中开展。

现有的绝大多数 GWAS 研究都是关联全基因组上 SNP 位点与单个性状表型值, 即使当多个相关表型性状存在时, 往往也会选择逐个性状分别进行单一性状 GWAS 分析 (Stephens, 2013)。在多个相关表型性状条件下, 单一性状关联定位方法忽略了 QTNs 对多个表型性状的共同影响。相较于单一性状关联分析方法, 多性状 GWAS 方法具有更高的统计功效和参数估计及定位精确度。通过比较大菱鲃体重和体尺多性状 GWAS 与各个性状逐个进行单一性状 GWAS 的定位结果发现, 在相同的显著水准下, 前者检测到的 QTN 数多于后者(表 3)。在 BM-BL 性状组合的多性状 GWAS 分析中, 共检测到 9 个 QTNs, 而在相对应的 BM 和 BL 单一性状 GWAS 分析中, BM 中检测到 4 个 QTNs, BL 中仅定位到 1 个 QTN, 且 BM 中检测到的 4 个 QTNs 中有 3 个与多性状 GWAS 分析得到的 QTNs 重复。同样, BL-BW-CPW 性状组合多性状 GWAS 分析检测到的 QTNs 也多于 3 个性状各自进行单一性状 GWAS 分析得到的 QTNs。除了能够检测到更多的 QTNs, 由于多性状 GWAS 分析检测到的 QTN 是一因多效 QTN, 相较于单一性状 GWAS 分析检测到的 QTN 在生物学和实际应用层面更有意义。

在大菱鲃全基因组上寻找距离每个 QTN 最近的基因, 共找到 12 个候选基因, 其中, 有 9 个已知的功能基因及 3 个新基因。这些影响大菱鲃体重和体尺性状的候选基因在全基因组分布较为分散, 没有明显集中区域。本研究为首次对大菱鲃体重和体尺性状进行全基因组关联分析, 检测到在大菱鲃相关研究中尚未见报道的显著的已知功能基因。相关研究表明, GRIK2 为离子型受体, 它偶联离子通道并形成受体通道复合物, 且与细胞缺血缺氧损伤有关(张冬梅等, 2010)。Eachus 等(2017)和 Weger 等(2018)的研究均表明, cyp21a2 在斑马鱼 (*Brachydanio rerio* var) 幼鱼的糖皮质激素生物合成中发挥着重要作用。Erickson 等(2011)以斑马鱼为实验动物模型, 发现 tshz3b 可能调控后脑中的 Hox 功能, 而 Hox 功能则被认为与形态发生和器官形成有关联 (Gair *et al*, 2003)。由此可见, 该基因可能参与大菱鲃形态发育过程。Myt11a 可能在有丝分裂结束阶段发挥重要作用 (Nakajima *et al*,

2008), BFAR 则能与 p75NTR 的蛋白相互作用并抑制 p75NTR 信号转导, 而 p75NTR 可与高亲和力受体 TrkA 协同作用促进细胞增殖或与细胞内配体结合诱导细胞凋亡 (李红梅等, 2011)。本研究找到的候选基因可能都是大菱鲆体重和体尺性状的重要候选功能基因, 它们在大菱鲆生长发育过程中的影响有待进一步的功能实验验证。

参 考 文 献

- Allison DB, Thiel B, St Jean P, *et al.* Multiple phenotype modeling in gene-mapping studies of quantitative traits: Power advantages. *American Journal of Human Genetics*, 1998, 63(4): 1190–1201
- Bolormaa S, Pryce JE, Hayes BJ, *et al.* Multivariate analysis of a genome-wide association study in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(8): 3818–3833
- Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, *et al.* Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 2007, 447(7145): 661–678
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, *et al.* Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 2015, 4(7): 1–16
- Chavali S, Barrenas F, Kanduri K, *et al.* Network properties of human disease genes with pleiotropic effects. *BMC Systems Biology*, 2010, 4(78): 1–11
- Eachus H, Zaucker A, Oakes JA, *et al.* Genetic disruption of 21-hydroxylase in zebrafish causes interrenal hyperplasia. *Endocrinology*, 2017, 158(12): 4165–4173
- Enrique SM, Alex C, Miguel AT, *et al.* Detection of growth-related QTL in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 473
- Erickson T, Pillay LM, Waskiewicz AJ. Zebrafish Tshz3b negatively regulates hox function in the developing hindbrain. *Genesis*, 2011, 49(9): 725–742
- Gair HJC, Lovegrove B. Beyond homeosis-HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*, 2003, 71(8): 461–476
- Gutierrez AP, José MY, Fukui S, *et al.* Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119730
- He JB, Meng S, Zhao TJ, *et al.* An innovative procedure of genome-wide association analysis fits studies on germplasm population and plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130(11): 2327–2343
- Hulata G. Genetic manipulations in aquaculture: A review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 2001, 111(1–3): 155–173
- Jiang DL, Gu XH, Li BJ, *et al.* Identifying a long QTL cluster across chrLG18 associated with salt tolerance in Tilapia using GWAS and QTL-seq. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(2): 250–261
- Kim S, Sohn KA, Xing EP. A multivariate regression approach to association analysis of a quantitative trait network. *Bioinformatics*, 2009, 25(12): 204–212
- Klei L, Luca D, Devlin B, *et al.* Pleiotropy and principal components of heritability combine to increase power for association analysis. *Genetic Epidemiology*, 2008, 32(1): 9–19
- Lei JL, Ma AJ, Chen C, *et al.* The present status and sustainable development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) culture in China. *Engineering Sciences*, 2005(5): 34–38 [雷霖霖, 马爱军, 陈超, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)养殖现状与可持续发展. *中国工程科学*, 2005(5): 34–38]
- Lei JL, Men Q, Wang YG, *et al.* The factory farming mode of Dalingyu “greenhouse shed + deep well seawater”. *Marine Fisheries Research*, 2002, 23(4): 1–7 [雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. *海洋水产研究*, 2002, 23(4): 1–7]
- Li HM, Shi HL, Huo KK. p75NTR signal transduction suppressed by BFAR and p75NTR interactions. *Scientia Sinica Vitae*, 2011, 41(12): 1140–1147 [李红梅, 施慧莉, 霍克克. BFAR 与 p75NTR 的蛋白相互作用抑制 p75NTR 信号转导. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(12): 1140–1147]
- Li J, Liu YK, Bai L, *et al.* Isolation and identification of *Mycobacterium marinum* associated with splenic and renal granuloma disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 195–199 [李杰, 刘耀宽, 白露, 等. 大菱鲆脾肾结节病原菌的分离和鉴定. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 195–199]
- Lippert C, Listgarten J, Liu Y, *et al.* FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 833–835
- Liu XF, Ma AJ, Huang ZH, *et al.* Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(6): 1407–1409 [刘晓菲, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆高温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特性分析. *水产学报*, 2019, 43(6): 1407–1409]
- Nakajima H, Yonemura S, Murata M, *et al.* Myt1 protein kinase is essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit. *Journal of Cell Biology*, 2008, 181(1): 89–103
- Porter HF, O'Reilly PF. Multivariate simulation framework reveals performance of multi-trait GWAS methods. *Scientific Reports*, 2017, 7: 38837
- Price AL, Zaitlen NA, Reich D, *et al.* New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(7): 459–463
- Santana MHA, Ventura RV, Utsunomiya YT, *et al.* A genomewide association mapping study using ultrasound-scanned information identifies potential genomic regions and candidate genes affecting carcass traits in Nellore cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2015, 132(6): 420–427
- Silvia TRR, Toro MA, Bouza C, *et al.* QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 541
- Stephens M. A unified framework for association analysis with multiple related phenotypes. *PLoS One*, 2013, 8(7): e65245.
- 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 WJ, Hu YL, Ma Y, *et al.* High-density genetic linkage mapping in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) based on SNP markers and major sex- and growth-related regions detection. PLoS One, 2015, 10(3): e0120410
- Weger M, Diotel N, Weger BD, *et al.* Expression and activity profiling of the steroidogenic enzymes of glucocorticoid biosynthesis and the FDX1 co-factors in zebrafish. Journal of Neuroendocrinology, 2018, 30(4): e12586
- Xu K, Duan W, Xiao J, *et al.* Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. Science China, Life Sciences, 2015, 58(2): 187–201
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH, *et al.* A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics, 2006, 38(2): 203–208
- Zhang DM, Wu AM, Lou LX, *et al.* Alteration of ion channel gene expression profile in rat model of post-myocardial infarction heart failure. Chinese Journal of Integrated Traditional and West Medicine, 2010, 30(1): 53–57 [张冬梅, 吴爱明, 娄利霞, 等. 心肌梗死后心力衰竭模型大鼠离子通道基因表达谱的变化. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 53–57]
- Zhou Q, Su ZC, Li YZ, *et al.* Genome-wide association mapping and gene expression analyses reveal genetic mechanisms of disease resistance variations in *Cynoglossus semilaevis*. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 1167
- Zhou X, Stephens M. Efficient multivariate linear mixed model algorithms for genome-wide association studies. Nature Methods, 2014, 11(4): 407–409
- Zhu W, Zhang H. Why do we test multiple traits in genetic association studies? Journal of Korean Statistics Society, 2009, 38(1): 25–27

(编辑 冯小花)

Joint Genome-Wide Association Study of Body Mass and Morphological Traits in Turbot (*Scophthalmus maximus*)

GAO Jin^{1,2}, YANG Runqing^{1,2①}

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

2. Research Centre for Aquatic Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141)

Abstract To reveal the molecular genetic mechanisms of body mass and morphological traits in turbot (*Scophthalmus maximus*) and scan molecular markers and candidate genes, which can be used to improve the target traits, a genome-wide association study (GWAS) was carried out using specific-locus amplified fragment technology (restriction site-associated DNA, 2b-RAD). First, body mass (BM), body length (BL), body width (BW), and caudal peduncle width (CPW) of 441 individuals were measured at about 473 days of growth period in a turbot breeding population. Second, all individuals were genotyped using 2b-RAD, and 23,988 SNPs were obtained after strict quality control. Using a multivariate linear mixed model (mvLMM) for GWAS of traits of BM-BL and BL-BW-CPW, 9 and 2 pleiotropic QTNs were detected for each phenotypic combination, respectively. However, a single-trait linear mixed model (LMM) based on the FaST-LMM algorithm was used for the association analysis of each trait, and the results showed that 4 QTNs were detected in the BM trait, 1 QTN was associated with BL and BW traits, respectively, and no significant locus was found in the CPW trait. A comparison between results of mvLMM and LMM found that mvLMM could detect more QTNs than LMM in GWAS, and the pleiotropic QTNs detected by mvLMM were more biologically meaningful. This study applied mvLMM and LMM to the joint GWAS of body mass and morphological traits in turbot, 17 significant QTNs were detected both using mvLMM and LMM, and 4 of them were detected repeatedly. Furthermore, 12 candidate genes were found by searching the nearest gene of each detected QTN on the whole turbot genome. All of them might be important candidate markers and functional genes, which could influence turbot body mass and morphology. Our study also provided the theory and a reference for marker-assisted selection of body mass and morphological traits in turbot.

Key words Turbot; Body mass and morphological traits; Genome-wide Association Analysis; Multivariate linear mixed models

① Corresponding author: YANG Runqing, E-mail: runqingyang@cafs.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200205002

http://www.yykxjz.cn/

崔爱君, 徐永江, 王滨, 姜燕, 柳学周. 黄条鲮生长性状全基因组关联分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 71-78
Cui AJ, Xu YJ, Wang B, Jiang Y, Liu XZ. Genome-wide association analysis of growth traits in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*).
Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 71-78

黄条鲮生长性状全基因组关联分析*



崔爱君^{1,2} 徐永江^{1,2①} 王滨¹ 姜燕¹ 柳学周¹

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

摘要 利用 2b-RAD 技术对 119 尾黄条鲮(*Seriola lalandi*)个体进行测序, 共获得黄条鲮 SNP 分子标记 26665 个, 对黄条鲮个体的体质量和全长这 2 个重要生长性状进行全基因组关联分析, 筛选与体质量和全长性状相关的 SNP 位点和候选基因。结果显示, 黄条鲮体质量性状中共筛选到 17 个体质量显著关联的 SNP 位点, 找到 17 个可能的候选基因, 全长性状共筛选到 12 个潜在显著关联位点, 找到 12 个可能的候选基因。利用 KEGG 数据库对可能的候选基因进行 Pathway 分析, 得知候选基因主要参与了细胞或组织生长发育相关的代谢通路调控过程, 可能是影响黄条鲮生长性状密切相关的重要候选 SNP 位点和功能基因, 结果可为今后黄条鲮种质资源可持续利用和育种提供遗传信息资料积累。

关键词 黄条鲮; 生长性状; 全基因组关联分析; 2b-RAD; 简化基因组

中图分类号 S917; Q78 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0071-08

全基因组关联分析 (Genome-wide association study, GWAS) 是应用全基因组范围内的大量分子标记 (一般为 SNP), 将标记基因型结合性状表型进行联合分析, 统计每个标记与目标性状之间的关联性大小 (一般用 P 值表示), 鉴定出与目标性状密切相关且具有特定功能和育种潜力的基因位点或分子标记, 主要用于物种经济性状相关 SNP 分子标记以及功能基因的鉴定, 从而达到缩短育种周期和提高育种效率的目的, 目前已在畜禽等脊椎动物育种中广泛应用 (Tavares *et al*, 2020; Müller *et al*, 2019; Cui *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019)。近年来, 随着基因组高通量测序

技术的发展及测序成本的降低, GWAS 开始应用于水产养殖动物的育种研究, 如在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、鲢鱼 (*Silurus asotus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、龙胆石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*)、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 等物种的生长性状关联 SNP 位点、候选基因的挖掘和鉴定 (Zhou *et al*, 2019; Li *et al*, 2017; Yu *et al*, 2019; Wu *et al*, 2019; Ning *et al*, 2019) 方面应用并取得了一定进展。但是, 与陆生脊椎动物相比, GWAS 在水产动物育种中的应用尚处于起步阶段。

黄条鲮 (*Seriola lalandi*) 属鲈形目 (Perciformes)、

*山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0303-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2019GH15)、山东省重点研发计划项目(2018GHY115044)、国家重点研发计划项目(2019YFD0900901; 2018YFD0901204)和国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0303-1), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019GH15), Key Research and Development Program of Shandong Province (2018GHY115044), National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900901; 2018YFD0901204) and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 崔爱君, E-mail: aijun0218@126.com

① 通讯作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-02-05, 收修改稿日期: 2020-03-02

鲷科(Carangidae)、鲷属(*Seriola*), 俗称“黄鲷牛”、“黄金鲷”, 是一种全球广泛分布且具有长距离洄游特性的大洋性经济鱼类。黄条鲷体型大, 生长迅速, 肉质鲜嫩, 具有较优的口感鲜度和较高的营养价值, 品质可与三文鱼、金枪鱼媲美, 国内外市场消费需求旺盛, 是鲷属鱼类中经济价值最高的一种。近年来, 全球很多国家纷纷开展黄条鲷的人工繁育和养殖(Sicuro *et al.*, 2016), 目前, 已在中国、日本、澳大利亚、新西兰和智利等国形成一定规模的养殖产业。为支撑养殖产业可持续发展, 初步开展了黄条鲷种质资源的相关研究, 主要包括染色体核型和带型(史宝等, 2017; 刘永山等, 2018)和群体遗传学(Premachandra *et al.*, 2017; Sepulveda *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018a, 2018b)等研究, 相关结果为黄条鲷种质资源的科学利用和育种研究提供了遗传信息参考。我国于 2017 年在黄条鲷人工繁育技术方面取得突破, 培育出批量优质苗种, 开启了我国黄条鲷人工养殖的序幕。目前, 本实验室正在开展黄条鲷的群体遗传特性研究, 利用 2b-RAD 简化基因组测序技术获得了大量 SNP 分子标记, 对亲鱼和 F₁ 代苗种的遗传多样性变动情况进行监测。生长性状在水产养殖业中具有重要的经济价值, 直接和产量相关(Li *et al.*, 2017)。黄条鲷体型较大, 生长速度快, 前期研究发现, 体高和体长是影响黄条鲷体质量的 2 个重要性状, 共同决定程度达 42.88%(李荣等, 2017)。本研究选择全长和体质量这 2 个重要生长相关性状为目标, 利用获得的 SNP 分子标记进行全长和体质量性状的 GWAS 分析, 以期找到影响体质量和全长性状的关键 SNP 分子标记和候选功能基因, 为黄条鲷种质资源评价和持续利用提供遗传信息积累和技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择来自我国黄海种群养殖黄条鲷 F₁ 代 1~2 龄成鱼共 119 尾, 用卷尺测量其全长(cm), 精确到 1 mm; 电子天平测量其体质量(g), 精确到 0.1 g。利用高压高温(180℃)灭菌后的手术剪, 分别剪取样品的胸鳍, 以 95%无水乙醇浸润后, 在 4℃冰箱中保存待用。

1.2 基因组 DNA 提取与质量检测

使用 QIAGEN 公司生产的动物基因组 DNA 提取试剂盒(DP121221), 参照试剂盒使用说明, 提取鳍条基因组 DNA。用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo, 美国)测定基因组 DNA 浓度, 通过 1%琼脂糖凝胶电

泳检测 DNA 的完整性, 通过 A_{260 nm}/A_{280 nm} 的比值来判断 DNA 的质量。将质检合格的 DNA 浓度稀释至 100 ng/μl, 于 -20℃ 条件保存备用。

1.3 文库构建与测序

将 ≥200 ng 的各样品基因组 DNA 采用 IIB 型限制性内切酶 *Bsa*XI 进行酶切, 酶切产物分别加入 5 组不同的接头, 使用 T4 DNA Ligase 连接, 然后 PCR 扩增连接产物, 最后根据 5 组接头信息, 将 5 个标签按顺序串联, 连接产物添加 barcode 序列, 混库, 使用 Illumina HiSeq 测序平台对混合好的文库进行 Paired-end 测序。

1.4 数据分析

1.4.1 表型数据分析 使用 R 语言中 `fivenum()` 函数, 对黄条鲷体质量和全长表型数据进行描述性统计, 计算其平均值、中位数、最小值、最大值、标准差和变异系数。

1.4.2 测序数据分析与 SNP 分型 Illumina HiSeq 测序平台得到的原始图像数据文件经碱基识别转化为 Raw Reads, 过滤删除含有接头序列的 Reads, 得到 Clean Reads, 过滤删除含有 N 碱基比例大于 8% 的 Reads, 过滤删除低质量 Reads(质量值低于 Q30 的碱基超过 15%); 利用 Pear (Zhang *et al.*, 2014) 软件 (V0.9.6) 将成对的 Clean Reads 拼接, 提取出各样品对应的 Reads, 过滤删除不含酶切识别位点的 Reads 后, 得到各样品的 Enzyme Reads; 利用电子酶切从参考基因组中提取含有酶切识别位点的标签, 作为参考序列, 利用 SOAP 软件将各样品的 Enzyme Reads 比对到参考序列上, 主要参数为 -r0-M4-v2 (-r0 指唯一比对; -M4 指最优比对; -v2 指比对允许 2 个错配), 对比对到相同标签的 reads 聚类, 得到 unique 标签深度, 选择样品深度 >3× 且深度 <500、标签长度为 27 bp 的标签, 利用 SOAP 软件 (V 2.21) (Li *et al.*, 2008) 将测序数据比对到参考序列, 利用最大似然法 (ML) 进行位点的分型 (Fu *et al.*, 2013), 过程中使用的 RAD 分型软件包 (RAD typing), 包含 10 余个软件组分, 覆盖了从数据预处理至最终分型结果输出的全过程。

1.4.3 全基因组关联分析 使用 EMMA eXpedited (EMMAX) 高效混合模型 (Kang *et al.*, 2010), 通过方差分量方法进行 SNP 分子标记和表型性状的全基因组关联分析, 所用模型:

$$y = Xb + Ga + e$$

式中, y 为表型值; X 为固定效应关联矩阵, b 为固定效应向量, G 为通过 SNP 标记计算得到的关

系矩阵, a 为随机加性遗传方差的参数, e 为剩余效应的向量。

每个 SNP 位点能得到 1 个关联值 P 。对 GWAS 给出的 P 值划定 2 条显著性水平线, 其中 1 条经 Bonferroni 校正 $P=0.05/N$ 来确定全基因组显著性阈值 (Bonferroni, 1936), N 为 SNP 标记的个数, 2 个性状经 Bonferroni 校正后显著关联阈值 $-\lg P=5.726$; 另一条使用 R 软件包中的 $p.adjust()$ 函数计算得到经 FDR 校正后的阈值, 体质量性状潜在显著关联阈值 $-\lg P=4.091$, 全长性状潜在显著关联阈值 $-\lg P=4.413$, 挑选 Scaffold 长度的前 30 使用 R 软件包的 qqman 绘制曼哈顿图, 绘制 QQ 图对关联分析进行评价, 判断关联分析结果是否可靠。

1.5 候选基因鉴定及功能分析

将筛选到的具有关联性的 SNP 位点上下游 1 Mb 范围内的碱基序列与 GenBank 数据库中已有的黄条鲮参考基因组 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Seriola+lalandi+dorsalis>) 进行序列比对, 使用 SnpEff 软件 (Version 4.3T) (Cingolani *et al*, 2012) 对得到的 SNP 位点进行注释, 以确定 SNP 位点在基因元件的位置、对氨基酸的变化影响等找到距离 SNP 位点最近的基因。将所有关联基因与 KEGG 数据库比对, 进行 Pathway 分析, 并用超几何分布检验的方法计算每个 Pathway 条目中基因富集显著性, 公式如下:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

式中, N 为所有基因中具有 KEGG 注释的基因数目, n 为 N 中差异表达基因中具有 KEGG 注释的基因数目, M 为所有基因中注释为某特定 KEGG 的基因数目, m 为注释某特定 KEGG 的差异表达基因的数目。计算的结果会返回一个富集显著性的 P 值, 小的 P 值表示基因在该 Pathway 中出现富集, 当 $P \leq 0.05$ 表示显著富集。

2 结果

2.1 表型性状描述性统计

根据本研究所用黄条鲮样品的体质量和全长性状的描述性统计结果 (表 1) 可知, 体质量范围为 228~3000 g, 变异系数为 58.12, 全长范围为 27~67 cm, 变异系数为 19.49。统计分析显示, 黄条鲮体质量和全长的表型数据呈近正态分布。

表 1 黄条鲮生长性状表型的统计

Tab.1 Descriptive statistics of growth traits of yellowtail kingfish

性状 Trait	平均值 Mean	中位数 Median	最小值 Min	最大值 Max	标准差 SD	变异系数 CV
体质量 Weight	1237.87	947.85	228.00	3000.00	719.48	58.12
全长 Total length	47.98	46.50	27.00	67.00	9.35	19.49

2.2 SNP 分型

对 2b-RAD 简化基因组测序数据按照以下指标进一步过滤。剔除所有样品中低于 80% 个体可以分型的位点; 剔除 MAF 低于 0.05 的位点, 剔除等位基因大于 2 的位点。最终, 测序获得 26665 个 SNP 位点进行 GWAS 分析。

2.3 全基因组关联分析

利用 R 软件包分别绘制黄条鲮体质量和全长性状 GWAS 分析的 QQ 图 (图 1 和图 2), 比较观测值 (纵轴) 和期望值 (横轴) 的一致性, 散点分布与阈值实线在前端基本贴合一致, 代表 SNP 假阳性较低, 关联分析结果可靠。黄条鲮体质量与全长性状 GWAS 分析的曼哈顿图分别见图 3 和图 4。根据全基因组关联分析软件 EMMAX 方差分量法的计算和 Bonferroni 校正 P 值, 共筛选到 17 个与体质量性状显著相关的 SNP 位点 (表 2)。通过 NCBI 和 Ensembl 数据库比对, 当体质量性状的显著性值 $P=3.49 \times 10^{-10}$ 时, 有 1 个 SNP 位点, 在基因组上找到 1 个基因 LOC111655074; 当 $P=1.20 \times 10^{-8}$ 时, 鉴定出 15 个显著关联 SNP 位点, 找到 15 个关联基因, 分别是 ptpn14、LOC111651007、LOC111655681、LOC111658683、LOC111659677、

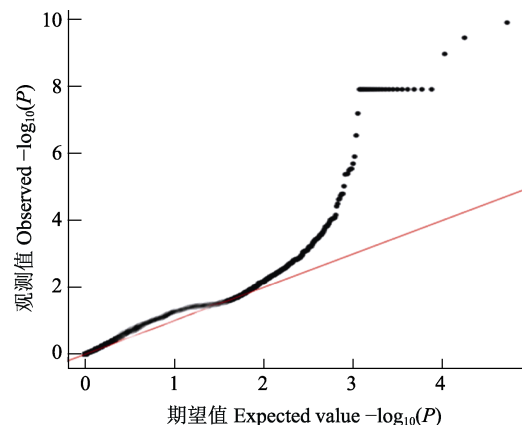


图 1 黄条鲮体质量性状 GWAS 关联分析的 QQ 检验
Fig.1 QQ-plot of genome-wide association of body weight trait of yellowtail kingfish

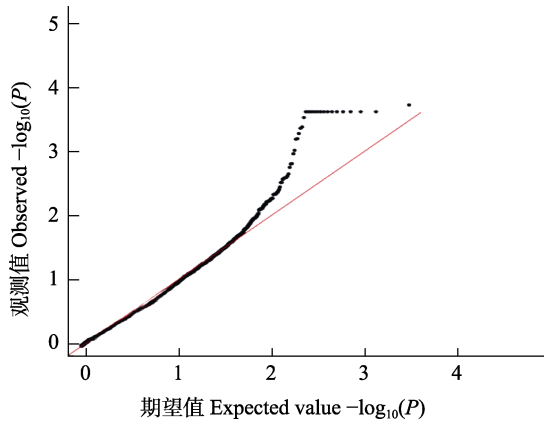


图2 黄条鲷全长性状 GWAS 关联分析的 QQ 检验
Fig.2 QQ-plot of genome-wide association of total length trait of yellowtail kingfish

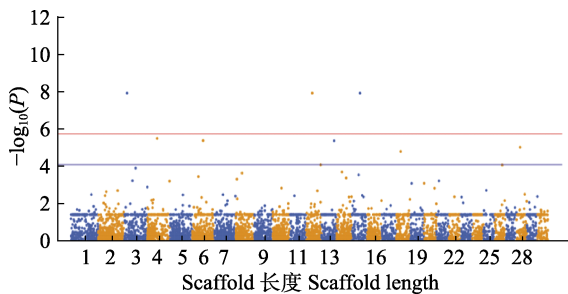


图3 黄条鲷体质量性状 GWAS 分析的曼哈顿图
Fig.3 Manhattan plot of the genome-wide association analysis for body weight of yellowtail kingfish

红色实线代表全基因显著关联阈值: $-\log_{10}P=5.726$,
蓝色实线代表潜在显著关联阈值: $-\log_{10}P=4.091$
The red solid line indicates the genome wide significant threshold: $-\log_{10}P=5.726$. The blue solid line indicates the threshold for the significance of “suggestive association”: $-\log_{10}P=4.091$

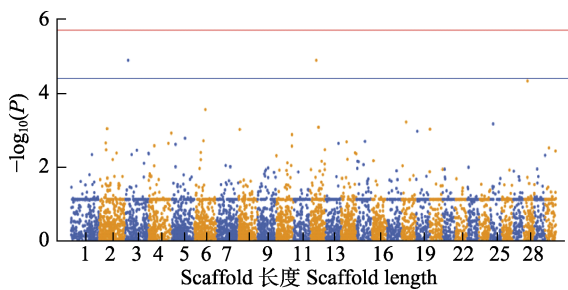


图4 黄条鲷全长性状 GWAS 分析的曼哈顿图
Fig.4 Manhattan plot of the genome-wide association analysis for total length of yellowtail kingfish

红色实线代表全基因显著关联阈值 $-\log_{10}P=5.726$,
蓝色实线代表潜在显著关联阈值 $-\log_{10}P=4.413$
The red solid line indicates the genome wide significant threshold: $-\log_{10}P=5.726$. The blue solid line indicates the threshold for the significance of “suggestive association”: $-\log_{10}P=4.413$

gpr139、LOC111668306、LOC111670411、LOC111673333、LOC111645011、dag1、LOC111645458、poglut1、LOC111646889 和 LOC111648303; 当 $P=6.29 \times 10^{-8}$ 时, 定位了 1 个 SNP 位点, 找到 1 个关联基因 LOC111657860。全长性状未找到经 Bonferroni 校正后的阈值线以上的显著关联位点, 但经 FDR 校正后找到全长性状潜在显著关联 SNP 位点 12 个(表 3), 可能的候选基因 12 个。

2.4 候选基因生物信息学分析

本研究共鉴定黄条鲷 17 个体质量性状显著关联 SNP 位点, 12 个全长性状潜在显著关联 SNP 位点。通过 NCBI 和 Ensembl 数据库比对, 分别找到 17 个体质量性状关联基因和 12 个全长性状关联基因。通过与 KEGG 数据库比对, 进行 Pathway 分析, 发现体质量和全长性状共 5 个关联基因参与的 6 条相关代谢通路(表 4), 主要与营养代谢、生长代谢、免疫调控、生殖调控等生物学过程密切相关; 这些与体质量和全长性状关联的 SNP 位点和相关基因参与多个生物学进程, 具有重要的调控作用, 在今后遗传选育中可能具有较大的应用价值。

3 讨论

黄条鲷作为一种全球分布的大洋性经济鱼类 (Swart *et al*, 2016), 因其高营养和经济价值在国际上诸多国家开始了苗种繁育和养殖 (Whatmore *et al*, 2013)。有学者分析了全球鲷鱼养殖发展现状, 认为种苗早期成活率低、遗传育种研究迟滞以及专用高效饲料缺乏是目前鲷鱼养殖产业发展的主要瓶颈 (Sicuro *et al*, 2016), 加之过度捕捞和环境退化加剧, 近年来, 全球黄条鲷种质资源下降迅速, 有必要加强黄条鲷种质资源与遗传育种相关研究。目前, 有关黄条鲷遗传育种的研究较少, 新西兰已开展了黄条鲷人工选育研究并取得了一定进展 (Symonds *et al*, 2014)。另外, 日本学者 Ohara 等 (2005) 通过微卫星标记建立了黄条鲷和五条鲷 (*Seriola quinqueradiata*) 的遗传连锁图谱, 为其遗传育种提供了重要工具, 但未进行经济性状的关联分析。澳大利亚学者 Nguyen 等 (2018b) 利用 SNP 分子标记构建了黄条鲷的高密度遗传连锁图谱, 并通过全基因组关联分析, 鉴定出 6 个与体质量性状显著关联的位点, 为体质量性状控制的遗传基础解析和下一步育种应用提供了依据。本研究首次利用 2b-RAD 简化基因组测序技术获得了黄条鲷 SNP 位点 26665 个, 并在此基础上进行全长、体质量性状的 GWAS 分析, 筛选到 17 个与体质量性状显著关联的

表 2 黄条鲮体质量性状显著关联基因
Tab.2 Related genes for body weight traits of Yellowtail kingfish

SNP 位点名称 Ref ID	Scaffold 名称 Chr	位置 Loc	P 值 P value	基因名称 Gene Name	基因描述 Description
NW_019524855.1-9703	NW_019524855.1	6	3.49×10^{-10}	LOC111655074	solute carrier family 23 member 1-like
NW_019523057.1-610962	NW_019523057.1	21	1.20×10^{-8}	ptpn14	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14
NW_019523655.1-214205	NW_019523655.1	16	1.20×10^{-8}	LOC111651007	four and a half LIM domains protein 2-like
NW_019524883.1-915356	NW_019524883.1	22	1.20×10^{-8}	LOC111655681	platelet endothelial aggregation receptor 1-like
NW_019525017.1-364688	NW_019525017.1	3	1.20×10^{-8}	LOC111658683	putative nuclease HARBI1
NW_019525039.1-115887	NW_019525039.1	12	1.20×10^{-8}	LOC111659677	myosin-10-like isoform X2
NW_019525243.1-586198	NW_019525243.1	26	1.20×10^{-8}	gpr139	probable G-protein coupled receptor 139
NW_019525288.1-1434838	NW_019525288.1	19	1.20×10^{-8}	LOC111668306	glypican-6-like isoform X2
NW_019525404.1-498088	NW_019525404.1	12	1.20×10^{-8}	LOC111670411	neuromedin-K receptor-like
NW_019525468.1-1066674	NW_019525468.1	14	1.20×10^{-8}	LOC111673333	adhesion G protein-coupled receptor B2-like
NW_019525496.1-2407075	NW_019525496.1	27	1.20×10^{-8}	LOC111645011	zinc finger and BTB domain-containing protein 34-like
NW_019525502.1-828754	NW_019525502.1	2	1.20×10^{-8}	dag1	dystroglycan
NW_019525503.1-234341	NW_019525503.1	25	1.20×10^{-8}	LOC111645458	endothelial PAS domain-containing protein 1-like
NW_019525513.1-133817	NW_019525513.1	16	1.20×10^{-8}	poglut1	protein O-glucosyltransferase 1
NW_019525527.1-152528	NW_019525527.1	5	1.20×10^{-8}	LOC111646889	transcriptional-regulating factor 1-like
NW_019525660.1-904568	NW_019525660.1	6	1.20×10^{-8}	LOC111648303	neuronal membrane glycoprotein M6-a
NW_019524969.1-162768	NW_019524969.1	2	6.29×10^{-8}	LOC111657860	testis-expressed protein 264-like

表 3 黄条鲮全长性状显著关联基因
Tab.3 Related genes for total length traits of Yellowtail kingfish

SNP 位点名称 Ref ID	Scaffold 名称 Chr	位置 Loc	P 值 P value	基因名称 Gene Name	基因描述 Description
NW_019523655.1-214205	NW_019523655.1	16	1.22×10^{-5}	LOC111651007	four and a half LIM domains protein 2-like
NW_019524855.1-9703	NW_019524855.1	6	8.82×10^{-6}	LOC111655074	solute carrier family 23 member 1-like
NW_019525017.1-364688	NW_019525017.1	3	1.22×10^{-5}	LOC111658683	putative nuclease HARBI1
NW_019525039.1-115887	NW_019525039.1	12	1.22×10^{-5}	LOC111659677	myosin-10-like isoform X2
NW_019525243.1-586198	NW_019525243.1	26	1.22×10^{-5}	gpr139	probable G-protein coupled receptor 139
NW_019525288.1-1434838	NW_019525288.1	19	1.22×10^{-5}	LOC111668306	glypican-6-like isoform X2
NW_019525404.1-498088	NW_019525404.1	12	1.22×10^{-5}	LOC111670411	neuromedin-K receptor-like
NW_019525468.1-1066674	NW_019525468.1	14	1.22×10^{-5}	LOC111673333	adhesion G protein-coupled receptor B2-like
NW_019525502.1-828754	NW_019525502.1	2	1.22×10^{-5}	dag1	dystroglycan
NW_019525513.1-133817	NW_019525513.1	16	1.22×10^{-5}	poglut1	protein O-glucosyltransferase 1
NW_019525527.1-152528	NW_019525527.1	5	1.22×10^{-5}	LOC111646889	transcriptional-regulating factor 1-like
NW_019525660.1-904568	NW_019525660.1	6	1.22×10^{-5}	LOC111648303	neuronal membrane glycoprotein M6-a

表 4 体质量性状和全长性状 KEGG 注释结果
Tab.4 KEGG annotation results of body weight and total length trait

通路 ID KEGG ID	通路名称 Pathway	P 值 P value	基因名称 Gene name
ko00514	Other types of O-glycan biosynthesis	0.000367	poglut1
ko04512	ECM-receptor interaction	0.002148	dag1
ko04380	Osteoclast differentiation	0.004151	LOC111651007
ko04530	Tight junction	0.009224	LOC111659677
ko04020	Calcium signaling pathway	0.01454	LOC111670411
ko04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	0.031111	LOC111670411

SNP 位点、12 个与全长性状潜在显著关联的 SNP 位点,为黄条鲮全长与体质量性状遗传基础解析和遗传育种提供了潜在可用的分子标记与候选基因。

GWAS 依赖于连锁不平衡(Linkage Disequilibrium, LD)检测目标物种群体的遗传变异与性状之间的关联,然后通过统计基因型和表型的关联性大小筛选出影响显著的遗传变异,定位影响表型性状的重要数量性状位点(QTL)和候选基因,确定其遗传机制(陶林等, 2019; Naha *et al*, 2016)。本研究根据鉴定出与体质量和全长性状关联的 SNP 位点,在每个 SNP 上、下游 1 Mb 序列范围内扫描,共挖掘到 17 个体质量性状显著关联基因、12 个全长性状潜在显著关联基因,但这些基因尚未在黄条鲮研究中报道。已有研究表明,脊椎动物包括鱼类的生长过程是一个由多基因共同参与的级联式网络调控过程,除生长轴相关因子外,其他相关的基因、激素、代谢产物等通过内分泌、旁分泌的通路对生长起到调控作用,成为潜在的育种靶位点(Zhou *et al*, 2019)。Wang 等(2019)通过克隆获得了黄条鲮生长相关关键基因并验证了其在早期生长发育过程中的表达调控作用。但本研究未能关联体质量、全长性状至 GH、IGF 等经典生长调控功能基因。本研究定位到的所有黄条鲮体质量、全长性状关联基因中,通过 KEGG 或文献检索,发现部分基因在其他动物生长性状调控过程中起重要作用。如 adhesion G protein-coupled receptor B2-like、G protein-coupled receptor 139 等均为 G 蛋白偶联受体家族成员,主要参与有丝分裂、肌肉收缩、离子通道调控、基因转录等生理过程(Raise *et al*, 2015)。Myosin-10-like 和 four and a half LIM domains protein 2-like 都是重要的细胞骨架调控蛋白,参与信号转导、细胞黏附和细胞增殖(Matthias *et al*, 2006; Johannessen *et al*, 2006; Pi *et al*, 2008; Woolner *et al*, 2008)。Dag1 通过 ECM-receptor interaction 通路发挥作用,细胞与细胞外基质相互作用导致直接或间接控制细胞粘附、迁移、分化、增殖和凋亡等。LIM 结合结构域基因在鸡(*Gallus gallus*)脚重性状中显著关联并被证明是影响脚重的重要基

因(陈则东等, 2016)。在已报道的其他鱼类生长性状全基因组关联分析研究中,生长性状大多关联到生长轴以外的重要功能基因,这些生长轴以外的基因都通过相关通路对生长起到间接调控作用(Zhou *et al*, 2019; Li *et al*, 2018; Yu *et al*, 2019; Wu *et al*, 2019; Ning *et al*, 2019),提示除经典生长轴功能基因外,其他生长因子也会在鱼类生长性状选育中成为重要的靶向分子标记。

本研究发现了 29 个与黄条鲮体质量、全长性状显著或潜在显著关联的 SNP 位点,并定位到 29 个显著关联基因。这些基因在其他物种中主要参与细胞分化增殖、免疫、组织器官发育等相关的代谢通路调控过程,因此,可能会在今后黄条鲮选育中发挥重要的作用,但其具体的生理功能和遗传育种应用价值尚需研究和验证。全基因组关联分析(GWAS)已广泛应用于脊椎动物经济性状相关 SNP 位点筛选与鉴定,是进行 QTL 精细定位的重要工具,但在水产动物特别是鱼类上的研究报道较少。今后,随着鱼类基因组研究的深入发展和技术进步,GWAS 技术有望在养殖鱼类经济性状解析和遗传育种中得到更加广泛的应用(陈松林等, 2019)。

参 考 文 献

- Bonferroni CE. Teoria statistical delle classi e calcolo delle probabilita. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze, 1936, 8: 3-62
- Chen SL, Xu WT, Liu Y. Fish genomic research: Decade review and prospect. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 1-14 [陈松林, 徐文腾, 刘洋. 鱼类基因组研究十年回顾与展望. *水产学报*, 2019, 43(1): 1-14]
- Chen ZD, Wang WH. Genome-wide association study on feet weight in chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(10): 1569-1577 [陈则东, 王文浩. 鸡脚重性状的全基因组关联分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10): 1569-1577]
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, *et al*. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms,

- SnPEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 2012, 6(2): 80–92
- Cui ZH, Luo JD, Qi CY, *et al.* Genome-wide association study (GWAS) reveals the genetic architecture of four husk traits in maize. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 946
- Fu X, Dou J, Mao J, *et al.* RAD typing: An integrated package for accurate *de novo* codominant and dominant RAD genotyping in mapping populations. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79960
- Johannessen M, Moller S, Hansen T, *et al.* The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(3): 268–284
- Kang HM, Sul JH, Service SK, *et al.* Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 348–354
- Li N, Zhou T, Geng X, *et al.* Identification of novel genes significantly affecting growth in catfish through GWAS analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, 293(3): 1–13
- Li R, Li Y, Kristiansen K, *et al.* SOAP: Short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713–714
- Li R, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Morphometric analysis and internal anatomy of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 142–149 [李荣, 徐永江, 柳学周, 等. 黄条鲮(*Seriola aureovittata*)形态度量与内部结构特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 142–149]
- Liu YS, Liu XZ, Shi B, *et al.* Analysis of the banding patterns of *Seriola aureovittata*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 138–147 [刘永山, 柳学周, 史宝, 等. 黄条鲮染色体多种显带的形态特征分析. *水产学报*, 2018, 42(9): 138–147]
- Matthias C, Edwige T, Bernadette B, *et al.* FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *Journal of Cellular Physiology*, 2006, 208: 363–372
- Müller BSF, de Almeida Filho JE, Lima BM, *et al.* Independent and joint-GWAS for growth traits in *Eucalyptus* by assembling genome-wide data for 3373 individuals across four breeding populations. *New Phytologist*, 2019, 221(2): 818–833
- Naha BC, Prasad A, Sailo L, *et al.* Concept of genome wide association studies and its progress in livestock. *International Journal of Science and Nature*, 2016, 7(1): 39–42
- Nguyen NH, Premachandra HKA, Kilian A, *et al.* Genomic prediction using DArT-Seq technology for yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *BMC Genomics*, 2018a, 19(1): 107
- Nguyen NH, Rastas PMA, Premachandra HKA, *et al.* First high-density linkage map and single nucleotide polymorphisms significantly associated with traits of economic importance in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Frontiers in Genetics*, 2018b, 9: 127
- Ning XH, Li X, Wang J, *et al.* Genome-wide association study reveals E2F3 as a candidate gene for scallop growth. *Aquaculture*, 2019, 73(4): 734216
- Ohara E, Nishimura T, Nagakura Y, *et al.* Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 2005, 244: 41–48
- Pi X, Ren R, Kelley R, *et al.* Sequential roles for myosin-X in BMP6 dependent filopodial extension, migration, and activation of BMP receptors. *Journal of Cell Biology*, 2008, 179(7): 1569–1582
- Premachandra HKA, De la Cruz FL, Takeuchi Y, *et al.* Genomic DNA variation confirmed *Seriola lalandi* comprises three different populations in the Pacific, but with recent divergence. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9386
- Raise A, Stefanie W, Ralf J, *et al.* Hunting for the function of orphan GPCRs-beyond the search for the endogenous ligand. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(13): 3218–3228
- Sepulveda FA, Gonzalez M. Spatio-temporal patterns of genetic variations in populations of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* from the southeastern Pacific Ocean and potential implications for its fishery management. *Journal of Fish Biology*, 2017, 90(1): 249–264
- Shi B, Liu YS, Liu XZ, *et al.* Study on the karyotype of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 139–144 [史宝, 刘永山, 柳学周, 等. 黄条鲮(*Seriola aureovittata*)染色体核型分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 136–144]
- Sicuro B, Luzzana U. The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 2016, 24(4): 314–325
- Swart BL, Merwe BVD, Kerwath SE, *et al.* Phylogeography of the pelagic fish *Seriola lalandi* at different scales: Confirmation of inter-ocean population structure and evaluation of southern African genetic diversity. *South African Journal of Marine Science*, 2016, 38(4): 513–524
- Symonds JE, Walker SP, Pether S, *et al.* Developing yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and hāpuku (*Polyprion oxygeneios*) for New Zealand aquaculture. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2014, 48(3): 371–384
- Tao L, He XY, Di R, *et al.* Research progress on genome-wide association study for growth-related traits in livestock and poultry. *Chinese Journal of Animal Science*, 2019, 55(11): 34–41 [陶林, 贺小云, 荻冉, 等. 畜禽生长发育相关性状的全基因组关联分析研究进展. *中国畜牧杂志*, 2019, 55(11): 34–41]
- Tavares V, Pinto R, Assis J, *et al.* Venous thromboembolism GWAS reported genetic makeup and the hallmarks of cancer: Linkage to ovarian tumour behavior. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2020, 1873(1): 188331
- Wang B, Xu Y, Liu X, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of insulin-like growth factors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) during embryonic development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 375–390
- Whatmore P, Nguyen NH, Miller A, *et al.* Genetic parameters for

- economically important traits in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture*, 2013, 400(25): 77–84
- Woolner S, O'Brien LL, Wiese C, et al. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *Journal of Cell Biology*, 2008, 182(1): 77–88
- Wu LN, Yang Y, Li, BJ, et al. First genome-wide association analysis for growth traits in the largest coral reef-dwelling bony fishes, the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 707–717
- Yu Y, Wang QC, Zhang Q, Genome scan for genomic regions and genes associated with growth trait in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(3): 374–383
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, et al. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 2014, 30(5): 614–620
- Zhang YF, Zhang JJ, Gong HF, et al. Genetic correlation of fatty acid composition with growth, carcass, fat deposition and meat quality traits based on GWAS data in six pig populations. *Meat Science*, 2019, 150: 47–55
- Zhou, Z. Han, K. Wu, Y, et al. Genome-wide association study of growth and body-shape-related traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using ddRAD sequencing. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 655–670

(编辑 冯小花)

Genome-Wide Association Analysis of Growth Traits in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*)

CUI Aijun^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2①}, WANG Bin¹, JIANG Yan¹, LIU Xuezhou¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The genetic resources available for the commercially important pelagic yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) are relative sparse. 2b-RAD simplified genome sequencing technology was applied to screen single nucleotide polymorphisms (SNPs) in yellowtail kingfish, and a total of 26,665 SNPs were obtained. A genome-wide association study was carried out to detect body weight- and total length-associated SNPs in 119 individuals from the yellowtail kingfish population in the Yellow Sea. The results showed that 17 SNPs associated with body weight and with potential genome-wide significance were found. Genes in the candidate regions with 1 Mb windows were screened, and 17 candidate genes were obtained. A total of 12 SNPs associated with total length and with potential genome-wide significance were identified, and 12 candidate genes were found. For these candidate genes, KEGG pathway analysis showed that they are mainly involved in the metabolic regulation pathway of growth and development in other vertebrates, which may be important candidate SNP loci and functional genes closely related to the growth traits of yellowtail kingfish. The present results could provide genetic information for the sustainable utilization of germplasm resources and genetic breeding of yellowtail kingfish in the future.

Key words *Seriola lalandi*; Growth trait; Genome-wide association study (GWAS); 2b-RAD; Simplified genome

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn.2095-9869.20200211003

http://www.yykyjz.cn/

刘宇岩, 李凤辉, 张小忠, 边力, 陈四清, 曲江波, 高文磊, 刘长琳, 葛建龙. 狼鲛的外部形态、消化系统和生殖系统的观察. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 79-86

Liu YY, Li FH, Zhang XZ, Bian L, Chen SQ, Qu JB, Gao WL, Liu CL, Ge JL. Morphological characteristics, digestive system and reproductive system of the wolf-eel (*Anarrhichthys ocellatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 79-86

狼鲛的外部形态、消化系统和生殖系统的观察*

刘宇岩¹ 李凤辉² 张小忠⁴ 边力² 陈四清^{2①}
曲江波³ 高文磊³ 刘长琳² 葛建龙²

(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. 烟台天源水产有限公司 烟台 265619; 4. 青岛市生态环境局市北分局 青岛 266033)

摘要 采用观察、测量、解剖和拍照的方法,对狼鲛(*Anarrhichthys ocellatus*)的外部形态、可数可量性状及消化系统、生殖系统进行研究,并描述了狼鲛的相关特征。结果显示,狼鲛体型为鲛形,整体呈黑色或灰黑色,头部、背部及背鳍鳍条上有若干似眼睛的黑色圆斑,体表无鳞。背鳍鳍条数为 232~267,胸鳍鳍条数为 15~22,臀鳍鳍条数为 189~220,无腹鳍,背鳍和臀鳍因与尾鳍相连而无明显区分界限,侧线左右各 2 条,均不完整,雄性侧线点明显,而雌性侧线点不明显。上排侧线点数为 18~25,下排侧线点数为 76~85。上鳃耙数为 49~70,下鳃耙数为 55~73,脊椎骨数为 232~271。全长/体长线性相关性最好,雌、雄差异很小,稳定性最好。头长/吻长、头长/眼径、体长/肠长的变化范围较大,雌、雄间差异较大,线性相关性差,可以作为区分狼鲛雌、雄的重要特征;狼鲛体重与体长关系: $W=0.0337S_l^{2.4798}$ ($R^2=0.9992$), 雌性: $W=0.0326S_l^{2.4864}$ ($R^2=0.9990$), 雄性: $W=0.0359S_l^{2.4672}$ ($R^2=0.9995$)。消化系统由消化道和消化腺构成,口咽腔大,具颌齿,无腭齿、犁齿,咽喉齿发达;胃大,呈“I”型,无幽门盲囊;肠短粗,比肠长为 0.45;相关性状及特征显示狼鲛为肉食性鱼类。雌雄异体,卵巢(Ⅲ~Ⅳ)呈椭圆形,粉红色,左右对称,精巢(Ⅲ~Ⅳ)呈黄白色,“Y”形。

关键词 狼鲛; 外部形态; 可数可量性状; 消化系统; 生殖系统

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0079-08

狼鲛(*Anarrhichthys ocellatus*)又称龙鲛、鲛狼鱼、眼斑鲛狼鱼,广泛分布于阿留申群岛至美国加利福尼亚州南部海域,为肉食性鱼类(Wilimovsky, 1964; Hubbs *et al.*, 1944),初孵幼鱼即可游到水面以浮游生物为食,成鱼营底栖生活,大多在滨海潮间带礁石地

区活动,以海星(Asteroidea)、海胆(Echinoidea)、海虾、大螯虾(*Cambarus*)、软体动物、腹足纲动物等底栖生物为食(Marliave, 1987; 云子, 1998)。狼鲛为冷水性鱼类,幼鱼最适生长温度为 9℃~16℃,最高耐受温度为 24℃,盐度适应范围广,最适生长盐度为 20~38,

* 引进国际先进农业科学技术计划(948 计划) (2014-Z11)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016005)共同资助 [This work was supported by the Introduction of the International Advanced Agricultural Science and Technology Project (Plan 948) (2014-Z11), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016005)]. 刘宇岩, E-mail: 157107719@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-02-11, 收修改稿日期: 2020-03-12

最低和最高耐受盐度分别为 6 和 44, 处于快速生长期的狼鳗日均增长率可达 1.07%(刘春胜等, 2011), 狼鳗生长迅速, 个体大, 成体可达 15~20 kg。尽管该物种的分类地位及地理分布已被人熟知, 但关于狼鳗生物学方面的信息却十分匮乏, 其外部形态和内部结构的研究未见报道。本文对狼鳗外部形态和内部结构特征进行研究, 有助于丰富狼鳗的基础生物学资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验样品采自山东省烟台开发区天源水产有限公司养殖的狼鳗成熟个体, 雌、雄各 30 条, 雌鱼全长为(140±10) cm, 体重为(7181±1282) g; 雄鱼全长为(145.6±9.8) cm, 体重为(7865±1280) g。

实验工具: 测量尺、电子秤、照相机、解剖刀、解剖盘、解剖剪和镊子等。

1.2 研究方法

1.2.1 外部形态特征 按照体型、体色、口、齿、鼻、眼、鳍和侧线的顺序对其形态、大小、颜色和位置进行观察、测量和记录。

1.2.2 可量可比性状 测量项目: 体重、全长、体长、体高、体宽、躯干长、尾长、眼后头长、眼径、吻长、口裂长、口裂宽、眼间距、肛前长和肛后长。

测量方法: 按照鱼类种质研究(李思发, 1998)所述方法进行。

测量结果: 计算平均值, 采用 Excel 求标准偏差, 相关方程和 R^2 。

1.2.3 可数性状 统计项目包括背鳍鳍条、臀鳍鳍条、胸鳍鳍条、牙齿、幽门盲囊、脊椎骨、臀鳍前脊椎骨、上鳃耙和下鳃耙。

统计方法: 通过麻醉、解剖, 对可数形状进行计数统计, 采用 Excel 求标准偏差(齐国山等, 2008)。

1.2.4 内部结构观察 解剖狼鳗, 对其消化系统、生殖系统各组织器官进行观察、拍照及描述。取出内脏使用电子天平称重, 精确到 0.01 g; 取出肠道, 采用生理盐水去除肠道内容物并将其弯曲展开, 测量并记录肠道长度, 精确到 1 mm, 用于计算比肠长。

2 结果与分析

2.1 形态特征

狼鳗(图 1A♂、图 1B♀)体延长, 呈鳗型, 前部亚圆型, 尾部侧扁, 左右对称。体表呈灰黑色, 头部、背部和背鳍有若干类似眼睛状的黑色圆斑, 因而又称

眼斑狼鱼。头部近似梯形, 较大, 头长约占全长的 12%, 口咽腔前位, 头部宽大, 下颌略长于上颌, 无须须, 雌性口咽腔较尖(图 1D♀), 雄性口咽腔宽大(图 1C♂)、唇厚而柔软, 向外褶出, 口咽腔可作为雌、雄鉴别的一个形态特征。舌肉质, 灵活, 具有色素斑点。鼻孔 1 对, 位于眼前侧, 无膜覆盖。眼较大, 位于头部两侧, 两眼突出, 在同一水平线上。鳃孔宽大, 鳃盖膜连接到颊部, 左右鳃各 4 个鳃片, 鳃耙短粗, 内侧与鳃弓相连, 外侧分叉, 呈“Y”型。

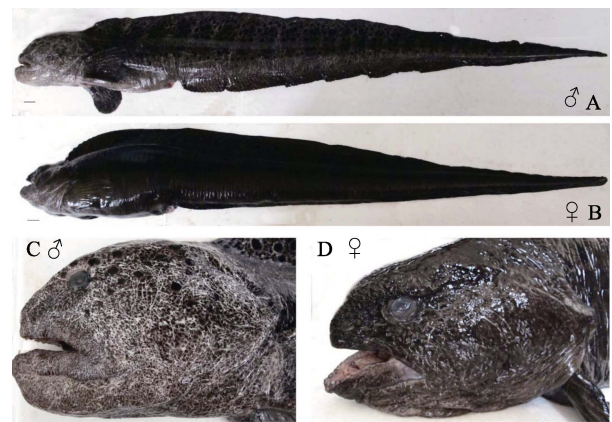


图 1 狼鳗
Fig.1 A. *ocellatus*

A 和 C: 雄性; B 和 D: 雌性
A and C: Male; B and D: Female

各鳍无棘, 均为不分枝鳍条, 背鳍、臀鳍和胸鳍较大, 尾鳍小。胸鳍 1 对, 其基部起始于鳃盖骨后缘, 形状宽圆, 呈“团扇”形。背鳍 1 个, 背鳍基较长, 起始于胸鳍基上方部背侧, 后端与尾鳍相连, 鳍上有 10~15 个黑色圆斑, 呈单列分布。臀鳍 1 个, 起始于肛门后部, 后端与尾鳍相连。尾鳍较小, 背鳍和臀鳍借鳍膜与尾鳍相连。肛门和生殖孔位于体长前 1/4 处, 肛门在前, 生殖孔在后。肛门周围皮肤有灰色条纹。体表无鳞, 侧线左右各 2 条, 均位于侧中部偏背侧, 上排侧线起始于鳃盖骨后缘, 至约 4/5 体长处消失, 侧线孔为 7~11 个, 下排侧线起始于鳃盖骨后缘, 至 1/2 体长处消失, 侧线孔为 79~82 个, 雄鱼侧线明显, 雌鱼侧线不明显。

2.2 可量可比性状

测量和计算获得的可量可比性状见表 1。从表 1 可以看出, 雌、雄样本比较中发现, 总样本中全长/体长的标准偏差最小(0.008), 变动范围最小, 表明该性状最稳定。雌、雄样本中, 全长/体长的标准偏差为 0.006 和 0.009, 平均值均为 1.02, 表明雌、雄全

表 1 狼鳗形态特征的可量可比性状
Tab.1 Measurable parameter ratios of *A. ocellatus*

项目 Items	比值 Ratio(Mean ± SD)	相关方程 Correlation equation	R^2
全长/体长 T_l/S_l	1.02±0.008	$S_l=0.9963T_l-2.3458$	0.9883
Total length/Standard length	♀1.02±0.006	$S_l=0.983T_l-0.1484$	0.9927
	♂1.02±0.009	$S_l=1.0286T_l-7.3767$	0.9862
体长/体高 S_l/B_d	7.75±0.56	$B_d=0.1871S_l-8.0221$	0.7113
Standard length/Body depth	♀7.78±0.50	$B_d=0.198S_l-9.4731$	0.7829
	♂7.72±0.62	$B_d=0.1787S_l-6.8712$	0.6317
体长/头长 S_l/H_l	8.32±0.53	$H_l=0.1828S_l-8.6641$	0.8441
Standard length/Head length	♀8.31±0.38	$H_l=0.1455S_l-3.436$	0.8242
	♂8.32±0.66	$H_l=0.223S_l-14.484$	0.9044
头长/吻长 H_l/P_l	4.31±0.57	$P_l=0.1333H_l+2.0461$	0.2351
Head length/Proboscis length	♀4.32±0.08	$P_l=0.0417H_l+4.0218$	0.7005
	♂3.90±0.55	$P_l=0.2263H_l-0.0097$	0.9952
头长/眼间距 H_l/E_i	3.84±0.13	$E_i=0.1816H_l+1.3508$	0.5956
Head length/Eye interval	♀3.70±0.32	$E_i=0.0447 H_l+3.7557$	0.2076
	♂3.97±0.23	$E_i=0.581H_l-0.0975$	0.8709
头长/眼径 H_l/E_d	9.20±2.45	$E_d=0.0546H_l+1.0394$	0.0458
Head length/Eye diameter	♀6.84±0.27	$E_d=0.1315H_l+0.2479$	0.8495
	♂11.57±0.63	$E_d=0.0756H_l+0.1884$	0.8605
体长/肠长 S_l/L_l	2.24±0.54	$L_l=-0.013S_l+68.118$	7×10^{-5}
Standard length/Intestine length	♀1.73±0.11	$L_l=0.3242S_l+35.512$	0.3307
	♂2.84±0.09	$L_l=0.3208S_l+4.8638$	0.7822
体重/肠重 W_b/W_i	28.16±4.16	$W_i=0.0067W_b+214.83$	0.4356
Body weight/Intestine weight	♀27.01±3.81	$W_i=0.009W_b+200.11$	0.6054
	♂29.26±4.36	$W_i=0.0042W_b+235.28$	0.2196
体重/内脏团重 W_b/W_v	11.71±1.66	$W_v=0.0171W_b+511.41$	0.7859
Body weight/Visceral weight	♀11.32±1.71	$W_v=0.0147W_b+526.47$	0.7432
	♂12.09±1.57	$W_v=0.0186W_b+501.5$	0.8055
肛前长/肛后长 A_{lb}/A_{la}	0.38±0.075	$A_{la}=2.8125A_{lb}-0.501$	0.9754
Anterior anal length/Posterior length anal	♀0.38±0.046	$A_{la}=2.4286A_{lb}+0.4429$	0.9601
	♂0.38±0.012	$A_{la}=2.7568A_{lb}-0.3324$	0.9636

长/体长的差异很小。全长/体长、体长/头长、肛前长/肛后长的相关方程的 $R^2 > 0.8$ ，表明全长与体长、肛前长/肛后长及体长与头长的线性相关性好。体重/肠重的标准偏差为 4.16，该性状变动范围最大，表明该性状最不稳定。雌性和雄性样本中，体重/肠重标准偏差分别为 3.81 和 4.36，二者相关方程 R^2 均较小，雄性 R^2 为 0.2196，表明体重/肠重变动大，线性相关性差，不具有性状辨别参考价值。雌性样本中除了头长/眼间距、体长/肠长相关方程 $R^2 < 0.5$ 外，其余均在 0.6 以上，其中，全长/体长、肛前长/肛后长、体长/头长及头长/眼径线性相关 $R^2 > 0.8$ ，说明四者的线性相关性都较好。雄性样本中，全长/体长的标准偏差为 0.009，其性状变动范围也最小。而体重/

肠重的标准偏差最大，为 4.36，则该性状的变动范围也最大。全长/体长、肛前长/肛后长、体长/头长、头长/吻长和头长/眼间距、头长/眼径、体重/内脏重线性相关方程的 $R^2 > 0.8$ ，说明雄性该 7 项的线性相关性好。

雌、雄样本与总样本的比较发现，雌、雄样本中全长/体长、肛前长/肛后长、体长/体高、体长/头长及体重/内脏重与总样本中该 5 项比值差距较小外，其他各项比值差距均较大，线性相关方程的 R^2 也表现出相同的规律。头长/吻长、头长/眼间距、头长/眼径、体长/肠长的平均值雌、雄差异较大，说明该 4 项指标可以作为区分狼鳗雌雄性别的重要特征。

狼鳗体长与体重的关系公式为：

$W=0.0337S_1^{2.4798}$, $R^2=0.9992$;

雌性: $W=0.0326S_1^{2.4864}$, $R^2=0.9990$

雄性: $W=0.0359S_1^{2.4672}$, $R^2=0.9995$

式中, W 为体重(g); S_1 为体长(cm)。

2.3 可数性状

本研究测得的狼鲛可数性状数据见表 2。从表 2 可以看出, 总样本各项可数性状中, 下颌犬齿平均值的标准偏差最小, 为 0.6, 说明其最稳定。脊椎骨的标准偏差最大, 为 10.49, 说明可变范围也最大, 为

232~271。背鳍鳍条(232~267)与臀鳍鳍条(189~220)数目有一定的变化范围且变化趋势一致, 上排侧线孔、下排侧线孔、臀鳍前脊椎骨数量相对稳定。上鳃耙、下鳃耙可变范围较大, 下鳃耙比上鳃耙数量多。

雌性狼鲛各项可数性状与总体样本范围均相同。雄性样本中, 背鳍鳍条、臀鳍鳍条、上颌犬齿、上颌白齿、下颌白齿与总体样本不同, 但都在总体样本范围内, 无明显差异, 其中, 牙齿数量的不同可能与狼鲛驯化后牙齿退化有关。

表 2 狼鲛的可数性状
Tab.2 Observed numbers of *A. ocellatus*

项目 Items	数据范围 Value interval	平均值±标准差 Mean±SD	项目 Items	数据范围 Value interval	平均值±标准差 Mean±SD
背鳍鳍条 Dorsal fin ray	232~267 ♀232~267 ♂234~267	248.00±9.11	下颌犬齿 Mandibular canine	1~3 ♀1~3 ♂1~3	3.00±0.60
臀鳍鳍条 Anal fin ray	189~220 ♀189~220 ♂189~217	202.00±7.93	上颌白齿 Maxillary molar	5~16 ♀5~16 ♂5~14	11.00±3.24
胸鳍鳍条 Pelvic fin ray	15~22 ♀15~22 ♂15~22	19.00±2.03	下颌白齿 Mandibular molar	4~16 ♀4~16 ♂4~15	11.00±3.31
上排侧线孔 Upper lateral-line pore	18~25 ♀18~25 ♂18~25	21.00±2.01	上鳃耙 Upper gill raker	49~70 ♀49~70 ♂49~70	59.00±5.37
下排侧线孔 Lower lateral-line pore	76~85 ♀76~85 ♂76~85	80.00±2.77	下鳃耙 Lower gill raker	55~73 ♀55~73 ♂55~73	63.00±4.55
上颌犬齿 Maxillary canine	1~3 ♀1~3 ♂1~2	2.00±0.76	脊椎骨 Vertebra	232~271 ♀232~271 ♂232~271	249.00±10.49
臀鳍前脊椎骨 Vertebra before the anal fin	35~40 ♀35~40 ♂35~40	37.30±1.56			

2.4 消化系统

狼鲛的消化系统主要包括消化道和消化腺 2 个部分(图 2)。消化道呈管状, 长度约占体长的 1/2, 起始于口咽腔, 经腹腔, 以肛门开口于体外。消化道包括口咽腔、食道、胃、小肠、直肠和肛门。狼鲛的口裂较大, 吻较短(约占头长的 1/5), 口咽腔前位, 左右对称, 下颌略长于上颌。上、下颌均具牙齿, 上颌前端具犬牙 2~3 枚, 后侧为 1 排白齿, 下颌最前端具犬牙 2~3 枚, 后侧白齿共 2 排, 外侧较大, 向后逐渐变为 1 排, 犬齿状牙齿尖锐且锋利, 有的齿端呈弯钩

状, 白齿钝圆。腭骨、犁骨上未见有齿分布。舌大而肥厚, 上具色斑, 没有舌齿。咽部发达, 有鳃耙和咽喉齿, 咽喉齿发达, 共 4 簇, 左右对称, 上部呈不规则圆形, 下部呈长条状。食道短而直, 前后粗细一致, 前部与咽部相连, 后部与胃相连, 食道与胃的连接部不明显。胃大, 壁厚, 呈“I”型, 分为贲门部、幽门部和胃体部 3 部分, 分化不明显, 无盲囊, 摄食后整个胃部呈囊状, 是饥饿状态的 2 倍。胃后部与肠相连, 连接处明显。从外观上将肠分为小肠和直肠, 小肠发达, 结果还需组织学鉴定。前后宽度基本一致, 呈粉红色, 富血管, 肠壁厚度比食道、胃和直肠薄。

同龄狼鳎雌性肠道比雄性长, 雌性肠道长度约为体长的 3/5, 在腹腔中呈 4 次弯曲; 雄性肠道长度约为体长的 2/5, 在腹腔中呈 2 次弯曲。直肠较短且发达, 后部与肛门相连, 开口于体外。

消化腺包括肝脏和胰脏。肝脏成黄色, 较大, 左右 2 叶, 左侧较右侧大, 半包围在食道和胃体两侧, 前端相连, 中后部分开, 呈游离状态。胆囊为绿色, 椭圆形, 经胆管先与肝脏左侧中下部相连, 后经胆管开口于小肠与胃的连接处。胰脏呈暗红色, 位于腹腔背侧, 有固定形态, 中部有结缔组织将其分为两侧, 相互对称, 通过管状结构与胃和肠道相连。

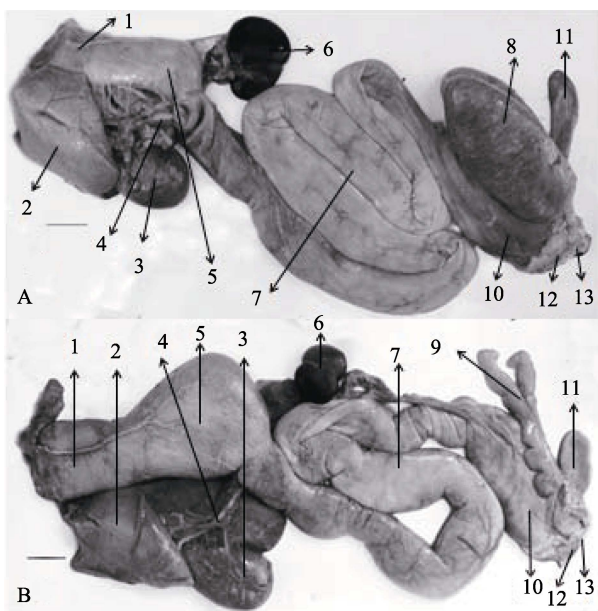


图 2 狼鳎消化系统及生殖系统结构

Fig.2 Structure of digestive and reproductive system of *A. ocellatus*

A: 雌性; B: 雄性; 1 食道; 2: 肝脏; 3: 胆囊;
4: 胆管; 5: 胃; 6: 胰脏; 7: 小肠; 8: 卵巢;
9: 精巢; 10: 直肠; 11: 膀胱; 12: 肛门; 13: 生殖孔
A: Female; B: Male; 1: Oesophagus; 2: Liver; 3: Gall bladder;
4: Bile duct; 5: Stomach; 6: Pancreas; 7: Small intestine;
8: Ovary; 9: Testis; 10: Rectum; 11: Bladder; 12: Anus;
13: Genital foramen

2.5 生殖系统

狼鳎为雌雄异体, 解剖狼鳎(Ⅲ~Ⅳ)雌性个体发现 1 对肥硕的卵巢(图 2-8), 呈椭圆形, 粉红色, 左右各 1 个, 前端分离, 基本对称, 中部通过膜状结构相连, 卵巢的被膜较薄, 易破裂, 上面存在大量血管和微血管。后部通过输卵管与生殖孔相连, 开口于体外。狼鳎性成熟后生殖腺位于腹腔后部约 1/2 处。成熟的卵粒呈圆形, 不透明。雄性狼鳎性腺(Ⅲ~Ⅳ)呈黄白

色, 左右对称, 两边又各自分 4~5 瓣, 前端分离, 后部相连, 呈“Y”形。前端较后端宽, 后部与生殖孔相连, 开口于体外。腹腔后侧与性腺相连有一囊状结构, 用导管吸取其内液体发现有尿液, 推测其为膀胱。

3 讨论

3.1 狼鳎形态及参数

生态形态学指出, 鱼类的形态和其生态有相关性, 鱼类生存环境的差异也决定了其形态的明显差别, 这是鱼类对环境的一种适应性进化(李荣等, 2017)。狼鳎体型呈鳎型, 胸鳍较大, 可能与其在礁石间游泳及觅食的习性相适应, 体表呈灰黑色, 有利于隐藏、躲避敌害。研究表明, 初孵狼鳎生活在较浅的水域, 以浮游生物为食, 成鱼则营底栖穴居生活, 栖息于 200 m 左右的深海海底(Marliave, 1987; 云子, 1998), 所测量狼鳎全长为 140~150 cm, 为成鱼阶段, 因此, 更倾向于底栖生活。

鱼类性状的比值可以反映鱼类的体型、可食部分的比例等(陈寅儿等, 2019)。狼鳎体较长, 体长: 体高: 体宽比值约为 18: 2: 1; 体长和头长的比例为 8.32, 大于银鲑(*Silver salmon*)(匡友谊等, 2004)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(陈京华等, 2005)、星突江鲽(*Pleuronectinae stellatus*)(齐国山等, 2008)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(雷霖霖, 2005)和松江鲈鱼(*Estuarylateolabrax japonicu*)(郭瑞昕等, 2008)等, 与大多数可食用鱼类相比, 狼鳎可食用部分的比例较大, 利用率高。

可数性状是鱼类分类研究的依据之一, 在不同鱼种中的某些可数性状相对比较稳定, 像鳍条数、鳃耙数和脊椎骨数等, 但也有一些差异(刘春胜等, 2011)。Hart(1973)研究表明, 狼鳎脊椎骨数为 228~250, 与本研究脊椎骨数 232~271, 稍微有些差异, 但臀鳍前脊椎骨数较为稳定, 为 35~40, 因此, 可以作为分类的参考依据之一。基于本研究结果, 狼鳎胸鳍鳍条、上排侧线孔、下排侧线孔、上颌犬齿、下颌犬齿、臀鳍前脊椎骨的可数性状是比较稳定的, 可以初步作为狼鳎区分的参考依据。

3.2 狼鳎消化系统结构与食性

鱼类在长期的自然选择过程中, 形成了一系列的形态特征以适应各自的食物类型和摄食方式(薛莹等, 2005)。消化道形态结构是了解和探讨鱼类摄食、消化和吸收等生理机制的基础(王瑞霞, 1990), 鱼类的消化器官同时能够体现出食性(Wang, 1996)。从消化

道各段的结构可了解相应的功能(林浩然, 1999), 鱼类口裂的相对或绝对大小与其摄食食物大小呈正相关, 也与食性呈正相关, 肉食性鱼类的口裂一般较草食性、滤食性和杂食性的大(Piet, 1998)。狼鳗口咽腔较大, 可以摄食体积较大的食物。鱼的牙齿可用于捕食, 同时, 不同类型的牙齿还有撕裂、咬断、研磨等功能, 牙齿的形状通常与它们的食性密切相关, 狼鳗具有发达的白齿, 可以摄食甲壳类、海胆等较为结实的动物。狼鳗的犬齿稍向口咽腔弯曲, 和进食方向相同, 可以防止食物脱落、保证食物顺利进入体内。这些特征与带鱼(*Trichiurus lepturus*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、海鳗(*Muraenesox cinereus*)(大连水产学院, 1983)相似。

胃是狼鳗消化道较为膨大的部位, 呈“I”型, 壁厚, 分为贲门部、幽门部和胃体部 3 部分, 分化不明显, 与肉食性鱼类星斑川鲈(*Platichthys stellatus*)相似(李侠等, 2009)。从胃的结构看, 狼鳗胃的肌层较消化道其他部位厚, 胃黏膜上皮有比较发达的低矮褶皱; 形态上看, 食物在进入前后, 胃的体积发生很大变化, 饱食状态下胃部膨大, 是饥饿状态的 2 倍左右。由此推测食物在胃中可以储存和初步消化(李斌等, 2017)。

肠道是食物消化的主要场所, 又是用于鱼类食性划分的重要依据之一(Grover *et al.*, 1990), 比肠长(肠长/体长)为鱼类消化管的指数之一, 该值在某种程度上反映了鱼的摄食习性。肉食性鱼类摄食的食物一般易于消化, 肠道相对较短, 比肠长一般小于 1, 狼鳗的比肠长为 0.45, 肠长约占体长的 1/2, 食物在肠中停留时间较短, 与银鱼科(*Salangidae*)、鲶科(*Siluridae*)、条斑星鲈(*Verasper moseri*)等鱼类相似(王晓伟等, 2008), 小于肉食性鱼类南方大口鲶(*Silurus soldatovi meridionalis*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(曾端等, 1998)和大鳍鳊(*Mystus macropterus*)(向泉等, 2003)。狼鳗内脏团重和肠道重分别约占体重的 8.54% 和 3.55%, 要小于偏肉食性的 1~2 龄的裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)(分别为 10.8% 和 4.8%), 与肉食性鱼类大银鱼(*Protsalanx iyaloranius*)类似(钱云霞等, 2001)。

消化腺分为肝脏和胰脏, 肝脏为两叶, 分别在食道两旁, 一叶较长, 一叶较短, 与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)相似(吴燕燕等, 2019)。中间由结缔组织和食道连接。胆囊与肝脏明显分离, 数目与圆口纲的七鳃鳗(*Lampetra japonicum*)相同, 胰脏发达, 双叶, 明显与肝脏分离, 与板鳃鱼类(*Elasmobranchs*)相同(大连水产学院, 1983)。尾崎久雄(1984)曾将硬骨鱼类胰腺进行分类, 分别是紧凑型、弥散型和散布型。狼鳗的胰

脏具有固定形态, 属于紧凑型。据资料记载, 一般紧凑型的胰腺脂肪酶含量较弥散型的丰富, 能够更加高效地进行脂肪代谢(葛清秀等, 2001)。相关研究表明, 狼鳗以海星、海胆、海虾、软体动物等为食(Marliave, 1987; 云子, 1998), 消化系统结构也反映出狼鳗为肉食性鱼类。

4 结 论

狼鳗胸鳍鳍条、上排侧线孔、下排侧线孔、上颌犬齿、下颌犬齿、臀鳍前脊椎骨数是比较稳定的性状, 可以作为狼鳗形态学参数的参考依据。头长与吻长、头长与眼径的线性相关性较差, 而在雌、雄样本中, 2 个指标的线性相关性良好(均 >0.7), 说明头长/吻长以及头长/眼径是可以区分狼鳗雌、雄个体的重要外部特征。狼鳗比肠长、比肠重、比内脏团重以及消化道的形态结构特征均显示狼鳗为肉食性鱼类。

参 考 文 献

- Chen YE, Zheng XB, Gao XM, *et al.* Morphology, histology and digestive enzymes of the digestive tract of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1116–1126 [陈寅儿, 郑学斌, 高心明等. 小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)消化道形态与组织学结构特征及其消化酶活性的研究. 海洋与湖沼, 2019, 50(5): 1116–1126]
- Chen JH, Zhao B. Biological characteristics of semi-smooth tongue owl and breeding technology. *Fishery Science and Technology Information*. 2005, 32(3): 105–109 [陈京华, 赵波. 半滑舌鳎的生物学特性及养殖技术. 水产科技情报, 2005, 32(3): 105–109]
- Dalian Fisheries University, *Ichthyology*. Beijing: Agricultural Press, 1983, 45–47 [大连水产学院, 鱼类学. 北京: 农业出版社, 1983, 45–47]
- Ge QX, Wang ZJ, Zhang HX. Study on the hepatopancreases of *Coreius heterodon* (Bleeker) and *Coreius guichenoti* (Sauvage et dabry) in Yangtze River. *Journal of Quanzhou Normal College*, 2001(6): 69–74 [葛清秀, 王志坚, 张昊星. 长江铜鱼和圆口铜鱼肝胰腺的比较研究. 泉州师范学院学报, 2001(6): 69–74]
- Grover JJ, Olla BL. Food habits of larval sablefish *Anoplopoma fimbria* from the Bering Sea. *Fishery Bulletin*, 1990, 88(4): 811–814
- Guo RX, Gu SY, Liu XW, *et al.* Anatomy and food analysis of Guanhe estuary *Lateolabrax japonicus* digestive system. *Water Fishing*, 2008, 28(3): 19–21 [郭瑞昕, 顾曙余, 刘小维, 等. 灌河口花鲈消化系统的解剖与食性分析. 水利渔业, 2008, 28(3): 19–21]
- Hart, JL. Pacific fishes of Canada. *Fishery Research Board of Canada*, 1973, 180: 740
- Hubbs CL, Barnhart PS. Extension of range for blennioid fishes

- in southern California. California Fishers Game, 1944, 30: 49-51
- Kuang YY, Yin JS, Bai QL, *et al.* Measurement of morphometric characters in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Chinese Journal of Fisheries, 2004, 17(1): 22-23 [匡友谊, 尹家胜, 白庆利, 等. 银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)形态性状测量. 水产学杂志, 2004, 17(1): 22-23]
- Lei JL. Fishery science and technology information. Beijing: China Agriculture Press, 2005, 647-665 [雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2005, 647-665]
- Li B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Structure and ultrastructure of alimentary canal of *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 150-158 [李斌, 柳学周, 徐永江, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)消化道显微与超微结构. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 150-158]
- Li SF. Study on genetic characteristics of dominant freshwater cultured fishes in China. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998 [李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究. 上海: 上海科学技术出版社, 1998]
- Li X, Liu ZH, Wang B. Morphological characteristics and internal structure of *Platichthys stellatus*. Hebei Fishery, 2009(4): 19-20 [李侠, 刘振华, 王波. 星斑川鲷外部形态与内部解剖特征的研究. 河北渔业, 2009(4): 19-20]
- Li Y, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Morphometric analysis and internal anatomy of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 142-149 [李荣, 徐永江, 柳学周, 等. 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)形态度量与内部结构特征. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 142-149]
- Lin HR. Fish physiology. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999, 35-46 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 1999, 35-46]
- Liu CS, Chen SQ, Sun JM, *et al.* The tolerability of younger *Anarrhichthys ocellatus* to temperature and salinity. Fishery Modernization, 2011(2): 1-5 [刘春胜, 陈四清, 孙建明, 等. 狼鳗幼鱼对温度和盐度耐受性的试验研究. 渔业现代化, 2011(2): 1-5]
- Liu CS, Chen SQ, Wang YT, *et al.* Measurement of morphometric characters in 1-2-year-old sablefish, *Anoplopoma fimbria*. Fishery Modernization, 2015(2): 23-27 [刘春胜, 陈四清, 王有廷, 等. 1~2 龄裸盖鱼形态特征及其相关参数分析. 渔业现代化, 2015(2): 23-27]
- Marllave JB. The life history and captive reproduction of the wolf-eel *Anarrhichthys ocellatus* at the Vancouver Public Aquarium. Internation Zoo Yearbook, 1987, 26(1): 70-81
- Ozaki Hisao. Fish Digestive Physiology (Volume 1). Wu Shangzhong, trans. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1984 [尾崎久雄. 鱼类消化生理(上册). 吴尚忠, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 1984]
- Piet JG. Ecomorphology of a size-structured tropical freshwater fish community. Environmental Biology of Fishes, 1998, 51(1): 67-86
- Qi GS, Li D, Chen SQ, *et al.* Morphological characteristics and internal structure of *Platichthys stellatus* Pallas. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(1): 1-11 [齐国山, 李迪, 陈四清, 等. 星斑川鲷的形态特征及内部结构研究. 中国水产科学, 2008, 15(1): 1-11]
- Qian YX, Yang WG. Preliminary study on digestive tract index and digestive enzymes of *Protsalanx iyaloranius*. Water Fishing, 2001, 21(5): 8-9 [钱云霞, 杨文鸽. 大银鱼消化道指数和消化酶的初步研究. 水利渔业, 2001, 21(5): 8-9]
- Wang HP. Status and conservation of Reeves shad resources in China Naga. ICLARM Quarterly, 1996, 19: 20-22
- Wang RX. Histology and embryology. Beijing: Higher Education Press, 1990 [王瑞霞. 组织学与胚胎学. 北京: 北京高等教育出版社, 1990]
- Wang XW, Li J, Xiao Z. Primary research on morphologic characteristics and inner structure of barfin flounder *Verasper moseri*. Marine Sciences, 2008, 32(5): 90-96 [王晓伟, 李军, 肖志, 等. 条斑星鲷外部形态特征与内部组织器官的初步研究. 海洋科学, 2008, 32(5): 90-96]
- Wu YY, Tao WB, Li LH, *et al.* Morphological structure and quality characteristics of cultured *Larimichthys crocea* in Ningde. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(6): 1472-1482 [吴燕燕, 陶文斌, 李来好, 等. 宁德地区养殖大黄鱼形态组织结构与品质特性. 水产学报, 2019, 43(6): 1472-1482]
- Xiang X, Ye YT, Zhou XH, *et al.* Digestive ability and nutritive value of *Mystus macropterus*. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(4): 371-376 [向泉, 叶元土, 周兴华, 等. 大鳍鲩的消化能力与营养价值. 水产学报, 2003, 27(4): 371-376]
- Xue Y, Jin XS, Zhang B, *et al.* Feeding habits of three Sciaenid fishes in the Southern Yellow Sea. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(2): 178-187 [薛莹, 金显仕, 张波, 等. 南黄海三种石首鱼类的食性. 水产学报, 2005, 29(2): 178-187]
- Yun Z. Abyssal sea wolf-eel. Navigation. 1998(3): 39 [云子. 深海狼鱼. 航海, 1998(3): 39]
- Zeng D, Ye YT. Study on fish feeding and digestive system structure. Journal of Southwest Agricultural University, 1998, 20(4): 361-364 [曾端, 叶元土. 鱼类食性与消化系统结构的研究. 西南农业大学学报, 1998, 20(4): 361-364]

Morphological Characteristics, Digestive System and Reproductive System of the Wolf-Eel (*Anarrhichthys ocellatus*)

LIU Yuyan¹, LI Fenghui², ZHANG Xiaozhong⁴, BIAN Li², CHEN Siqing^{2①},
QU Jiangbo³, GAO Wenlei³, LIU Changlin², GE Jianlong²

(1. Shanghai Ocean University, National Experimental Teaching Demonstration Center of Fisheries Science, Aquatic Animal Genetics and Breeding Center Shanghai Collaborative Innovation Center, Shanghai Aquaculture Engineering Technology Research Center, 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. Yantai Tianyuan Aquatic Products Co., Ltd., Yantai 265619; 4. Shibe Branch of Qingdao Ecological Environment Bureau, Qingdao 266033)

Abstract We observed, measured, anatomized, and photographed the external shape, meristic and metric characters, digestive system, and reproductive system of *Anarrhichthys ocellatus*. The results are as follows: the body type of the *A. ocellatus* is anguilliform, the skin color is black or rubricans without any mackerel scales, and there are a number of dollar spot-like eyes on the head, back, and dorsal fin. The number of spots on the dorsal fin, pectoral fin and anal fin were 232~267, 15~22, and 189~220, respectively. *A. ocellatus* has no ventral fin, and the tail fin is linked to the dorsal fin and pectoral fin and cannot be distinguished. There are two incomplete lateral lines on each side, the upper is 18~25 and the lower is 76~85. The female lateral line is distinct. However, that of the male is not. *A. ocellatus* also has no pyloric caeca, and the number of upward gill rakers, downward gill rakers, and vertebrae are 49~70, 55~73, and 232~271, respectively. Besides, the magnitude of variation in the total length/standard length is small, with little difference between females and males. The values of the head length/proboscis length, head length/eye diameter, and standard length/intestine length not only vary largely, but present poor linear correlation, with great differences between females and males. Therefore, the females and males can be distinguished. The relationship between weight and length: $W = 0.0337S_l^{2.4798}$ ($R^2 = 0.9992$), for females, $W = 0.0326S_l^{2.486}$ ($R^2 = 0.9990$); and for males, $W = 0.0359S_l^{2.4672}$ ($R^2 = 0.9995$). The digestive system consists of the digestive tract and digestive glands, and the oropharyngeal cavity is large; *A. ocellatus* has jaw teeth, without cavities and plow teeth, the pharyngeal teeth are well-developed, the stomach is “I”-shaped and large. The intestines are wide and short, and the ratio of intestine length/total length is 0.45. The related traits and characteristics show that the *A. ocellatus* is carnivorous and hermaphroditic. The ovaries (III~IV) are elliptical, pink, and left right symmetrical. The testes (III~IV) are “Y”-shaped and pink

Key words *Anarrhichthys ocellatus*; Morphometric characters; Meristic and metric characters; Digestive system; Reproductive system

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200129001

http://www.yykxjz.cn/

吕世伟, 周德庆, 刘楠, 于莹, 宿小杰. 响应面法优化斑马鱼中微塑料分离、提取的工艺. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 87-95
Lü SW, Zhou DQ, Liu N, Yu Y, Su XJ. Process optimization on extraction and isolation of microplastics in zebrafish using response surface methodology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 87-95

响应面法优化斑马鱼中微塑料分离、提取的工艺*

吕世伟^{1,2} 周德庆^{2①} 刘楠² 于莹^{1,2} 宿小杰²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003; 2. 中国水产科学院黄海水产研究所
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室 青岛 266071)



摘要 微塑料广泛存在于海洋中, 是全球十大新兴环境问题之一。微塑料可以被鱼类、贝类和底栖动物等海洋生物摄入, 危害海洋生命。为了更好地从海洋生物中分离和检测微塑料, 本研究优化了一种新方案。以斑马鱼(*Danio rerio*)为原料, 对其中的微塑料进行分离提取。首先, 通过消化率、回收率、拉曼光谱分析和扫描电镜等方法对 KOH、H₂O₂、HNO₃ 和胰蛋白酶 4 种消化液进行选择, 选定 KOH 溶液为最适消化液。然后通过单因素实验和 Box-Behnken 响应面实验设计优化 KOH 溶液为消化液的最佳消解条件。研究表明, 消解最适条件为浓度 4%、温度 47℃、时间 20 h, 在此条件下的消化率为 97.38%。KOH 消化液显著提高了消解效率, 为微塑料的进一步检测分析提供了技术支持。

关键词 斑马鱼; 微塑料; 消化液; 响应面分析; 工艺优化

中图分类号 X55 **文献标识码** B **文章编号** 2095-9869(2021)02-0087-09

随着社会的发展和科技的进步, 塑料在世界范围内大量生产与应用, 目前年均产量超过 3.11 亿 t (Gil-Delgado *et al*, 2017)。塑料通过机械作用、生物降解和太阳辐射等被分解成小颗粒, 当其直径小于 5 mm 时即可定义为微塑料(文天, 2016)。环境中的塑料残体可以通过风力、河流、洋流等外力进行远距离迁移 (Cole *et al*, 2011), 从而对全球海洋造成污染。塑料制品的普及和广泛应用, 海洋中的塑料逐年增加, 海水中微塑料会逐渐转移到海洋生物体内, 包括浮游动物 (Mao *et al*, 2018)、双壳类 (Abidli *et al*, 2019)、底栖类 (Sussarellu *et al*, 2016) 和鱼类 (Espinosa *et al*, 2018) 等。调查研究发现, 墨尔本地区 19.4% 的鱼体内都含有微塑料, 且体内的微塑料含量平均高于头部 (Su *et al*, 2019); 突尼斯北部湖中软体动物表现出相对较高的

微塑料污染水平, 总浓度在 703.95~109.80 个/kg 至 1482.82~19.20 个/kg (Abidli *et al*, 2019); Zhu 等 (2019) 首次在濒危物种白海豚 (*Sousa chinensis*) 的肠道中检测到了微塑料。在海洋环境中, 微塑料对海洋生物的危害主要有 2 个方面: 一是海洋生物摄入微塑料, 会对生命健康产生直接影响。据已有的研究发现, 微塑料可能会导致鱼类 (Lu *et al*, 2016)、甲壳类 (Watts *et al*, 2014) 和双壳类 (van Cauwenberghe *et al*, 2014) 等消化道阻塞, 进食能力受损, 甚至导致生殖能力障碍等不良影响。如果微塑料长时间在生物体内, 会影响正常的食物摄取, 最终导致生物体的饥饿和死亡。二是微塑料易与有毒化学物质结合, 从而危害海洋生物。因为微塑料比一般塑料更容易吸附有毒有害物质, 已经发现由于微塑料自身的疏水特性, 它可以浓缩多氯联

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZY11)和烟台市高端人才引进“双百计划”(XY-04-18-01)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZY11), and “Double Hundred Plan” for the Introduction of High Talents in Yantai City (XY-04-18-01)]. 吕世伟, E-mail: lsw13105292223@163.com

① 通讯作者: 周德庆, 研究员, E-mail: zhoudeq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-01-29, 收修改稿日期: 2020-02-15

苯、多溴联苯和多环芳烃等多种有机污染物、重金属,以及添加剂衍生的化学品(Castillo *et al.*, 2016)。微塑料污染对海洋动物和沿海生态系统造成了影响,并对人类健康产生了威胁。目前, Wu 等(2019)研究了不同粒径聚苯乙烯对人结肠腺癌细胞的细胞毒性,发现2种微塑料均对细胞活力、氧化应激、膜完整性和流动性有低毒作用。Schirinzi 等(2017)体外研究发现,微塑料可以引起大脑和人类上皮细胞高活性氧产生。Hwang 等(2019)研究了聚丙烯微塑料在人源性细胞中的毒性,研究表明,微塑料直接与细胞接触可能通过诱导免疫细胞产生细胞因子而产生健康问题。然而,由于缺乏可靠的数据来量化微塑料在人体的真实情况,因此,很难合理地评估微塑料对人体健康的实际影响。关于微塑料在人体的存在情况以及对人体健康的影响,仍有许多工作要做。

从海洋生物样品中提取微塑料的主要方法是消化法,即使用酸、碱、氧化剂或酶等消化液来进行组织消解。酸性消化液通常使用的是69% HNO₃(Dekiff *et al.*, 2014),其他酸性消化液还有65% HNO₃和65% HClO₄等(Santana *et al.*, 2016)。碱性消化液通常使用的是10% KOH(Dehaut *et al.*, 2016)。氧化剂消化液通常选择30% H₂O₂(Karami *et al.*, 2016)。酶使用较多的是脂肪酶(Waite *et al.*, 2018)、胰蛋白酶(Courtene-Jones *et al.*, 2017)。然而,在早期的实验研究中存在一些问题。首先,消化液对微塑料的影响不是通过在生物组织中加入微塑料来测试的,而是直接与消化液接触。其次,不适当的消化液或温度等消化条件可能会低估海洋生物中的微塑料含量,或者腐蚀性消化液也可能导致颗粒破碎,从而高估微塑料的含量。因此,本研究旨在通过消化率、回收率、拉曼光谱分析和扫描电镜等多方面的分析,选取最适的消化液,并对其消化工艺进行优化,建立一种高效的消化方法,在保护微塑料聚合物完整性的同时,有效地消化鱼类组织,为海洋生物中微塑料的分离提取提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种常见的热带淡水鱼,头小稍尖,略呈纺锤形,具有个体小、易于饲养、繁殖力旺盛、生长周期短和发育快等特点(Talwar *et al.*, 1994)。本实验斑马鱼于2019年4月购自青岛当地水产市场,体长为(2.0±0.6) cm,实验前驯养7 d(驯养期间无斑马鱼死亡),饲养用水为自来水不断曝气24 h,水温为(26.0±0.5)℃,每日投食1次。

KOH、H₂O₂和HNO₃购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯;胰蛋白酶购自北京索莱宝生物科技有限公司;500 μm聚苯乙烯塑料购自天津市倍思乐色谱技术开发中心;滤纸(No.540)购自美国Whatman公司。

1.2 实验方法

1.2.1 消化率 选取常用的4种消化液:10% KOH(Ali *et al.*, 2017)、30% H₂O₂(Avio *et al.*, 2015)、69% HNO₃(Vandermersch *et al.*, 2015)和0.3125%胰蛋白酶(Courtene-Jones *et al.*, 2017)。在相同温度、相同时间下进行组织消化。

在磨碎的0.6 g斑马鱼鱼肉组织(不加聚苯乙烯颗粒)里分别加入6 ml 10% KOH、30% H₂O₂、69% HNO₃和0.3125%胰蛋白酶(Dehaut *et al.*, 2016),一式3份,安瓿瓶密封,放入55℃烘箱中保持48 h。用Whatman No.540滤纸对消化液进行真空过滤。过滤前后,滤膜保持50℃下5 h,称重精度为0.1 mg。计算消化率(Catarino *et al.*, 2016):

$$\text{消化率}\% = \frac{W_i - (W_a - W_b)}{W_i}$$

式中, W_i 为斑马鱼组织初始重量, W_a 为过滤后的滤膜重量, W_b 为过滤前的滤膜重量。

1.2.2 回收率 收集0.6 g磨碎的斑马鱼鱼肉,将0.06 g聚苯乙烯微塑料加入到磨碎的鱼肉中,搅拌均匀,将混合物转移到装有6 ml 10% KOH、30% H₂O₂、69% HNO₃和0.3125%胰蛋白酶的安瓿瓶中,并在55℃下保持48 h ($n=3$)。然后,用Whatman No.540滤纸进行过滤,在50℃下干燥5 h,在体视显微镜下将聚苯乙烯颗粒挑出、称量,计算回收率(Catarino *et al.*, 2016):

$$\text{回收率}\% = \frac{W_a}{W_i}$$

式中, W_a 为消化后聚苯乙烯的重量, W_i 为聚苯乙烯的初始重量。

1.2.3 体视显微镜和扫描电镜观察及拉曼光谱分析

将未经消化处理的聚苯乙烯颗粒和经过4种消化液消化的聚苯乙烯颗粒在体视显微镜(3×)下观察,检查其形态及其颜色的变化。扫描电镜通过聚焦电子束扫描表面产生微塑料图像,用于表征微塑料的表面形貌。将5种聚苯乙烯颗粒进行扫描电镜观察。用涂布机对样品涂上一层金,以防止电子束对样品充电。观察未经处理(对照)的聚苯乙烯颗粒和消化后的聚苯乙烯颗粒的形貌(Ali *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019)。

此外,为了评估聚合物的分子完整性,消化后的

聚苯乙烯颗粒使用拉曼光谱进行检测, 且与自建的数据库进行比较。检测条件: 激光波长为 785 nm, 激光功率为 350 mW, 扫描范围为 200~3000 cm^{-1} (Araujo *et al.*, 2018; Alexandre *et al.*, 2019)。

1.2.4 单因素实验 选择消化温度(25℃、35℃、45℃、55℃和 65℃)、消化时间(6、12、24、48 和 72 h)、消化浓度(3%、5%、10%、20%和 30%)进行单因素实验, 分别考察这 3 个因素对斑马鱼消化率的影响。

1.2.5 响应面优化实验 根据 Box-Behnken 实验设计原理进行 3 因素 3 水平实验设计, 利用 Design-Expert 8.0 软件进行数据拟合, 优化斑马鱼消化率工艺。在单因素的基础上, 自变量的实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 共设计 15 个实验点(3 个中心点)。实验因素和水平见表 1。

表 1 响应面实验水平因素

水平 Level	因素 Factors		
	A 浓度 Concentration(%)	B 时间 Time(h)	C 温度 Temperature(℃)
-1	2	18	40
0	5	24	45
1	8	30	50

2 结果与讨论

2.1 消化率

在消化液种类选择中, 消化率是非常重要的指标。将斑马鱼肉组织与 4 种消化液进行反应后得到消化率数据见图 1。从图 1 可以看出, 消化率最高的是

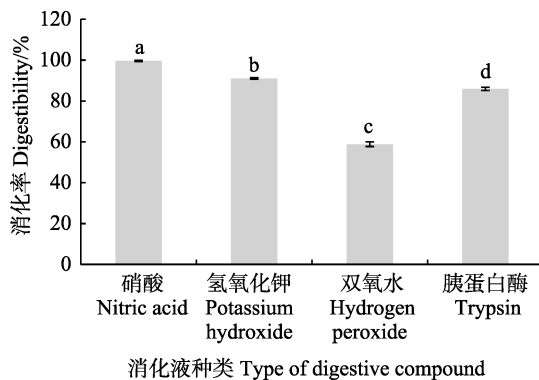


图 1 不同消化液下斑马鱼的消化率
Fig.1 Digestibility of zebrafish in different digestive compound

a、b、c 和 d 表示各处理间差异显著($P < 0.05$)
a, b, c, and d indicate significant difference among treatments at 0.05 level

HNO_3 , 达到了 100%。Ali 等(2017)发现, 浓缩 HCl 和 HNO_3 可以完全消化鱼的组织。KOH 和胰蛋白酶的消化率分别达到 90.97%和 85.89%。消化能力较弱的是 H_2O_2 , 消化率仅有 58.82%。因此, 从消化率上来看, H_2O_2 不适合作为斑马鱼的消化液。

2.2 回收率

在 55℃温度下, 斑马鱼肉与聚苯乙烯颗粒混合后分别与 4 种消化液一起消化, 测定其回收率。不同消化液下, 聚苯乙烯颗粒的回收率见图 2。从图 2 可知, 不同消化液之间的差异不显著。 HNO_3 的回收率最高, 超过了 100%, 达到了 104.13%。其原因可能是 HNO_3 可以有效地消解有机质, 但油脂和组织残渣仍然存在, 附着在微塑料上导致重量改变, 影响微塑料的最终定量(李凌云等, 2019)。KOH 和 H_2O_2 的回收率分别为 93.50%和 94.63%。回收率最低的是胰蛋白酶, 仅有 90.13%。与本研究不同的是, Catarino 等(2016)对 NaOH、 HNO_3 和 Corolase 7089 对贻贝中的微塑料进行回收, 蛋白酶的提取回收率均达到了 93%以上。可能的原因是, 不同消化液对微塑料的种类和消化对象有差异性。因此, 从回收率来看, HNO_3 不适合作为消化液。综合消化率与回收率的结果可以得出, KOH 比较适合作为从斑马鱼肉中分离提取聚苯乙烯颗粒的消化液。

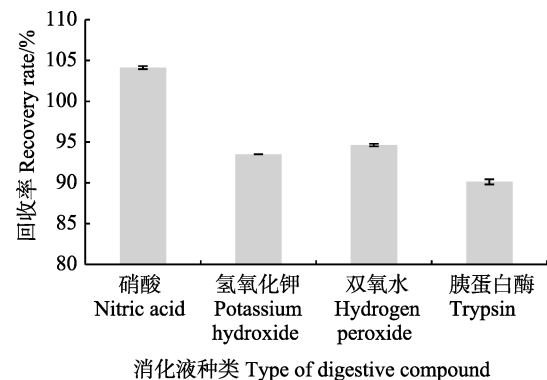


图 2 不同消化液下聚苯乙烯颗粒的回收率
Fig.2 Recovery rates of polystyrene in different digestive compound

2.3 体式显微镜观察

通过体式显微镜观察 4 种消化液消化的聚苯乙烯颗粒, 其颜色和状态变化如图 3 所示。 HNO_3 作为消化液导致聚苯乙烯颗粒严重变色且颗粒间发生粘连。有研究表明, 消化液会导致微塑料变色, 从而干扰其进行光学检测(Catarino *et al.*, 2016)。变色的原因可能是由于 HNO_3 可以有效地消解有机质, 但油脂仍

然存在,附着在微塑料上,导致颜色和状态发生改变(Santana *et al*, 2016),从而影响微塑料的最终定量,回收率的实验结果也证明了这一点。而 KOH、H₂O₂ 和胰蛋白酶这 3 种消化液不会导致微塑料变色,但聚

苯乙烯颗粒的表面附着少量消化后的生物组织。其中, KOH 消化液消化过的聚苯乙烯颗粒表面附着残留斑马鱼肉组织最少,胰蛋白酶消化液由于消化不彻底,残留组织最多。



图3 正常与不同消化液消化后聚苯乙烯颗粒的形貌(放大倍数3×)

Fig.3 Morphology of polystyrene particles in digestion with normal and different digestive compound (magnification 3×)

a: 对照; b: 硝酸; c: 氢氧化钾; d: 过氧化氢; e: 胰蛋白酶
a: Control; b: HNO₃; c: KOH; d: H₂O₂; e: Trypsin

2.4 电镜

为了进一步了解 4 种消化液种类对聚苯乙烯颗粒完整性的影响,进行了扫描电镜观察,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,经过 HNO₃ 消化后的聚苯乙烯颗粒表面出现褶皱且球体融化粘连在一起,表明 HNO₃ 在消化生物组织的同时,也对聚苯乙烯颗粒产生了严重的破坏,对实验结果有较大的影响。而经过 KOH、H₂O₂ 和胰蛋白酶消化后的聚苯乙烯颗粒并未发生明显的变化,但球体表面有生物组织残留,其中,胰蛋白酶消化后的聚苯乙烯颗粒上残留的生物组织较多,直接证明了其对斑马鱼肉组织消化不彻底。

2.5 拉曼光谱

为了有效地分析不同消化液消化后聚苯乙烯颗粒的结构特征,本研究采用拉曼光谱进行分析研究,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, HNO₃、KOH 和胰蛋白酶与对照拉曼光谱相比,并无其他明显特征峰值出现,由此可知, HNO₃、KOH 和胰蛋白酶

在消化斑马鱼的同时,不会破坏聚苯乙烯的化学结构。而 H₂O₂ 的拉曼光谱与对照相比,在波长 1130、1375 和 1630 cm⁻¹ 左右的峰值的相对强度减弱。波长为 1130 cm⁻¹ 左右处的变化是由苯环与碳原子间非对称伸缩振动引起的,而 1375 cm⁻¹ 左右的变化是由碳氢原子间非对称弯曲振动引起的,1630 cm⁻¹ 处是由苯环内碳原子间非对称伸缩振动引起的。因此, H₂O₂ 不适合作为从斑马鱼肉组织中提取微塑料颗粒的消化液。

2.6 单因素实验

2.6.1 不同浓度 KOH 对斑马鱼消化率的影响

消化液的浓度是影响消化率的重要因素,在 45℃、24 h 的条件下,不同浓度的 KOH 消化液对斑马鱼消化率的影响见图 6。从图 6 可以看出,随着 KOH 浓度的增加,斑马鱼消化率呈现上升趋势;当 KOH 浓度达到 5% 时,消化率达到峰值,为 97.32%。KOH 浓度继续增加,消化率开始下降,且下降趋势明显。

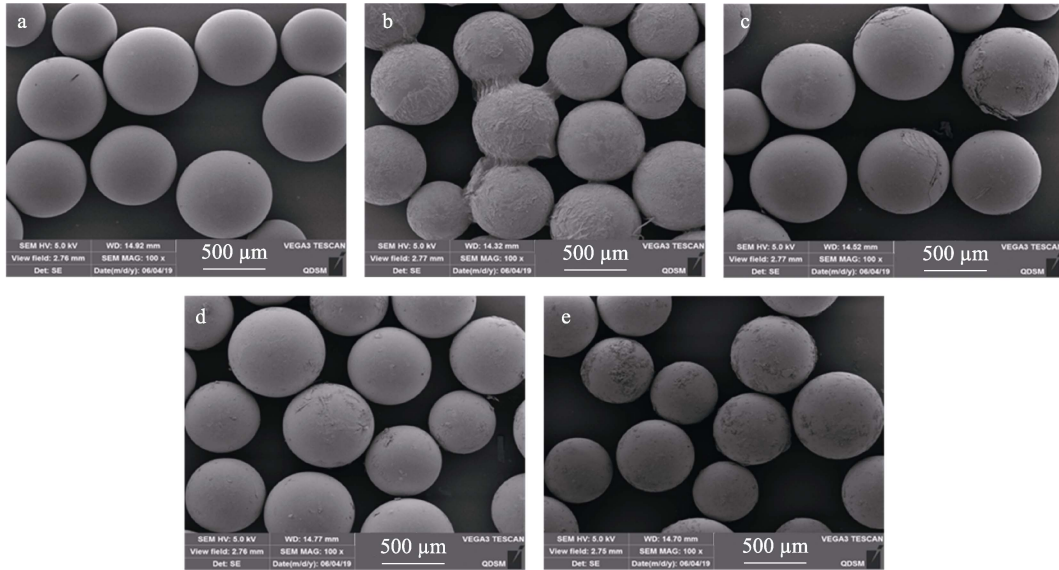


图 4 正常与不同消化液下的聚苯乙烯扫描电镜照片

Fig.4 Scanning electron microscopy of polystyrene in normal and different digestive compound

a: 对照; b: 硝酸; c: 氢氧化钾; d: 过氧化氢; e: 胰蛋白酶
a: Control; b: HNO₃; c: KOH; d: H₂O₂; e: Trypsin

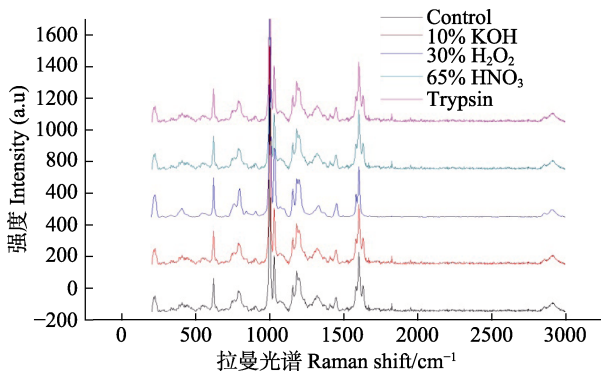


图 5 正常和不同消化液下的聚苯乙烯颗粒拉曼光谱
Fig.5 Raman spectra of polystyrene particles in normal and different digestive compound

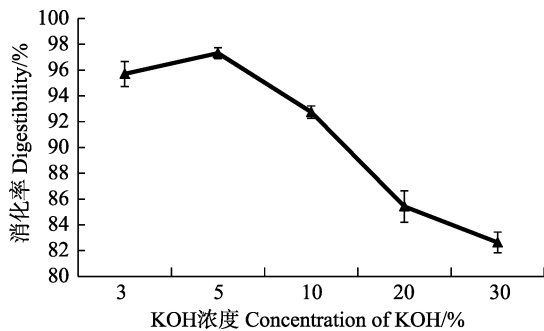


图 6 不同浓度 KOH 对斑马鱼消化率的影响
Fig.6 Effects of different concentration of KOH on digestibility of zebrafish

2.6.2 不同消化时间对斑马鱼消化率的影响 在 5% KOH、45℃的条件下, 不同消化时间对斑马鱼消

化率的影响见图 7。如图 7 所示, 随着消化时间的增加, 斑马鱼消化率也增加。当消化时间增加到 24 h 时, 消化率的变化最明显, 达到了 97.32%。当消化时间增加到 48 和 72 h 时, 斑马鱼的消化率趋于稳定。

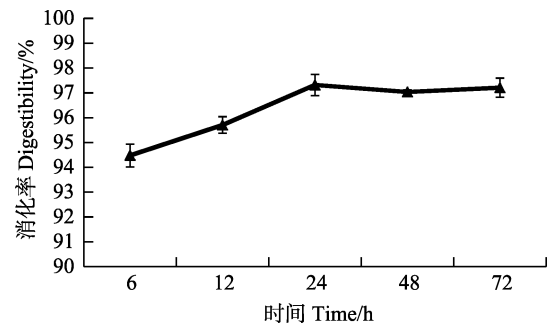


图 7 不同消化时间对斑马鱼消化率的影响
Fig.7 Effect of different digestion time on digestibility of zebrafish

2.6.3 不同温度对斑马鱼消化率的影响 使用 5% KOH 溶液消化 24 h, 研究斑马鱼消化率的最佳温度, 见图 8。如图 8 所示, 随着温度的不断升高, 斑马鱼的消化率呈现大幅度的上升。当温度达到 45℃时, 斑马鱼的消化率达到最高。高于 45℃, 斑马鱼的消化率趋于稳定, 基本不变。

2.7 响应面实验

2.7.1 响应面实验方案及结果 利用 Design-Expert 8.0 软件进行数据拟合, 实验设计与结果见表 2。

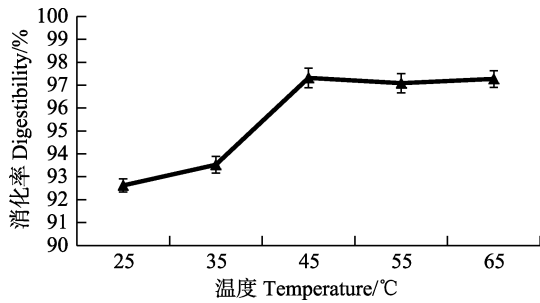


图8 不同温度对斑马鱼消化率的影响

Fig.8 Effects of different temperature on digestibility of zebrafish

2.7.2 模型的建立与显著性检验 利用Design-Expert 8.0 软件对表2中的数据进行多元回归拟合, 获得斑马鱼消化率(Y)对自变量浓度(A)、时间(B)、温度(C)的二元多项回归方程: $Y=97.32-0.21A-0.16B+0.32C+0.37AB+0.077AC-0.42BC-0.67A^2-0.32B^2-0.87C^2$ 。方程中各项系数绝对值的大小直接反映各因素对响应值的影响程度, 系数的正、负反映影响方向(冯艳霞等, 2016)(黄梦诗等, 2019)。由于该方程的二次项系数均为负值, 可以推断方程代表的抛物面开口向下, 因而具有极大值点, 可以进行优化分析。由方程的一次项系数可以得出影响斑马鱼消化率的因素的主次

顺序为温度>浓度>时间。对该模型进行方差分析, 结果见表3。

表2 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab.2 Design and results for Box-Behnken responses surface methodology

实验号 No.	A 浓度 Concentration	B 时间 Time	C 温度 Temperature	消化率 Digestibility(%)
1	0	0	0	97.08
2	0	-1	1	97.21
3	-1	0	-1	95.78
4	0	0	0	97.81
5	-1	1	0	96.17
6	0	-1	-1	95.72
7	1	0	-1	95.15
8	0	1	-1	95.90
9	0	0	0	97.06
10	-1	-1	0	96.86
11	1	0	1	95.94
12	0	1	1	95.70
13	1	1	0	96.53
14	-1	0	1	96.26
15	1	-1	0	95.76

表3 回归模型方差分析

Tab.3 Analysis of variance of the regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	6.920	9	0.770	6.21	0.0292*
A 浓度 Concentration	0.360	1	0.360	2.88	0.1503
B 时间 Time	0.200	1	0.200	1.58	0.2647
C 温度 Temperature	0.820	1	0.820	6.61	0.0499
AB	0.530	1	0.530	4.30	0.0927
AC	0.024	1	0.024	0.19	0.6780
BC	0.710	1	0.710	5.76	0.0616
A ²	1.650	1	1.650	13.31	0.0148
B ²	0.370	1	0.370	3.02	0.1427
C ²	2.770	1	2.770	22.35	0.0052
残差 Residual	0.620	5	0.120		
失拟 Lack of Fit	0.250	3	0.085	0.46	0.7372
纯误差 Pure error	0.370	2	0.180		
总变异 Cor total	7.540	14			

*: $P<0.05$, 为差异显著

*: $P<0.05$, significant difference

由表3可以看出, 模型的 $P=0.0292$ (显著), 失拟项 $P=0.7372$ (不显著), 表明模型充分拟合实验数据, 该方程是斑马鱼消化率与消化工艺参数的合适数学模型。

2.7.3 响应面优化分析 等高线图可以直观地反映两变量交互作用的显著程度, 圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形与之相反(吕小京等, 2018)。根据回归方程绘制响应面(图9)。

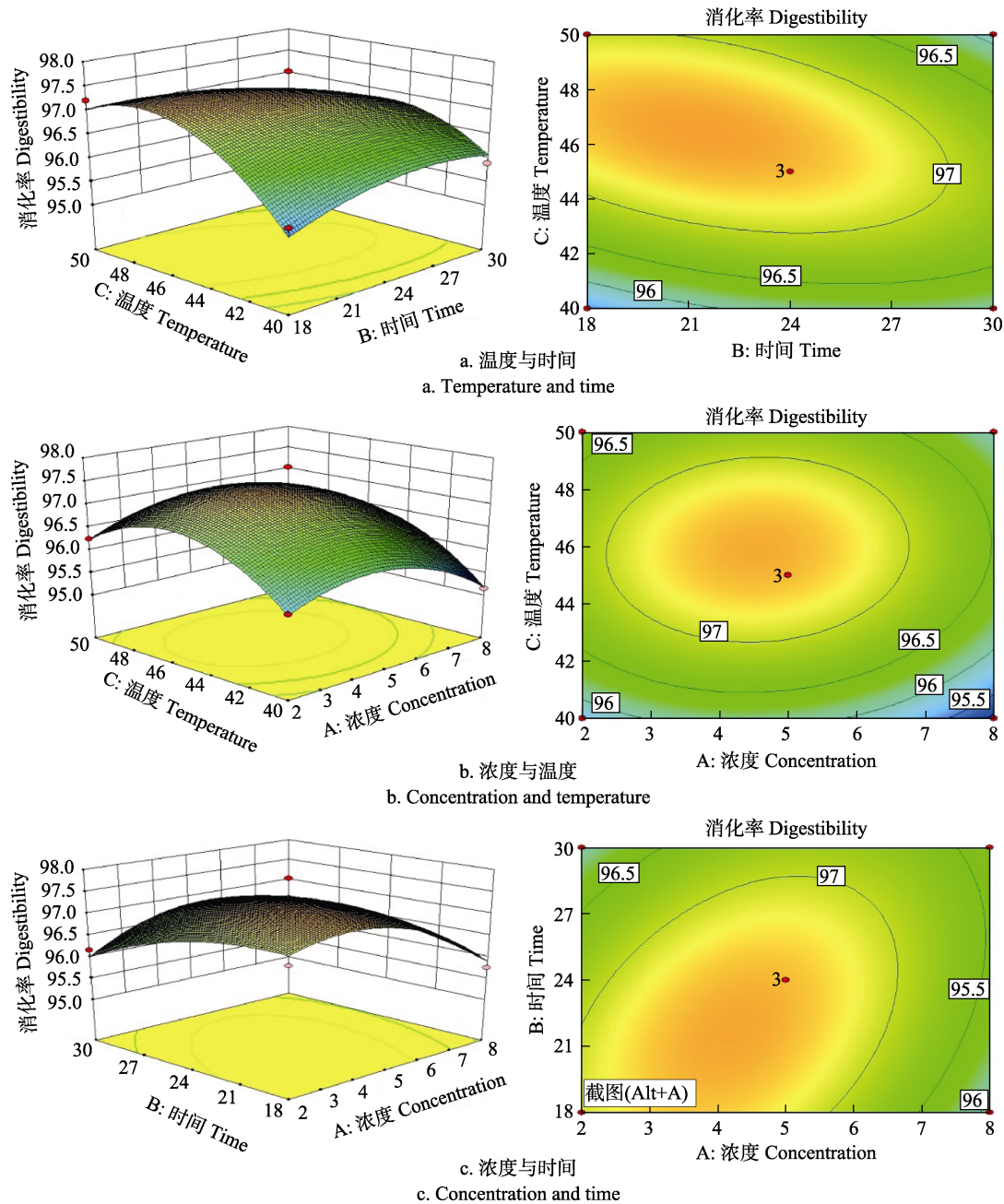


图 9 各因素交互作用对消化率的等高线和响应面图

Fig.9 Contour and response surface plots for the effects of different factors on the digestibility

图 9 中响应面的变化及等高线的形状可以直观地反映温度、时间和浓度 3 个因素对斑马鱼消化率的影响。由图 9a 可知, 当时间一定时, 消化率随着温度的增加而逐渐增大, 当温度达到一定值后, 消化率基本趋于稳定。由等高线的形状可以看出, 温度与时间的交互作用对响应值的作用显著。由图 9b 可知, 在相同的温度下, 消化率随着浓度的增加呈现先增大后减小的趋势。由等高线的形状可以看出, 温度和浓度的交互作用对响应值的影响显著。由图 9c 可知, 当浓度一定时, 消化率随着时间的增加而增加, 当时间增

加到一定值时, 继续增大时间, 消化率的增加却不明显, 稍有下降。时间与浓度的交互作用对响应值影响显著。**2.7.4 最佳条件的确定及验证** 通过软件分析, 得到以消化率为指标的最佳消化条件为浓度 4.06%、时间 20.15 h、温度 46.64℃, 此时的消化率预测值为 97.45%。结合实际操作, 将工艺条件调整为浓度 4%、时间 20 h、温度 47℃, 在此条件下进行 3 次实验, 测定消化率为(97.38±0.04)%, 相对误差为 0.07%, 处于误差范围内, 所以, 实验值与预测值可认为基本一致, 说明此消化条件下的回归模型方程可靠。

3 结论

化学消解法提取微塑料操作简单, 材料费用较低。但是, 化学消解中的消解液种类多, 不同生物需要的消解液的种类、温度和时间不同。除此之外, 使用化学消解法处理样品, 花费时间长, 并且在消解的过程中可能会有其他物质产生, 影响消解效果。因此, 从海洋生物中分离提取微塑料消化液的选择和消化条件的设置是至关重要的。本研究首先采用 KOH、H₂O₂、HNO₃ 和胰蛋白酶这 4 种消化液对斑马鱼进行消化, 研究表明, KOH 溶液比 H₂O₂、HNO₃ 和胰蛋白酶更适合作为消化液从斑马鱼中提取微塑料。KOH 溶液中可以有效的去除生物组织, 同时保持被测塑料聚合物结构的完整性。在单因素的基础上, 通过响应面优化实验分析表明, KOH 溶液作为消化液消化斑马鱼的最佳条件为浓度 4%、温度 47℃、时间 20 h。各因素对斑马鱼消化率的影响依次为温度>浓度>时间。此消化条件下, 实际测得的斑马鱼消化率为 97.38%。回归分析和验证实验表明该响应面法合理、可行。

参 考 文 献

- Abidli S, Lahbib Y, Trigui EMN. Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (northern Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 142: 243–252
- Alexandre D, Ludovic H, Guillaume D. Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 116: 346–359
- Araujo CF, Nolasco MM, Ribeiro AMP, *et al.* Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research*, 2018, 142: 426–440
- Avio CG, Gorbi S, Regoli F. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 2015, 111: 18–26
- Castillo AB, Al-Maslmani I, Obbard JP. Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 111(1–2): 260–267
- Catarino AI, Thompson R, Sanderson W, *et al.* Development and optimisation of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 36(4): 947–951
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, *et al.* Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(12): 2588–2597
- Courtene-Jones W, Quinn B, Murphy F, *et al.* Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*, 2017, 9(9): 1437–1445
- Dehaut A, Cassone AL, Frère L, *et al.* Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 2016, 215: 223–233
- Dekiff JH, Remy D, Klasmeier J, *et al.* Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. *Environmental Pollution*, 2014, 186: 248–256
- Espinosa C, García Beltrán JM, Esteban MA, *et al.* *In vitro* effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 30–38
- Feng YX, Jia YF, Gu HH, *et al.* Optimization of extraction conditions of Chinese chestnut peptides by response surface methodology and its DPPH· scavenging abilities. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(22): 315–319 [冯艳霞, 贾一凡, 顾海华, 等. 响应面法优化板栗多肽制备及其清除 DPPH· 能力的研究. *食品工业科技*, 2016, 37(22): 315–319]
- Gil-Delgado JA, Guijarro D, Gosálvez RU, *et al.* Presence of plastic particles in waterbirds faeces collected in Spanish lakes. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 732–736
- Huang MS, Yang QQ, Zhang Y, *et al.* Study on the effects of temperature, salinity, pH, phosphate, nitrate, and ammonium on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* using response surface methodology. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 132–140 [黄梦诗, 杨倩倩, 张艳, 等. 响应面法研究温度、盐度、pH 及磷酸盐、硝氮、氨氮对副溶血弧菌生长的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 132–140]
- Hwang J, Choi D, Han S, *et al.* An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of the Total Environment*, 2019, 684: 657–669
- Karami A, Golieskardi A, Choo CK, *et al.* A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*, 2016, 578: 485–494
- Li LY, Zhu JM, Li JN, *et al.* Review on methods of extraction and isolation of microplastics in aquatic organisms. *Marine Environmental Science*, 2019, 38(2): 188–197 [李凌云, 朱静敏, 李佳娜, 等. 水生生物样品中微塑料的提取和分离方法综述. *海洋环境科学*, 2019, 38(2): 188–197]
- Lu YF, Zhang Y, Deng YF, *et al.* Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science and Technology*, 2016, 50(7): 40–54
- Lü XJ, Cao DQ, Xu NJ. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from protein hydrolysate of the marine microalgae *Nannochloropsis* by response surface methodology. *Food Science*, 2018, 39(6): 183–188 [吕小京, 操德群, 徐年军. 响应面实验优化酶法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺. *食品科学*, 2018, 39(6): 183–188]
- Mao YF, Ai HN, Chen Y, *et al.* Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period. *Chemosphere*, 2018, 208: 59–68
- Santana MFM, Ascer LG, Custódio MR, *et al.* Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 106(1–2): 183–189
- Schirizzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, *et al.* Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 2017, 159: 579–587
- Su L, Nan BX, Hassell KL, *et al.* Microplastics biomonitoring in Australian urban wetlands using a common noxious fish (*Gambusia holbrooki*). *Chemosphere*, 2019, 228: 65–74
- Sun J, Dai XH, Wang QL, *et al.* Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Research*, 2019, 152(1): 21–37
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, *et al.* Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(9): 2430–2435
- Talwar PK, Jhingran AG. Inland fishes of India and adjacent countries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, 4(1):

- 135–136
- van Cauwenberghe L, Janssen CR. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 2014, 193: 65–70
- Vandermeersch G, van Cauwenberghe L, Janssen CR, *et al.* A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 2015, 193(Part B): 46–55
- Waite HR, Donnelly MJ, Walters LJ. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 129(1): 179–185
- Watts AJR, Lewis C, Goodhead RM, *et al.* Uptake and retention of microplastics by the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(15): 8823–8830
- Wen T. Plastic particles threaten chemical degradation of marine fish species. *Science Garden*, 2016(15): 30–31 [文天. 研究发现塑料颗粒威胁海洋鱼类物种化学品降解. *科学大观园*, 2016(15): 30–31]
- Wu B, Wu XM, Liu S, *et al.* Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 2019, 221: 333–341
- Zhu JM, Yu XY, Zhang Q, *et al.* Cetaceans and microplastics: First report of microplastic ingestion by a coastal delphinid, *Sousa chinensis*. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 649–654

(编辑 陈 辉)

Process Optimization of Microplastics Extraction and Isolation in Zebrafish Using Response Surface Methodology

LÜ Shiwei^{1,2}, ZHOU Deqing^{2①}, LIU Nan², YU Ying^{1,2}, SU Xiaojie²

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Drugs and Biological Products, Pilot National Laboratory Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract Recently, with the increase of global plastic production, microplastic accumulation in aquatic environments is increasing. This seriously endangers the living environment and aquatic organism health. Furthermore, it endangers human health through the food chain. Microplastic detection in aquatic products is fundamental to understanding microplastics. Using digestive compounds to extract and separate microplastic from aquatic organisms is an effective means. It is particularly important to choose the correct digestive compounds and conditions. In the present experiment, zebrafish was used as an aquatic model, and polystyrene was used as the raw material. Zebrafish and microplastics were mixed in proportion. The microplastics were separated and extracted using different digestive compounds. Initially, 10% KOH, 30% H₂O₂, 69% HNO₃, and trypsin were selected based on digestibility, recovery rate, Raman spectroscopic analysis, and scanning electron microscopy. The results showed that 30% H₂O₂ has the lowest digestibility and can change its chemical structure. Trypsin has the lowest recovery rate. Scanning electron microscopy and stereoscopic microscopy showed that 69% HNO₃ changed the microplastics color and corroded the surface. Therefore, 10% KOH solution was selected as the optimal digestive compound. Then, the optimal digestion conditions of KOH solution were determined using single factor and Box-Behnken design tests. The results showed that the optimum digestion conditions were: concentration – 4%, temperature – 47°C, time – 20 h, with 97.38% digestibility. The digestive compounds and conditions screened in this study could significantly improve zebrafish digestion efficiency. The results provided a new method for the digestion of aquatic products and further detection and analysis of microplastics in aquatic products.

Key words Zebrafish; Microplastic; Digestive compounds; Response surface analysis; Process optimization

① Corresponding author: ZHOU Deqing, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200213001

http://www.yykxjz.cn/

王建学, 卫育良, 徐后国, 梁萌青. 红鳍东方鲀对 8 种饲料原料的表观消化率. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 96-103

Wang JX, Wei YL, Xu HG, Liang MQ. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 96-103

红鳍东方鲀对 8 种饲料原料的表观消化率*

王建学^{1,2} 卫育良² 徐后国² 梁萌青^{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 青岛 266071)

摘要 本研究旨在探讨红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)幼鱼对红鱼粉、白鱼粉、豆粕、菜粕、花生粕、棉粕、玉米酒糟蛋白(DDGS)和肉骨粉中干物质、粗蛋白、粗脂肪、氨基酸、总能和总磷的表观消化率。实验饲料由 70%的基础饲料和 30%的待测饲料原料组成,并添加 0.1%的三氧化二钇(Y_2O_3)作为外源添加剂,选取平均体重为 37.90 g 的红鳍东方鲀幼鱼,随机分成 8 组,每组 3 个重复,每个重复 30 尾鱼,按照不同处理分别投喂相应饲料,采用虹吸法收集粪便。结果显示,白鱼粉、红鱼粉和豆粕的干物质表观消化率分别为 70.54%、69.02%和 60.37%,显著高于菜粕、棉粕及 DDGS($P<0.05$);粗蛋白的表观消化率为 50.91%~92.78%,肉骨粉粗蛋白表观消化率最低(50.91%),显著低于白鱼粉、红鱼粉、豆粕、菜粕、花生粕和 DDGS($P<0.05$),各待测饲料原料中总氨基酸表观消化率的变化趋势与粗蛋白的表观消化率基本一致;粗脂肪的表观消化率为 70.6%~94.19%,白鱼粉粗脂肪表观消化率最高(94.19%),显著高于棉粕和肉骨粉($P<0.05$);能量的表观消化率为 30.58%~90.01%,白鱼粉、红鱼粉、豆粕和花生粕总能表观消化率最高(76.26%~90.01%)($P<0.05$);磷的表观消化率为 9.13%~68.14%,白鱼粉和红鱼粉的总磷表观消化率最高(分别为 66.98%和 68.14%)($P<0.05$)。白鱼粉、红鱼粉的各种营养成分的表观消化率均较佳,肉骨粉及棉粕各种营养成分的表观消化率相对较差;豆粕及花生粕的粗蛋白消化率及必需氨基酸的消化率优于其他植物蛋白,菜粕次之。

关键词 红鳍东方鲀; 表观消化率; 饲料原料; 营养物质

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0096-08

鱼粉是水产饲料最重要的蛋白质源,但随着水产养殖业的发展以及饲料工业的进步,优质蛋白质源的鱼粉受资源和价格的限制,供应日益紧张,寻找可替代鱼粉的低价蛋白质源成为研究的热点,替代蛋白源营养评价及利用率就显得尤为重要。消化率是指动物所摄入的营养物质在体内被消化吸收的程度,评定蛋白源的表观消化率是评定蛋白源营养价值的重要方

式,也是研发配合饲料的重要步骤(Goddard *et al*, 2001; Silva *et al*, 1995)。在掌握饲料原料消化率的基础上,才能提高饲料的消化率,充分利用饲料原料,减少浪费及对水环境污染。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀亚目(Tetraodontoidei)、鲀总科(Tetraodontoidea)、鲀科

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD48)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47-G15)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD48), and China Agriculture Research System (CARS-47-G15)]. 王建学, E-mail: 1429156486@qq.com

① 通讯作者: 梁萌青, 研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-02-13, 收修改稿日期: 2020-02-24

(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*), 肉味鲜美, 营养丰富, 经济价值较高, 是我国北方重要的海水养殖鱼类。但红鳍东方鲀基础营养学研究相对缺乏, 特别是重要的饲料蛋白原料的消化率, 目前为止未见报道。本研究分析测定了红鳍东方鲀幼鱼对红鱼粉、白鱼粉、豆粕、菜粕、花生粕、棉粕、玉米酒糟蛋白(DDGS)和肉骨粉8种饲料原料的干物质、粗蛋白、粗脂肪、氨基酸、总能和总磷的表观消化率, 以期红鳍东方鲀精准饲料配方的设计提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以白鱼粉和豆粕作为主要蛋白源, 鱼油和豆油作为脂肪源, 小麦粉作为糖源配制基础饲料, 基础饲料组成及营养成分见表1。待测饲料原料为白鱼粉、红鱼粉、豆粕、棉粕、菜粕、花生粕、肉骨粉和DDGS(饲料原料营养成分见表2)。实验采用Cho等(1982)的方法, 实验饲料由基础饲料70%和待测原

表1 基础饲料配方及其化学组成(%干物质)

Tab.1 Formulation and proximate composition of reference diets (% dry matter)

原料 Ingredient	含量 Content	原料 Ingredient	含量 Content
白鱼粉 White fish meal	50.00	氯化胆碱 Choline chloride	1.00
豆粕 Soybean meal	18.00	磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	1.50
鱼油 Fish oil	3.00	三氧化二钇 Y ₂ O ₃	0.10
豆油 Soybean oil	3.00	维生素 C Vitamin C	0.50
小麦粉 Wheat meal	14.90	化学成分 Chemical composition (%)	
酵母粉 Yeast meal	3.00	干物质 Dry matter	93.71
卵磷脂 Lecithin	2.50	粗蛋白 Crude protein	48.86
复合维生素 Vitamin premix ¹	1.00	粗脂肪 Crude lipid	9.89
复合矿物质 Mineral premix ²	1.00	能量 Gross energy (MJ/kg)	21.25
诱食剂 Attractant	0.50	总磷 Total phosphorus (g/kg)	26.40

注: 1: 维生素混合物(mg/g 混合物): 硫胺素, 2.5 mg; 核黄素, 4.5 mg; 盐酸吡哆醇, 2 mg; 维生素 B₁₂, 0.01 mg; 生物素, 0.12 mg; 维生素 K₃, 1 mg; 肌醇, 80 mg; 泛酸, 6 mg; 烟酸, 20 mg; 叶酸, 2 mg; 维生素 A, 3.2 mg; 维生素 D, 0.5 mg; 维生素 E, 12 mg; 次粉 867 mg

2: 矿物质混合物(mg/g 混合物): 氟化钠, 0.2 mg; 碘化钾, 0.08 mg; 氯化钴, 5 mg; 硫酸铜, 1 mg; 硫酸铁, 8 mg; 硫酸锌, 5 mg; 硫酸镁, 120 mg; 磷酸二氢钙, 300 mg; 氯化钠, 10 mg; 沸石粉, 551 mg

Note: 1: Vitamin premix (mg/g premix): thiamine 2.5 mg; riboflavin 4.5 mg; pyridoxine 2 mg; vitamin B₁₂ 0.01 mg; biotin 0.12 mg; menadione 1 mg; inositol 80 mg; pantothenate 6 mg; tocopherol acetate 20 mg; folic acid 2 mg; vitamin A 3.2 mg; vitamin D 0.5 mg; vitamin E 12 mg; wheat flour 867 mg

2: Mineral premix (mg/g premix): NaF 0.2 mg; KI 0.08 mg; CoCl₂·6H₂O 5mg; CuSO₄·5H₂O 1mg; FeSO₄·7H₂O 8 mg; ZnSO₄·7H₂O 5 mg; MnSO₄·4H₂O 120 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 300 mg; NaCl 10mg; Mordenzeo 551 mg

表2 实验饲料原料营养成分组成

Tab.2 Proximate chemical composition of experimental feed ingredients (%)

项目 Items	红鱼粉 ¹ BFM	白鱼粉 WFM	肉骨粉 MBM	豆粕 SBM	菜粕 RSM	棉粕 CSM	花生粕 PNM	玉米酒糟蛋白 DDGS
干物质 Dry matter	96.81	96.64	99.07	92.31	95.28	97.26	96.31	93.76
粗蛋白 Crude protein	77.44	71.04	29.95	51.94	60.91	60.91	54.90	35.50
粗脂肪 Crude lipid	7.39	7.61	2.21	0.56	2.56	2.56	0.27	1.44

注: ¹原料来源: 红鱼粉 BFM: 秘鲁进口; 白鱼粉 WFM: 俄罗斯进口; 肉骨粉 MBM: 国产市售; 豆粕 SBM、棉粕 CSM(国产 50 棉粕)、菜粕 RSM(双低菜粕)、花生粕 PNM 和玉米酒糟蛋白 DDGS: 山东海鼎农牧有限公司

Note: ¹: BFM, brown fish meal, imported from Peru; WFM, white fish meal, imported from Russia; MBM, meat and bone meal, from local market; SBM, soybean meal, RSM, rapeseed meal, CSM, cottonseed meal, PNM, local 54.9 peanut meal, and DDGS, distillers dried grains with solubles, obtained from Shandong Haiding Agriculture and animal husbandry Co., LTD

料 30%组成, 并添加 0.1%的氧化钇(Y_2O_3)为外源指示剂。所有原料测定常规成分后, 粉碎过 80 目筛, 按配方称量原料, 逐级混匀, 用制粒机制成直径为

2 mm 的颗粒饲料, 55℃鼓风干燥 12 h 后置于-20℃冷库保存。实验饲料的化学组成及氨基酸组成分别见表 3 和表 4。

表 3 实验饲料化学成分组成

Tab.3 Proximate chemical composition of experimental feeds (%)

项目 Item	红鱼粉 BFM	白鱼粉 WFM	肉骨粉 MBM	豆粕 SBM	菜粕 RSM	棉粕 CSM	花生粕 PNM	玉米酒糟蛋白 DDGS
干物质 Dry matter	93.47	92.75	94.74	93.75	90.84	92.33	94.24	93.66
粗蛋白 Crude protein	51.67	49.65	38.05	46.57	42.89	47.44	44.90	40.08
粗脂肪 Crude lipid	10.78	11.25	8.75	9.04	9.09	8.82	8.84	13.40
总能 Gross energy (MJ/kg)	21.06	21.51	17.98	20.98	20.98	20.90	21.02	21.66
总磷 Total phosphorus (g/kg)	33.70	29.50	51.10	23.30	25.60	16.70	19.10	20.00

表 4 实验饲料氨基酸组成

Tab.4 Amino acid composition of experimental feeds (%)

氨基酸 Amino acid	红鱼粉 BFM	白鱼粉 WFM	肉骨粉 MBM	豆粕 SBM	菜粕 RSM	棉粕 CSM	花生粕 PNM	玉米酒糟蛋白 DDGS
苏氨酸 Thr	2.02	2.15	1.53	1.43	1.81	1.71	1.61	1.32
缬氨酸 Val	2.62	2.72	1.99	1.99	2.57	2.24	2.32	1.99
蛋氨酸 Met	0.39	0.48	0.44	0.52	0.62	0.27	0.58	0.19
异亮氨酸 Ile	2.28	2.31	1.59	1.74	2.14	1.81	1.96	1.61
亮氨酸 Leu	3.77	3.82	2.66	2.85	3.43	3.11	3.32	3.14
苯丙氨酸 Phe	2.38	2.57	1.93	2.60	1.98	2.47	2.23	2.80
赖氨酸 Lys	3.68	3.36	2.21	2.63	2.82	2.52	2.57	2.31
组氨酸 His	1.44	1.45	1.08	2.35	1.08	1.21	1.02	0.83
精氨酸 Arg	2.53	2.37	1.99	3.14	2.21	3.27	3.00	1.83
牛磺酸 Tau	0.30	0.19	0.12	0.14	0.14	0.13	0.14	0.19
天冬氨酸 Asp	3.86	4.38	3.34	3.15	3.59	4.10	4.01	2.04
丝氨酸 Ser	1.88	1.99	1.49	1.47	1.74	1.77	1.80	1.37
谷氨酸 Glu	7.24	7.50	5.69	5.62	7.33	7.73	7.67	5.08
甘氨酸 Gly	2.78	2.80	2.63	1.80	2.60	2.20	2.51	1.85
丙氨酸 Ala	2.92	2.89	2.25	1.89	2.57	2.17	2.36	2.21
胱氨酸 Cys	0.12	0.87	1.18	0.94	0.41	0.43	0.09	0.20
酪氨酸 Tyr	1.28	1.46	0.89	1.19	1.37	1.09	1.47	0.90
脯氨酸 Pro	2.17	1.94	2.09	1.85	3.42	1.96	2.91	2.37
必需氨基酸 EAA	21.11	21.23	15.43	19.25	18.65	18.61	18.60	16.03
非必需氨基酸 NEAA	22.54	24.02	19.67	18.07	23.18	21.57	22.98	16.21
总氨基酸 TAA	43.65	45.24	35.10	37.32	41.83	40.18	41.58	32.24

1.2 实验鱼来源及驯化

实验用鱼苗来自河北唐山海都水产食品有限公司, 体重为 14.95 g, 在暂养池(方形, 5.0 m×5.0 m×1.5 m)中用商业配合饲料(蛋白质水平为 47.74%, 脂肪水平为 10.01%)进行为期 28 d 转饵驯化, 使红鳍东方鲀从摄食冰鲜杂鱼转为摄食饲料。为防止实验期间红鳍东方鲀之间残食, 对每尾幼鱼剪牙, 然后继续在暂养池中暂养 14 d, 使其适应养殖环境。

1.3 饲养管理与粪便收集

养殖实验在山东省烟台市海阳市黄海水产公司基地进行, 选择初始体重为 37.90 g 的红鳍东方鲀幼鱼在养殖桶(方形, 0.7 m×0.7 m×0.4 m)中进行, 在 08:00 和 19:00 手工缓慢投喂至表观饱食。每天在投饲 1 h 后清除残饵, 5 h 后开始采用虹吸法收集聚集的粪便, 将粪便于 55℃烘干后, 置-20℃冰箱保存, 用于测定饲料原料的表观消化率。养殖过程中, 养殖

车间采用自然光周期, 流水养殖, 水温为 20℃~22℃, 盐度为 30~31, pH 为 7.4~8.2, 溶解氧(DO)为 5~7 mg/L。

1.4 样品分析与消化率计算

饲料原料、实验饲料及鱼体常规成分的分析均采用(AOAC, 1995)的标准方法。其中, 水分含量用(105±2)℃ 常温干燥法; 粗蛋白含量采用凯氏定氮仪测定(VELP, UDK142 automatic distillation unit, VELP, Usmate, MB, 意大利); 粗脂肪采用索氏抽提仪测定(Foss Tecator, Hoganas, 瑞典); 饲料、粪便及原料氨基酸分析采用盐酸水解法, 通过全自动氨基酸分析仪(日立 L-8900, 日本)测定; 饲料及粪便的能量采用氧弹仪(Parr 6100, 美国)测定; 饲料、粪便中的磷和钪使用电感耦合等离子体发射光谱仪(Thermo iCAP 7600 ICP-OES, 美国)测定。

基础饲料和实验饲料干物质、营养成分(蛋白质、脂肪、磷和氨基酸)及能量的表观消化率计算公式如下:

$$ADC=(1-D_Y/F_Y) \times 100;$$

$$ADC_d=[1-(F/D) \times (F_Y/D_Y)] \times 100;$$

$$ADC_i=(ADC_t-0.7 \times ADC_r)/(1-0.7)$$

式中, ADC 为饲料中干物质的表观消化率(%); ADC_d 为饲料中某营养物质的表观消化率(%); ADC_i 为待测蛋白质源的表观消化率(%); D_Y 为饲料中 Y_2O_3

的含量(%); F_Y 为粪便中 Y_2O_3 的含量(%); F 为粪便中对应的营养物质的含量(%); D 为实验饲料中对应营养物质的含量(%); ADC_t 为实验饲料中对应营养物质的表观消化率(%); ADC_r 为基础饲料中对应营养物质的表观消化率(%)。

1.5 数据统计

实验所得数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示。实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 当差异显著时($P<0.05$), 采用 Tukey 检验进行多重比较。

2 结果

2.1 红鳍东方鲀对 8 种饲料原料中干物质、粗蛋白、粗脂肪、总磷和总能的表现消化率

红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料干物质、粗蛋白、粗脂肪、氨基酸、总能和总磷的表观消化率结果见表 5。干物质的表观消化率在 43.35%~70.54%之间。其中, 白鱼粉的消化率最高, 与红鱼粉及豆粕无显著性差异($P>0.05$), 显著高于 DDGS、菜粕、棉粕和肉骨粉(43.35%~46.39%)($P<0.05$)。植物蛋白中豆粕干物质消化率最高, 显著高于菜粕、棉粕及 DDGS($P<0.05$), 与花生粕无显著差异($P>0.05$)。

表 5 红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料干物质、粗蛋白、粗脂肪、能量以及磷的表观消化率
Tab.5 Apparent digestibility of nutrients and energy in tested feed ingredients of *T. rubripes* (%)

项目 Items	表观消化率 Apparent digestibility							
	红鱼粉 BFM	白鱼粉 WFM	肉骨粉 MBM	豆粕 SBM	菜粕 RSM	棉粕 CSM	花生粕 PNM	玉米酒糟蛋 白 DDGS
干物质 Dry matter	69.02±3.79 ^{cd}	70.54±1.39 ^d	43.35±2.41 ^a	60.37±3.00 ^{cd}	44.08±0.77 ^a	43.87±1.33 ^a	57.27±2.22 ^{bc}	46.39±2.88 ^{ab}
粗蛋白 Crude protein	88.57±2.13 ^{cd}	92.78±2.66 ^d	50.91±3.28 ^a	84.01±1.34 ^{cd}	78.27±6.01 ^{bcd}	62.16±4.98 ^{ab}	83.32±1.13 ^{cd}	72.50±3.63 ^{bc}
粗脂肪 Crude lipid	90.95±0.43 ^{bc}	94.19±4.28 ^c	78.33±3.08 ^{ab}	89.83±1.22 ^{bc}	80.66±4.91 ^{abc}	70.60±4.38 ^a	89.82±1.02 ^{bc}	84.38±0.62 ^{ab}
总能 Gross energy	90.01±2.60 ^c	88.62±2.62 ^c	30.58±4.58 ^a	76.26±2.87 ^c	50.39±0.84 ^b	46.79±2.89 ^b	88.67±2.34 ^c	39.17±3.13 ^{ab}
总磷 Total phosphorus	68.14±5.25 ^d	66.98±3.17 ^d	31.04±4.35 ^{bc}	20.94±1.67 ^{ab}	45.20±4.06 ^c	9.13±0.50 ^a	31.74±0.59 ^{bc}	37.20±1.87 ^c

注: 同一行数值中右上角不同小写字母表示组间存在显著差异($P<0.05$), 下同

Note: Data within the same row with different superscriptes are significantly different ($P<0.05$), the same as below

饲料原料粗蛋白的表观消化率在 50.91%~92.78%之间, 其中, 白鱼粉的表观消化率最高为 92.78%, 红鱼粉、菜粕、豆粕和花生粕也均在 78%以上, 且与白鱼粉无显著性差异($P>0.05$); 肉骨粉和棉粕的粗蛋白表观消化率分别是 50.91%和 62.16%, 显著低于白鱼粉、红鱼粉、豆粕和花生粕($P<0.05$); 植物蛋白中豆粕粗蛋白消化率最高, 显著高于棉粕($P<0.05$), 与花生粕、菜粕及 DDGS 无显著差异($P>0.05$)。

饲料原料粗脂肪的表观消化率为 70.6%~

94.19%, 其中, DDGS、白鱼粉、菜粕、豆粕、红鱼粉和花生粕粗脂肪表观消化率较高, 均在 80%以上, 且各组之间无显著性差异($P>0.05$); 棉粕和肉骨粉粗脂肪表观消化率分别为 70.60%和 78.33%, 显著低于白鱼粉组($P<0.05$)。

饲料原料的能量表观消化率为 30.58%~90.01%, 其中, 白鱼粉、豆粕、红鱼粉和花生粕的能量表观消化率显著高于 DDGS、菜粕、棉粕和肉骨粉($P<0.05$), 肉骨粉的能量表观消化率显著低于白鱼粉、

红鱼粉、豆粕、菜粕、花生粕和棉粕($P<0.05$)。

饲料原料的磷表观消化率为 9.13%~68.14%，其中，棉粕磷的表观消化率显著低于白鱼粉、红鱼粉、菜粕、花生粕、肉骨粉和 DDGS($P<0.05$)，白鱼粉和红鱼粉的磷的表观消化率显著高于豆粕、菜粕、花生粕、棉粕、肉骨粉和 DDGS($P<0.05$)。

2.2 红鳍东方鲀对 8 种饲料原料中氨基酸的表观消化率

红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料的氨基酸的表观消化率如表 6 所示，红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料的氨基酸的表观消化率差异较大，但各饲料原料的总氨基酸表观消化率变化趋势与各自的粗蛋白表观消化率基本一致。白鱼粉和红鱼粉的总氨基酸表观消化率最高，分别达到 84.35%和 85.79%，显著高于菜粕、豆粕、花生粕、棉粕、肉骨粉和 DDGS($P<0.05$)，且这 2 组氨基酸组成较为均衡，必需氨基酸的表观消

化率均在 75%以上。DDGS 的总氨基酸表观消化率为 61.21%，显著低于白鱼粉、红鱼粉、豆粕、花生粕和棉粕，显著高于肉骨粉($P<0.05$)。豆粕和花生粕总氨基酸的表观消化率分别为 76.40%和 75.57%，二者间无显著性差异($P>0.05$)，豆粕必需氨基酸表观消化率为 78.39%~95.35%，非必需氨基酸表观消化率为 20.68%~87.52%，花生粕必需氨基酸的表观消化率为 74.02%~85.10%，非必需氨基酸表观消化率为 40.77%~86.75%。棉粕和菜粕的总氨基酸 69.26%和 67.63%，棉粕必需氨基酸表观消化率为 63.74%~80.89%，非必需氨基酸的表观消化率为 28.46%~80.70%，菜粕必需氨基酸表观消化率为 63.90%~82.18%，非必需氨基酸的表观消化率为 36.72%~81.40%。肉骨粉总氨基酸表观消化率为 41.90%，显著性低于白鱼粉、红鱼粉、菜粕、棉粕、豆粕、花生粕和 DDGS($P<0.05$)，必需氨基酸表观消化率为 25.08%~57.82%，非必需氨基酸表观消化率为 15.26%~59.38%。

表 6 红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料氨基酸的表观消化率
Tab.6 Apparent digestibility of amino acids in tested feed ingredients of *T. rubripes* (%)

氨基酸 Amino acid	红鱼粉 BFM	白鱼粉 WFM	肉骨粉 MBM	豆粕 SBM	菜粕 RSM	棉粕 CSM	花生粕 PNM	玉米酒糟蛋 白 DDGS
苏氨酸 Thr	90.83±2.85 ^d	80.33±3.23 ^{cd}	25.08±4.38 ^a	79.06±3.31 ^{cd}	63.90±5.44 ^{bc}	65.18±4.04 ^c	74.02±2.98 ^{cd}	44.00±5.65 ^{ab}
缬氨酸 Val	93.06±2.49 ^d	91.49±2.85 ^d	45.02±4.69 ^a	95.35±2.68 ^d	68.39±4.03 ^b	80.89±2.96 ^{bcd}	83.77±2.36 ^{cd}	71.32±1.89 ^{bc}
蛋氨酸 Met	75.08±4.82 ^{bc}	75.99±2.33 ^{bc}	29.79±3.44 ^a	78.85±1.89 ^c	78.07±0.90 ^{bc}	63.74±4.10 ^b	76.91±2.95 ^{bc}	24.81±1.59 ^a
异亮氨酸 Ile	89.48±3.90 ^c	84.82±2.29 ^{bc}	39.14±3.73 ^a	80.65±2.78 ^{bc}	66.18±1.19 ^b	72.50±8.33 ^{bc}	75.43±4.46 ^{bc}	65.33±3.12 ^b
亮氨酸 Leu	88.58±1.79 ^c	84.32±4.20 ^{bc}	44.37±3.65 ^a	83.22±3.54 ^{bc}	68.57±3.64 ^b	71.54±4.51 ^{bc}	77.26±3.16 ^{bc}	72.34±1.36 ^b
苯丙氨酸 Phe	91.01±3.63 ^b	88.54±3.59 ^b	56.78±3.05 ^a	78.39±4.69 ^b	75.40±5.58 ^{ab}	75.97±4.92 ^{ab}	78.67±1.02 ^b	81.26±4.59 ^b
赖氨酸 Lys	93.28±0.81 ^{de}	93.93±1.08 ^c	57.82±4.25 ^a	89.72±2.53 ^{de}	77.90±2.99 ^{bc}	71.41±3.99 ^{ab}	83.46±1.62 ^{bcd}	79.54±3.80 ^{bcd}
组氨酸 His	91.86±1.92 ^c	90.05±1.97 ^c	33.55±6.98 ^a	80.56±2.81 ^{bc}	82.18±4.42 ^{bc}	63.85±2.34 ^b	75.39±3.42 ^{bc}	66.02±3.41 ^b
精氨酸 Arg	90.42±3.30 ^d	90.78±2.04 ^d	44.53±3.93 ^a	83.18±2.25 ^{cd}	79.23±2.85 ^{bcd}	75.95±1.78 ^{bc}	85.10±2.95 ^{cd}	68.20±3.20 ^b
牛磺酸 Tau	81.62±2.66 ^d	73.61±4.24 ^{cd}	15.26±1.09 ^a	53.70±3.11 ^b	47.49±4.79 ^b	57.11±6.46 ^{bc}	40.77±2.20 ^b	56.95±4.86 ^{bc}
天冬氨酸 Asp	88.37±1.56 ^d	82.68±5.04 ^{cd}	59.38±6.87 ^{ab}	87.52±3.25 ^d	65.43±0.82 ^{bc}	80.70±4.61 ^{cd}	86.62±2.82 ^d	40.04±4.19 ^a
丝氨酸 Ser	87.12±2.89 ^c	88.42±3.66 ^c	38.56±4.95 ^a	71.27±2.54 ^{bc}	81.40±4.00 ^{bc}	76.54±4.21 ^{bc}	81.77±2.57 ^{bc}	64.57±4.04 ^b
谷氨酸 Glu	80.71±4.46 ^{bc}	90.45±3.35 ^c	52.24±3.47 ^a	75.11±1.58 ^{bc}	77.83±2.65 ^{bc}	71.82±3.80 ^b	78.74±1.82 ^{bc}	69.87±4.47 ^b
甘氨酸 Gly	78.29±2.36 ^d	89.01±3.40 ^d	45.24±1.04 ^a	76.79±1.91 ^d	60.42±3.89 ^b	79.95±3.65 ^d	75.00±2.23 ^{cd}	61.49±3.91 ^{bc}
丙氨酸 Ala	90.38±3.61 ^{cd}	92.53±2.53 ^d	20.71±2.64 ^a	83.50±1.94 ^{bcd}	76.85±3.62 ^{bcd}	71.66±6.52 ^{bc}	73.74±2.12 ^{bcd}	70.06±5.52 ^b
胱氨酸 Cys	73.26±0.80 ^b	69.19±4.15 ^b	33.24±4.40 ^a	20.68±4.06 ^a	66.01±1.49 ^b	28.46±3.68 ^a	61.66±2.40 ^b	63.09±2.53 ^b
酪氨酸 Tyr	90.59±4.15 ^d	79.79±4.30 ^{cd}	46.88±1.64 ^a	75.31±4.05 ^{bcd}	44.47±4.39 ^a	65.56±4.30 ^{bc}	86.75±2.40 ^d	60.64±2.08 ^{ab}
脯氨酸 Pro	66.19±3.10 ^{bc}	66.41±3.41 ^{bc}	36.60±3.65 ^a	68.74±3.90 ^c	36.72±3.02 ^a	71.95±1.98 ^c	63.54±3.12 ^{bc}	52.10±0.87 ^b
必需氨基酸 EAA	89.31±0.25 ^f	86.54±1.16 ^{ef}	41.71±0.62 ^a	83.01±1.31 ^{de}	73.28±1.49 ^c	71.28±1.33 ^{bc}	79.23±1.51 ^d	63.34±3.75 ^b
非必需氨基酸 NEAA	81.70±2.60 ^d	81.40±1.03 ^d	38.46±0.42 ^a	68.53±2.32 ^{bc}	61.44±1.52 ^b	68.21±2.42 ^{bc}	77.06±2.99 ^{cd}	60.19±1.14 ^b
总氨基酸 TAA	85.79±0.43 ^e	84.35±1.93 ^e	41.90±0.84 ^a	76.40±2.24 ^d	67.63±0.86 ^{bc}	69.26±2.97 ^{cd}	75.67±1.30 ^d	61.21±0.97 ^b

白鱼粉赖氨酸消化率最高，显著高于肉骨粉、棉粕及 DDGS($P<0.05$)，与红鱼粉、豆粕及花生粕无显著差异($P>0.05$)。除苯丙氨酸、牛磺酸及胱氨酸的消化率较低外，红鳍东方鲀对白鱼粉、红鱼粉的其他氨

基酸的消化率均较高；除精氨酸外，花生粕的所有必需氨基酸消化率虽低于豆粕，但无显著差异($P>0.05$)；红鳍东方鲀对肉骨粉的氨基酸消化率都较低；除赖氨酸和苏氨酸，红鳍东方鲀对 DDGS 氨

基酸消化率均较低。

3 讨论

本研究以红鳍东方鲀幼鱼为研究对象, 采用氧化钇(Y_2O_3)为外源指示剂, 在饲料配制方面, 采用 Cho 等(1982)的“套算法”, 即用“70%的基础饲料和 30%的待测饲料原料”配制成实验饲料, 这样既保证了红鳍东方鲀的正常生长生理需求, 又保证了所测蛋白原料表观消化率的数据更加接近鱼体营养消化生理的真实情况。

干物质的表观消化率反映了鱼类对饲料原料总体的消化吸收水平。本研究红鳍东方鲀幼鱼对白鱼粉和红鱼粉的干物质表观消化率显著高于植物性饲料, 这与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(杨传哲等, 2016)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)(任鸣春等, 2012)、真鲷(*Pagrus major*)(McGoogan *et al*, 1996)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(李会涛等, 2007)、条纹鲈(*Morone saxatilis*)(Sullivan *et al*, 1995)和罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)(Guimarães *et al*, 2008)的研究结果相似。而且, 目前已有研究表明, 肉食性鱼类对鱼粉等动物性饲料原料的干物质消化吸收要比植物性饲料原料好(Bergot *et al*, 1983)。肉食性鱼类利用纤维素的能力较差, 可能是植物性饲料原料表观消化率偏低的原因, 本研究肉骨粉的干物质表观消化率为 43.35%, 显著低于美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)(86%)(Gaylord *et al*, 1996), 同时也显著低于豆粕和花生粕($P < 0.05$), 这和很多已有的结果不同, 但在大黄鱼(李会涛等, 2007)中有类似的情况。现有报道指出, 肉骨粉不同批次差异较大, 可比较性较差, 当肉骨粉中骨粉含量较大时, 可能会使消化吸收情况受到影响(李会涛等, 2007), 这可能是其干物质消化率较低的原因。

饲料原料蛋白质的质量是影响鱼类生长性能的重要因素, 饲料蛋白质粗蛋白表观消化率是饲料配制切实有效的测定方法。本研究中, 红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料的粗蛋白表观消化率中, 白鱼粉的最高, 达到 92.78%, 红鱼粉次之, 这与大部分报道的肉食性鱼类的结果一致。白鱼粉、红鱼粉的粗蛋白表观消化率与豆粕、花生粕及菜粕无显著性差异($P > 0.05$), 说明红鳍东方鲀对豆粕、花生粕及菜粕的蛋白质消化率较高, 可以有效地部分替代鱼粉。本研究发现, 红鳍东方鲀对肉骨粉粗蛋白消化率较低(50.91%), 花鲈(*Lateolabrax japonicus*)对肉骨粉的消化率虽然在所测定的鱼粉、肉骨粉、豆粕、棉粕、花生粕及菜粕中处于较低水平, 但也达到了 77.39% (常青等, 2005); 虹

鳊(*Oncorhynchus mykiss*)(Bureau *et al*, 1999)对肉骨粉的消化率为 83%~89%, 乌鳢(*Ophiocephalus argus*)(Yu *et al*, 2013)的粗蛋白消化率为 80.10%, 粗蛋白的消化率虽与鱼种有关, 但也受肉骨粉的加工条件和肉的质量的影响。对于植物蛋白, 豆粕和花生粕蛋白质消化较高, 菜粕次之, 棉粕最差, 这与花鲈的研究结果一致(常青等, 2005)。本研究 DDGS 的消化率为 72.5%, 远远高于大菱鲆(杨传哲等, 2016)对玉米蛋白粉的消化率(48.97%~57.20%), 低于钟国防等(2012)报道暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)玉米蛋白粉的消化率(94.97%), 但据报道军曹鱼(Zhou *et al*, 2004)、建鲤(*Cyprinus carpio var. Jian*)(梁丹妮等, 2010)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(韩斌等, 2009)对玉米蛋白粉中粗蛋白质的表观消化率分别为 94.42%、92.85%及 90.40%。可能原因是 DDGS 是一种以玉米为原料发酵制取乙醇后产出的酒糟, 含有蛋白质、B 族维生素及氨基酸, 是一种非常优良的饲料, 与玉米蛋白粉不同的蛋白质含量及其他成分差异较大。本研究发现, 红鳍东方鲀对肉骨粉和棉粕蛋白质消化率较低, 建议在配方中不宜高水平添加。影响饲料蛋白源中粗蛋白表观消化率的因素主要有两方面, 一是蛋白质的质量取决于蛋白源的氨基酸组成和可利用性, 在植物蛋白替代鱼粉时, 往往因为植物蛋白氨基酸不平衡而影响其蛋白质利用率(Hasan *et al*, 1997); 二是植物性蛋白源中往往存在一种或多种抗营养因子, 这也影响粗蛋白的消化吸收(Francis *et al*, 2001)。

氨基酸的组成和表观消化率可以反映饲料原料的蛋白质质量。本研究中, 红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料氨基酸表观消化率的变化趋势与粗蛋白的表观消化率基本一致, 这与银鲈(*Bidyanus bidyanus*)(周兴华等, 2003)和大菱鲆(杨传哲等, 2016)中得出的结果相一致。饲料中必需氨基酸的缺乏会导致鱼体生长缓慢(Bergot *et al*, 1983), 在选择饲料原料时, 饲料氨基酸的组成至关重要。DDGS 的蛋氨酸和苏氨酸的消化率较低, 导致粗蛋白消化率较低; 而肉骨粉的蛋氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸及精氨酸均较低, 与粗蛋白消化率最低的结果相吻合。红鳍东方鲀氨基酸消化率的获得使更精准更经济地进行配方设计得以实现。

脂肪是鱼类体内重要的能源物质。本研究红鳍东方鲀幼鱼对 8 种饲料原料的脂肪表观消化率差异显著($P < 0.05$), 在 70.60%~94.19%之间。说明红鳍东方鲀对大部分饲料的脂肪具有很好的消化能力, 除棉粕和肉骨粉的消化率较低外, 其余的饲料脂肪消化率都在 80%以上, 与大多数鱼类都可利用脂肪的特性一

致。棉粕的粗脂肪表观消化率为 70.60%，低于花鲈(常青等, 2005)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) (NRC, 1993)的研究结果, 分别为 80.46%和 88%, 高于大黄鱼的研究结果(61.3%)(李会涛等, 2007)。肉骨粉的粗脂肪表观消化率为 78.33%, 这与美国红鱼的研究结果接近(McGoogan *et al*, 1996; Gaylord *et al*, 1996)。

研究表明, 肉食性鱼类对动物性饲料原料的能量消化率要优于植物性饲料原料(Cho *et al*, 1982; Sullivan *et al*, 1995; Bergot *et al*, 1983)。本研究中, 肉骨粉能量的表观消化率最低(30.58%), 这可能与肉骨粉的原料组成、加工过程密切相关。

本研究中, 对于花生粕、棉粕、菜粕和 DDGS 等原料磷的表观消化率为 9.13%~45.20%, 存在普遍偏低的现象, 这种情况在其他鱼类如斑点叉尾鲷(NRC, 1993)、虹鳟(Lall, 1991)等肉食性鱼类中也有类似的结果, 豆粕、花生粕和棉粕等植物性饲料原料中的磷是以植酸及其盐的形式存在(Lall, 1991), 而鱼类无法利用植酸磷, 这也影响了红鳍东方鲀幼鱼对植物性饲料原料磷的表观消化率(Marty *et al*, 1996)。本研究中的肉骨粉的磷表观消化率显著高于棉粕, 显著低于白鱼粉和红鱼粉, 肉骨粉中骨骼含量高, 而骨骼中含有大量的磷, 这部分磷大多以不溶的羟基磷石灰和磷酸钙的形式存在, 鱼类不易吸收(Lall, 1991)。这也是同为动物性饲料原料, 肉骨粉的磷表观消化率要低于鱼粉的原因。

4 小结

白鱼粉和红鱼粉的各种营养成分的表观消化率均较佳, 肉骨粉及棉粕各种营养成分的表观消化率相对较差; 豆粕及花生粕的粗蛋白质消化率及必需氨基酸的消化率优于其他植物蛋白, 菜粕次之, 可在红鳍东方鲀饲料中适量添加。

参 考 文 献

- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14th edn. Williams S(Eds), Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1995, 1141
- Bergot F, Breque J. Digestibility of starch by rainbow trout: Effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture*, 1983, 34(3-4): 203-212
- Bureau DP, Harris AM, Cho CY. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1999, 180(3): 345-358
- Chang Q, Liang MQ, Wang JL, *et al*. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Acta Hydrobiologica Sinia*, 2005, 29(2): 172-176 [常青, 梁萌青, 王家林, 等. 花鲈对不同饲料原料的表观消化率. *水生生物学报*, 2005, 29(2): 172-176]
- Cho CY, Slinger SJ, Bayley HS. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Comparative Biochemistry*, 1982, 73(1): 25-41
- Francis G, Harinder PSM, Klaus B. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 2001, 199(3-4): 197-227
- Gaylord TG, Iii DMG. Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 1996, 139(3-4): 303-314
- Goddard JS, McLean E. Acid-insoluble ash as an inert reference material for digestibility studies in tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 2001, 194(1-2): 93-98
- Guimarães IG, Pezzato LE, Barros MM. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14(5): 396-404
- Han B, Hua XM, Zhou HQ. Study on apparent digestibilities (AD) of corn gluten meal for *Litopenaeus vannamei*. *Feed Industry*, 2009, 30(4): 24-25 [韩斌, 华雪铭, 周洪琪. 凡纳滨对虾对玉米蛋白粉表观消化率的研究. *饲料工业*, 2009, 30(4): 24-25]
- Hasan MR, Macintosh DJ, Jauncey K. Evaluation of some plant ingredients as dietary protein sources for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 55-70
- Lall SP. Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. In: Cowey CB, Cho CY(Eds.), *Proc. 1st Int, Symposium on Nutritional Strategies and Management of Aquaculture Waste*. University of Guelph. Guelph, Ontario, Canada, 1991, 21-36
- Li HT, Mai KS, Ai QH, *et al*. Apparent digestibility of selected protein ingredients for yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3): 370-376 [李会涛, 麦康森, 艾庆辉, 等. 大黄鱼对几种饲料蛋白原料消化率的研究. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 370-376]
- Liang DN, Jiang XJ, Liu WB, *et al*. Nutrient apparent digestibility of seven kinds of feed ingredients for Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(6): 1592-1598 [梁丹妮, 姜雪姣, 刘文斌, 等. 建鲤对 7 种饲料原料中营养物质的表观消化率. *动物营养学报*, 2010, 22(6): 1592-1598]
- McGoogan BB, Reigh RC. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, 1996, 141(3-4): 233-244
- National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of fishes*. National Academy of Sciences, Washington, DC, 1993
- Ren MC, Ai QH, Mai KS, *et al*. Apparent digestibility of seven protein ingredients for cobia, *Rachycent canadum*. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(S1): 45-50 [任鸣春, 艾庆辉, 麦康森, 等. 军曹鱼七种饲料原料表观消化率的研究. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(S1): 45-50]
- Silva SSD, Anderson TA. *Fish nutrition in aquaculture*. London:

- Chapman and Hall, 1995, 103–142
- Sullivan JA, Reigh RC. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* ♀ × *Morone chrysops* ♂). *Aquaculture*, 1995, 138(1–4): 313–322
- Yang CZ, He G, Zhou HH, *et al.* Nutrient apparent digestibility coefficients of several protein sources in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and effects of extrusion treatment on them. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(7): 2045–2054 [杨传哲, 何良, 周慧慧, 等. 大菱鲆幼鱼对几种蛋白质源中营养物质的表观消化率及膨化处理对其产生的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(7): 2045–2054]
- Yu HR, Zhang Q, Cao H, *et al.* Apparent digestibility coefficients of tested feed ingredients for juvenile snakehead, *Ophiocephalus argus*. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(2): 139–147
- Zhong GF, Han B, Hua XM, *et al.* Apparent digestibility coefficients (ADC) of selected protein feed ingredients and the effect of dietary multi-enzyme on ADC of *Takifugu obscurus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(2): 241–246 [钟国防, 韩斌, 华雪铭, 等. 暗纹东方鲀对几种蛋白质原料表观消化率及酶制剂对其消化能力的影响. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(2): 241–246]
- Zhou QC, Tan BP, Mai KS, *et al.* Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 2004, 241(1–4): 441–451
- Zhou XH, Xiang X, Chen J. Apparent digestibility of protein and amino acid in six feed ingredients for *Bidyanus bidyanus*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2003(3): 95–98 [周兴华, 向泉, 陈建. 银鲈对六种饲料原料蛋白质和氨基酸的表观消化率. *西南农业学报*, 2003, 16(3): 95–98]

(编辑 陈 辉)

Apparent Digestibility Coefficients of Selected Feed Ingredients for Juvenile Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*)

WANG Jianxue^{1,2}, WEI Yuliang², XU Houguo², LIANG Mengqing^{2①}

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

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

Abstract Apparent digestibility coefficients (ADCs) of dry matter, crude protein, crude lipid, gross energy, phosphorus and amino acids in white fish meal, Peruvian red fish meal, meat and bone meal, corn gluten meal, soybean meal, peanut meal, cottonseed meal, and rapeseed meal were determined for juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*) with initial mean body weight of 37.90 g. A reference diet and test diets that consisted of a 70 : 30 mixture of the reference diet to test ingredient were used with 0.1% Y₂O₃ as an external indicator. White fish meal, Peruvian red fish meal and soybean meal had higher ADCs of dry matter, dry matter ADCs ranged in 43.35%~70.54% among ingredients tested. Protein ADCs of feed ingredients ranged in 50.91%~92.78%, meat and bone meal had significantly lower ADCs of protein compared with that of white fish meal, Peruvian red fish meal, soybean meal, peanut meal, rapeseed meal and distillers dried grains with solubles (DDGS) ($P<0.05$). Amino acid ADCs generally reflected protein digestibility. ADCs of lipid were relatively high in the ingredients tested. Energy ADCs of feed ingredients ranged in 30.58%~90.01%, white fish meal, Peruvian red fish meal, soybean meal and peanut meal had significantly higher ADCs of energy (76.26%~90.01%). Phosphorus ADCs of feed ingredients ranged in 9.13%~68.14%, white fish meal, Peruvian red fish meal had significantly higher ADCs of phosphorus among ingredients tested. In conclusion, ADCs of dry matter, crude protein, crude lipid, gross energy, phosphorus and amino acids in white fish meal, Peruvian red fish meal were higher, while ADCs of dry matter, crude protein, crude lipid, gross energy, phosphorus and amino acids in meat and bone meal and DDGS were lower compared with that other tested ingredient for tiger puffer. Soybean meal and peanut meal had higher ADCs of protein and essential amino acids in plant protein ingredients. Resultant digestibility data may provide useful information to commercial tiger puffer feed industry.

Key words *Takifugu rubripes*; Apparent digestibility coefficients; Feed ingredients; Nutrients

① Corresponding author: LIANG Mengqing, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200206001

http://www.yykxjz.cn/

胡雨, 刘鹰, 范继泽, 周诚, 张志强, 马真. 经验对欧洲舌齿鲈幼鱼行为及其关联性指标的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 104-111

Hu Y, Liu Y, Fan JZ, Zhou C, Zhang ZQ, Ma Z. Effect of experience on behavior and parameter correlation in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 104-111

经验对欧洲舌齿鲈幼鱼行为及其 关联性指标的影响*



胡 雨^{1,2} 刘 鹰^{1,2} 范继泽^{1,2} 周 诚^{1,2} 张志强^{1,2} 马 真^{1,2①}

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 设施渔业教育部重点实验室 大连 116023)

摘要 学习和信息传递是鱼类认知过程中的重要内容。本研究设计了特定实验装置,通过 2 个实验测定了欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)幼鱼在有/无有经验个体条件下完成任务的时间和行为表现。实验装置呈“L”型,有 3 个 PVC 材质构建的 60 cm×60 cm 的实验区域,2 个相邻区域之间用内径为 12 cm 的圆柱体通道连通(即通道 1 和通道 2)。结果显示:(1)实验 1 中无有经验鱼陪伴的个体(AF)和实验 2 中有有经验鱼陪伴的个体(SF)通过通道 2 的时间均显著低于通过通道 1 的时间($P<0.05$);(2)分别对 2 个实验中 AF 和 SF 通过通道 1 或通道 2 的时间进行比较,结果均无显著差异($P>0.05$);(3)实验 2 中成对鱼的移动距离、速度、加速度、转角和活跃度均表现出显著相关性。本研究表明,有经验个体的存在能够影响无经验个体的行为表现,但无经验个体在探索环境的过程中,自身可能会获得更复杂的信息。本研究旨在为今后深入研究鱼类认知、通讯和社会互动等行为提供参考。

关键词 欧洲舌齿鲈; 行为; 经验; 学习

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0104-08

鱼类行为研究涉及多个方面,包括游泳行为(Cai *et al.*, 2013)、摄食行为(周朝伟等, 2019; 张鹏飞等, 2020)和繁殖行为(刘丽丽等, 2010)等,而对鱼类认知的研究较少。认知(包括感知、学习、记忆和决策等)在动物行为中起着重要作用(Shettleworth, 2001)。在脊椎动物的认知研究中,鱼类是一个特别值得研究的群体(Bshary *et al.*, 2014)。经验和学习是鱼类认知过程中非常重要的部分(Hsu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2008; Manassa *et al.*, 2012; Alcazar *et al.*, 2014; Vega-Trejo

et al., 2014)。目前,关于鱼类认知的研究多集中在鱼类感觉器官的功能研究方面(Giaquinto *et al.*, 1997; Lucon-Xiccato *et al.*, 2019; Frommen, 2020)。但越来越多的研究表明,鱼类认知不仅限于自身的感觉器官,还会根据相邻个体的行为调整自身运动(Berdahl *et al.*, 2013),通过与周围有经验个体进行社会互动来提高自身行为的效率。Reebs(2000)研究表明,少数经过训练的美鳊(*Notemigonus crysoleucas*)能引导未经训练的鱼来到食物区,提高集体的觅食效率。Webster 等

* 国家重点研发计划项目(2017YFD0701700)、新疆自治区重点研发项目(2017B01004-2)和国家自然科学基金项目(31672673)共同资助 [This work was supported by the National Key Technologies R & D Program of China (2017YFD0701700), National Key Technologies R & D Program of Xinjiang Province, China (2017B01004-2), and National Natural Science Foundation of China (31672673)]. 胡 雨, E-mail: huyu6519@163.com

① 通讯作者: 马 真, E-mail: mazhen@dlo.edu.cn

收稿日期: 2020-02-06, 收修改稿日期: 2020-03-13

(2017) 研究表明, 经过训练的刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 能显著提高混合群体中未经训练的个体的觅食效率。

欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*), 又名欧鲈, 是目前地中海区域最主要的商业养殖鱼类之一, 具有较强的学习能力和行为可塑性 (Covès *et al.*, 2006; Benhaïm *et al.*, 2011)。关于鱼类经验和学习行为的研究现多集中在孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) (Goodey *et al.*, 1986; Shohet *et al.*, 2009)、虹鳟 (*Salmo gairdneri*) (Ware, 1971)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) (Reiriz *et al.*, 1998)、雀鲷 (*Acanthochromis polyacanthus*) (Ramasamy *et al.*, 2015) 等鱼类, 对欧洲舌齿鲈学习和信息传递的相关研究较少。本研究通过设定在特定环境背景条件下, 分析欧洲舌齿鲈幼鱼在有/无有经验个体条件下完成任务的时间及相关行为指标的关联性, 为今后深入研究欧洲舌齿鲈及其他鱼类的学习和信息传递行为提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象及条件

实验用欧洲舌齿鲈幼鱼取自大连海洋大学设施渔业教育部重点实验室, 共 45 尾, 平均全长为 (20.69±0.21) cm。所有实验用鱼性腺发育均未成熟, 故不考虑性行为。

实验共使用 9 个蓝色水箱, 每个水箱 5 尾幼鱼。实验正式开始前, 实验幼鱼在水箱中暂养 20 d, 水温控制在 18℃±1℃, 溶解氧 (DO) 保持在 6 mg/L 以上, 光照周期为 12 L : 12 D, 每日 08:00 和 17:00 投喂饲料颗粒, 实验期间停止投喂。

1.2 实验装置

实验装置放置于 240 cm × 240 cm × 50 cm 的玻璃缸中, 共 2 套, 水深为 10 cm。装置呈“L”型, 采用白色 PVC 板搭建, 共分为 3 个 60 cm × 60 cm 的象限, 相邻象限之间由内径为 12 cm 的透明亚克力材质圆柱体连通 (图 1)。其中, 象限 1 与通道的连接处插有 20 cm × 20 cm 的白色 PVC 隔板; 象限 2 右上角底面和侧面分别贴有 20 cm × 20 cm 的红色防水贴纸; 象限 3 左上角底面和侧面分别贴有 40 cm × 40 cm 和 40 cm × 20 cm 的红色防水贴纸。红色防水贴纸一是为了模拟陌生的背景环境; 二是从鱼的感官角度来识别各象限的差异。

为尽可能减少实验过程中对鱼的干扰, 每个 60 cm × 20 cm 的板面底侧都均匀分布 3 个 4 cm × 0.5 cm 的小

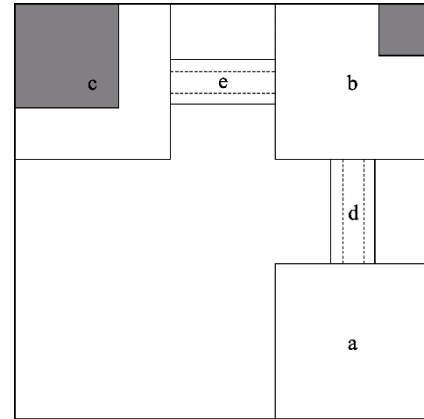


图 1 实验装置的俯视图

Fig.1 Top view of experimental setup

a: 象限 1; b: 象限 2; c: 象限 3; d: 通道 1;
e: 通道 2。灰色区域表示红色贴纸区域
a is the first quadrant, b is the second quadrant, c is the third quadrant, d is the first channel, e is the second channel. Gray areas are red sticker

孔, 方便换水和清理粪便。实验为静水环境, 以减少鱼类之间信息交流的可能性。每套实验装置的正上方各布设 1 盏 LED 灯和 1 台高清摄像机。

1.3 实验设计

实验分为 2 个部分: 实验 1 用于测试首次进入陌生环境后, 单独 1 尾幼鱼的行为表现; 实验 2 用于测试陌生环境中已有有经验鱼存在时, 幼鱼首次进入后的行为表现以及 2 尾鱼的运动状态。随机挑选 3 个水箱用于实验 1 (共 15 尾鱼), 剩余 6 个水箱用于实验 2 (共 30 尾鱼)。各水箱设定为不熟悉组, 因为熟悉度已被证明会影响个体的学习效率 (Swaney *et al.*, 2001)。

1.3.1 单独 1 尾欧洲舌齿鲈幼鱼的行为表现 将 1 尾欧洲舌齿鲈幼鱼放入象限 1, 记为 Alone Fish (AF), 适应 30 min 后轻轻地取走隔板, 记为实验开始; 欧洲舌齿鲈幼鱼首次进入象限 3 10 min 后, 记为实验结束。将鱼捞出放入新的暂养水箱中, 对整个装置进行清理和换水, 重复以上过程, 共 13 组。

利用全事件观测法, 记录每尾鱼实验开始至整个鱼体完全通过通道 1 的时间间隔 (T_1) 和鱼体第 1 次完全通过通道 1 至完全通过通道 2 的时间间隔 (T_2)。

1.3.2 有经验鱼存在时欧洲舌齿鲈幼鱼的行为表现

从 2 个水箱中随机各捞出 1 尾鱼, 作为 1 组实验对象, 每组随机挑选 1 尾欧洲舌齿鲈幼鱼记为 First Fish (FF, 有经验鱼), 第 2 尾记为 Second Fish (SF, 无经验鱼)。用于实验 2 的幼鱼在实验前 24 h 麻醉, 并

快速在背鳍前端固定直径为 8 mm 的不同颜色轻型圆形卡片, 并通过卡片颜色实现个体识别。

首先, 将 FF 放进插有隔板的象限 1, 适应 30 min 后轻轻地取走隔板, FF 在实验装置中活动 24 h, 使鱼适应并熟悉整个实验环境; 其次, 当 FF 在象限 3 时, 重新插回隔板, 并立即放入 SF, 为了减少 FF 对 SF 存在的感知, 放入过程用黑色塑料遮住 SF; 然后, 当 SF 在象限 1 适应 30 min 后, 轻轻拿走隔板, 记为实验开始, 2 h 后记为实验结束(当 FF 进入象限 1 发现 SF, 且此时 SF 仍然在象限 1 时, 则为有效实验; 反之, 实验无效); 最后, 捞出 FF 和 SF 放入新的暂养水箱中, 对整个装置进行清理和换水, 重复以上过程, 共 15 组。

利用全事件观测法, 记录 FF 和 SF 第 1 次相遇至 SF 整个鱼体完全通过通道 1 的时间间隔(t_1)和 SF 第 1 次完全通过通道 1 至完全通过通道 2 的时间间隔(t_2)。利用行为学软件分析 FF 和 SF 在第 1 次相遇 10 min 内的行为参数。

1.4 行为参数获取及分析

使用 Noldus EthoVision XT (版本 12.0; Noldus 信息技术, 荷兰)对欧洲舌齿鲈幼鱼的行为进行分析。采用 25 帧/s (即每秒采集 25 个样本)的频率追踪实验鱼的实时坐标 X 和 Y , 计算相关行为学参数, 各参数的计算方法如下:

移动距离(cm)、速度(cm/s)和加速度(最小值和最大值) (cm/s^2)计算公式:

$$DM_n = \sum_{n=1}^{15000} \sqrt{(X_n - X_{n-1})^2 + (Y_n - Y_{n-1})^2}$$

$$V_n = \frac{\sqrt{(X_n - X_{n-1})^2 + (Y_n - Y_{n-1})^2}}{t_n - t_{n-1}}$$

$$A_n = \frac{V_n - V_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

式中, DM_n 为移动距离, V_n 为速度, A_n 为加速度。 X_{n-1} 、 Y_{n-1} 为样本 $n-1$ 的中心基点的 X 、 Y 坐标, X_n 、 Y_n 为样本 n 的中心基点的 X 、 Y 坐标, $t_n - t_{n-1}$ 为当前样本与上一样本时间差。

转角(度)计算公式:

$$RTA_n = \text{Heading}_n - \text{Heading}_{n-1}$$

式中, RTA_n 为转角。 $\text{Heading}_n - \text{Heading}_{n-1}$ 为当前样本与上一样本中心基点方向线之间的差值。

活跃度计算方法: 拾取对象的每个像素, 并在当前图像与上一图像之间逐一对比各像素。活跃度(频次)计算公式:

$$CA_n = (A_n - A_{n-1}) + (A_{n-1} - A_n)$$

$$\text{Activity} = \frac{CA_n}{A_{n-1} + A_n} \times 100$$

式中, CA_n 为当前样本 n 的已变化面积(图 2), Activity 为活跃度。 A_n 为当前样本 n 的面积, A_{n-1} 为上一样本 $n-1$ 的面积。面积指像素数。

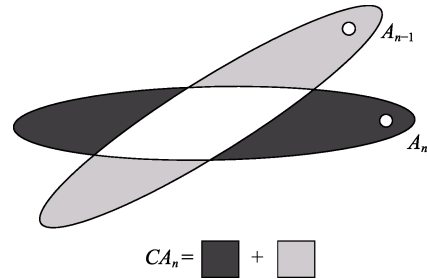


图 2 CA_n 已变化面积的示意图

Fig.2 Schematic diagram of changed area in CA_n

活跃度具有 3 种可能状态: 狂暴、活跃和静止, 并根据活跃度与 2 个自定义阈值之间的关系, 确定每个样本的活跃状态。本研究设定活跃度阈值为 60% 和 20%。当身体面积的变化百分比高于 60% 时, 为狂暴状态; 当身体面积的变化百分比低于 20% 时, 为静止状态; 当身体面积的变化百分比介于二者之间时, 为活跃状态。

对象间的距离(cm)计算公式:

$$DS_n = \sqrt{(X_{a,n} - X_{r,n})^2 + (Y_{a,n} - Y_{r,n})^2}$$

式中, DS_n 为样本 n 处观察对象和参考对象之间的距离。 $X_{a,n}$ 、 $Y_{a,n}$ 为样本 n 处观察对象中心点的 X 和 Y 坐标, $X_{r,n}$ 、 $Y_{r,n}$ 为样本 n 处参考对象中心点的 X 和 Y 坐标。

1.5 统计分析

实验数据用 SPSS 24.0 软件进行独立样本 t 检验。采用重复测量多变量方差分析(MANOVA), 以 FF 和 SF 为独立变量, 检验 2 尾鱼在不同行为指标上的差异。对实验 2 中 2 尾幼鱼的行为参数进行 Pearson 相关性检验。处理结果均以 $P < 0.05$ 为显著性水平。

2 结果

在整个实验过程中, 实验 2 有 2 组无效数据被剔除。AF 通过通道 1 的时间($T1$)显著高于通过通道 2 的时间($T2$) ($P < 0.05$), $T1$ 约为 $T2$ 的 4 倍(图 3a)。由图 3b 可知, SF 通过通道 1 的时间($t1$)也显著高于通过通道 2 的时间($t2$) ($P < 0.05$), $t1$ 约为 $t2$ 的 8 倍。分

别对 AF 和 SF 通过通道 1 或通过通道 2 的时间进行比较, 结果无显著差异($P>0.05$), 但 AF 通过通道 2 的时间(T_2)近乎是 SF 通过通道 2 的时间(t_2)的 2 倍(图 4)。

图 5 表示实验 2 中 2 尾鱼首次相遇 10 min 内成对鱼间的平均距离。结果显示, 若以鱼的平均全长为基线, 13 组实验中共有 9 组成对鱼的距离小于 1 倍平均全长(图 5)。除此之外, 13 组成对鱼之间的平均

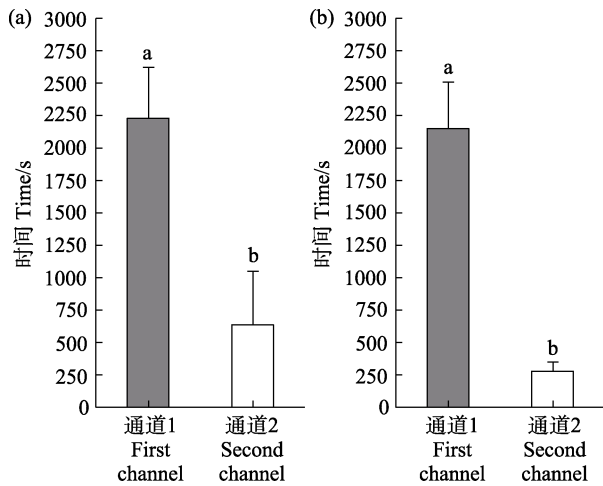


图 3 实验鱼通过通道 1 和通道 2 的时间
Fig.3 Time for the tested fish to pass through the first and second channel

(a): 单独的鱼; (b): 无经验鱼
字母不同表示差异显著($P<0.05$)

(a): AF; (b): SF

Different letters mean significant differences ($P<0.05$)

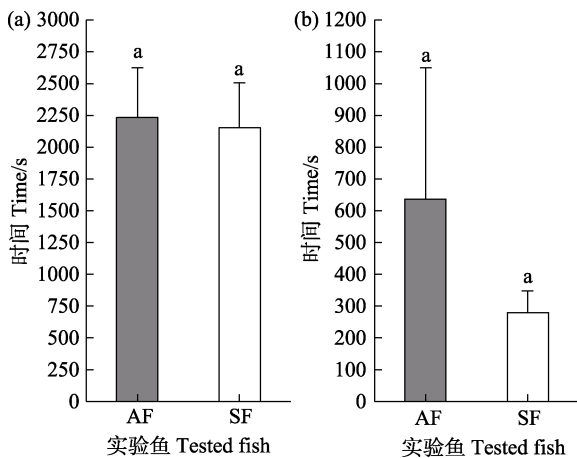


图 4 AF 和 SF 通过通道的时间

Fig.4 Time for AF and SF to pass through the channels

(a): 通过通道 1; (b): 通过通道 2;
AF: 单独的鱼; SF: 无经验鱼。

相同字母表示差异不显著($P>0.05$)

(a): Pass through the first channel; (b): Pass through the second channel; AF: Alone fish; SF: Second fish.
Same letters mean no significant difference ($P>0.05$)

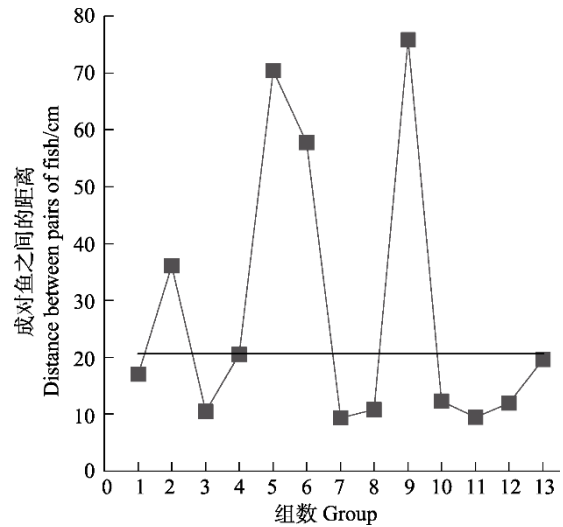


图 5 首次相遇 10 min 内每对实验鱼之间的平均距离基于鱼的平均全长的分布情况

Fig.5 Distribution of the average distance between pairs of fish based on the mean total length of fish within 10 min after the first met

直线为鱼平均全长; 正方形为每对实验鱼之间的平均距离
Straight line is the average total length of fish; square is the average distance between each pair of experimental fish

距离与鱼平均全长之间无显著差异($P>0.05$)。

对实验 2 中 2 尾鱼的行为参数进行重复测量多变量方差分析(MANOVA)可知, 首次相遇 10 min 内 2 尾鱼之间的移动距离、速度、加速度、转角和活跃度均无显著差异($P>0.05$)。此外, 对实验 2 的成对鱼首次相遇 10 min 内的行为参数进行 Pearson 相关性分析, 结果如表 1 所示, 除成对鱼的加速度(最小值)为显著相关($P<$

表 1 首次相遇 10 min 内成对鱼之间行为学参数相关性分析
Tab.1 Correlation analysis of behavioral parameters between pairs of fish within 10 min after the first met

行为学参数 Behavioral parameters	相关性 Correlation	显著性 Significance
移动距离 Distance moved (cm)	0.798**	0.001
速度 Velocity (cm/s)	0.810**	0.001
加速度 Acceleration (cm/s ²)		
最小值 Minimum	0.634*	0.020
最大值 Maximum	0.865**	0.000
转角/度 Turn angle	0.833**	0.000
活跃度(频次) Activity (frequency)		
狂躁 Highly active	0.882**	0.000
活跃 Active	0.784**	0.002
静止 Inactive	0.823**	0.001

注: *表示在 0.05 级别(双尾), **表示在 0.01 级别(双尾), 相关性显著

Note: * at level 0.05 (double-tailed), ** at level 0.01 (double-tailed), the correlations are significant

0.05)外,其他行为学参数,如移动距离、速度、加速度(最大值)、转角和活跃度均为极显著相关($P<0.01$)。

对实验 2 的成对鱼首次相遇 10 min 内的状态进行跟踪,结果如图 6 所示。整体来讲,成对鱼的运动

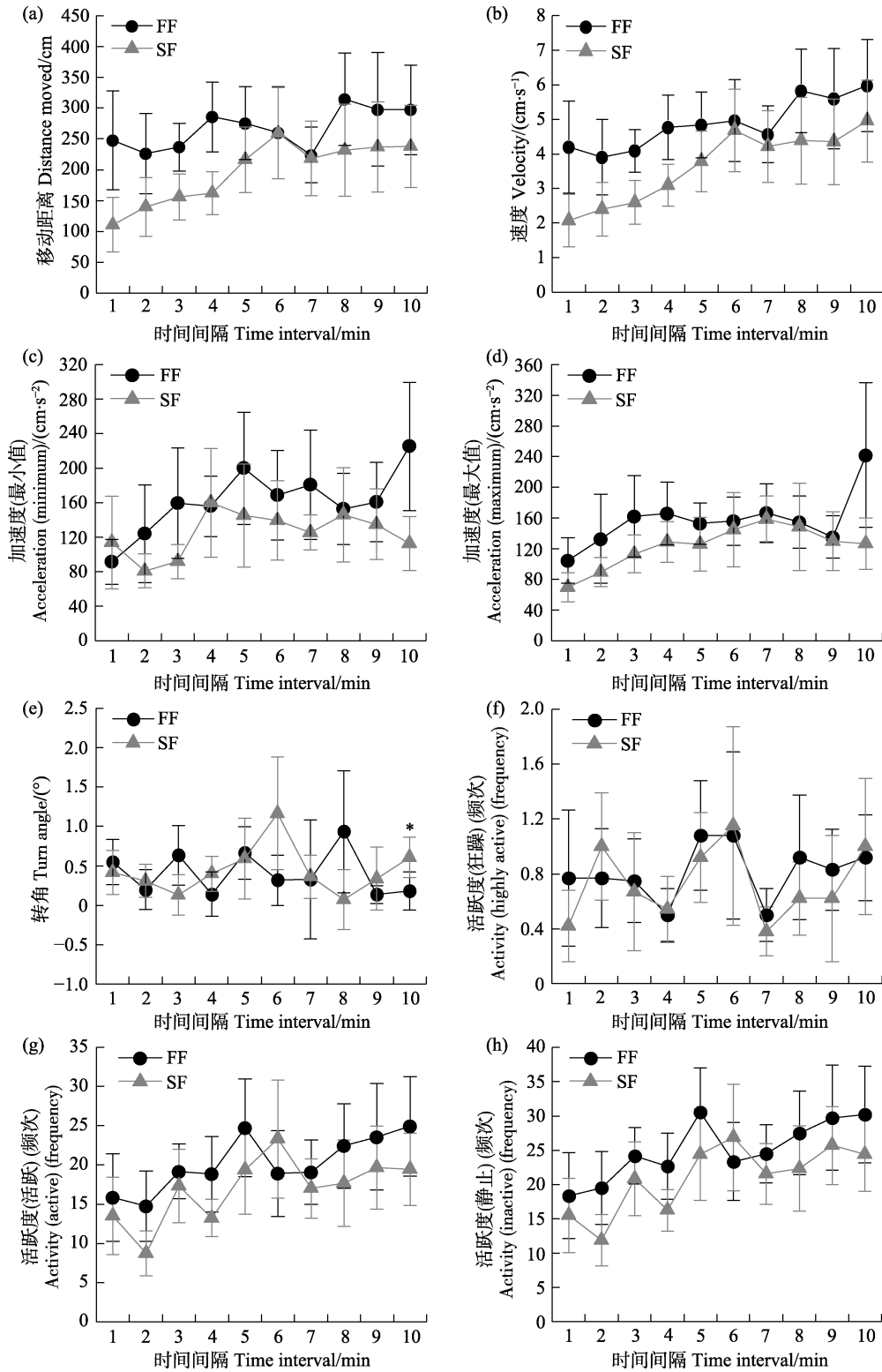


图 6 首次相遇 10 min 内成对鱼运动状态随时间间隔的变化
Fig.6 The changes of fish motion state within 10 min after the first met

加速度最小值取绝对值, *表示差异显著($P<0.05$)
Acceleration minimum values takes absolute value; * represents significant difference ($P<0.05$)

变化具有相似的趋势(图 6)。在 FF 和 SF 相遇 6 min 时, 成对鱼的移动距离、速度和加速度(最大值)逐渐趋近相同值(图 6a、图 6b 和图 6d)。成对鱼的加速度(最小值)和转角变化趋势无明显规律(图 6c 和图 6e), 除最后 1 min 内成对鱼的转角存在显著差异外($P < 0.05$) (图 6e), 其余成对鱼的转角结果均无显著差异。当有 FF 存在时, SF 活跃度的变化趋势与 FF 相似(图 6f、图 6g 和图 6h), 特别是狂躁状态的结果, 相遇 3~7 min 变化趋势基本一致(图 6f)。

3 讨论

鱼类和其他脊椎动物一样, 具有复杂的认知行为, 其中学习在这一过程中起着非常重要的作用(Brown *et al.*, 2003; Laland *et al.*, 2003)。鱼类通过学习获得经验, 以适应周围的环境变化(Kieffer *et al.*, 1992), 改善自身的摄食性能(Warburton, 2003)以及提高性选择机率(Rystrom *et al.*, 2019)等。在本研究中, 无论是否存在有经验的鱼, AF 和 SF 通过通道的时间 $T1(t1)$ 都显著高于 $T2(t2)$, 表明在特定环境背景下, AF 和 SF 的学习能力表现出相似性, 即经验的积累会显著提高完成任务的效率, 对环境的适应性也会随时间的推移逐渐增强。在整个实验过程中, AF 和 SF 通过通道 1 的时间较长, 观察到 AF 和 SF 在通过通道 2 之前, 在象限 1 和通道 1 之间多次徘徊, 原因可能是鱼暴露在新环境中时, 需要承担一定的风险(Huntingford *et al.*, 2010), 个体通过反复探索来了解周围环境(Braithwaite, 2006)。

已有研究结果显示, 有经验的个体可以“领导”无经验的个体(Reebs, 2000), 无经验个体发生跟随行为的原因可能是向有经验的个体学习, 也可能是依赖其寻找食物或躲避敌害(Bshary *et al.*, 2014)。在本研究中, 分别对 2 个实验中 AF 和 SF 通过通道 1 或通道 2 的时间进行比较, 结果均无显著差异(图 4), 但 SF 通过通道的时间 $t2$ 约为 AF 通过通道时间 $T2$ 的 1/2, 表明有经验个体的存在能够在一定程度上提高欧洲舌齿鲈幼鱼的学习能力, 即经验丰富个体的存在能够提高无经验个体完成任务的效率(Webster *et al.*, 2017)。除此之外, 鱼类的个性、对环境的感知能力或自身学习能力等因素对鱼类行为表现有很大的影响(Sneddon, 2003; Millot *et al.*, 2014)。大胆的个体愿意为了获得食物或配偶承担一定的风险, 而害羞的个体则选择避免风险(Chapman *et al.*, 2010)。Mamuneas 等(2015)研究也表明, 与害羞的刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)相比, 大胆的刺鱼探索新环境和获取信息

的速度更快。这也可能是实验 1 中各重复组 AF 完成任务时间差异较大的原因(通过通道 2 的时间最快只需十几秒, 而最慢的则超过 1 h)。

图 5、图 6 和表 1 分析结果显示, 成对鱼首次相遇 10 min 内的平均距离较近, 同时, 其游泳行为具有较强的同步性(例如, 相似的变化趋势等), 推测成对鱼之间可能存在信息传递, 进而影响 SF 的学习效率。对于领地行为较强的鱼类来说, 当 2 尾鱼相遇时, 领地行为的胁迫也会导致 2 尾鱼的行为表现发生变化, 例如, 胁迫鱼的驱赶和被胁迫鱼的逃避等。但 Pérez-Ruzafa 等(2014)在对欧洲舌齿鲈行为生态学进行研究时发现, 欧洲舌齿鲈不具有领地意识。因此, 推测 SF 通过通道时间变短的原因, 对于领地行为的胁迫来说, 更多可能是由于学习行为导致。另外, 已有研究表明, 鱼类可通过视觉线索来获得重要信息(Strandburg-Peshkin *et al.*, 2013; Lemasson *et al.*, 2018), 从而影响自身的行为决策。全事件观测法的结果显示, 在多组实验中, FF 首次与 SF 相遇后会多次往返于象限 1 和象限 3 之间。这一行为可能通过 SF 视觉感官对其调整自身行为起到刺激和示范作用(Rosenthal *et al.*, 2015)。对成对鱼的行为表现进行观察时还发现, 成对鱼在首次相遇时, FF 会保持“警惕状态”, 随后缓慢地靠近 SF 的泄殖孔部位或尾部, 根据相关研究表明, 鱼类可通过视觉信号、听觉信号、嗅觉信号或化学信号, 如尿液(Keller-Costa *et al.*, 2016)、胆盐(Buchinger *et al.*, 2014)等进行信息传递, 但这一过程的发生途径尚不清楚, 还需继续开展相关实验加以验证。

本研究表明, 有经验的个体能影响无经验个体的行为表现, 但无经验个体在探索环境的过程中, 自身可能会获得更复杂的信息。若要确切阐明成对鱼之间信息传递的方式及其机制, 还需开展进一步研究, 更系统地提供鱼类认知方面的理论基础, 这些探索性工作将为进一步揭示鱼类的认知提供参考。

参 考 文 献

- Alcazar RM, Hilliard AT, Becker L, *et al.* Brains over brawn: Experience overcomes a size disadvantage in fish social hierarchies. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(9): 1462–1468
- Benhaim D, Péan S, Brisset B, *et al.* Effect of size grading on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile self-feeding behaviour, social structure and culture performance. *Aquatic Living Resources*, 2011, 24(4): 391–402
- Berdahl A, Torney CJ, Ioannou CC, *et al.* Emergent sensing of

- complex environments by mobile animal groups. *Science*, 2013, 339(6119): 574–576
- Braithwaite VA. Cognitive ability in fish. *Fish Physiology*, 2006, 24(5): 1–37
- Brown C, Laland KN. Social learning in fishes: A review. *Fish and Fisheries*, 2003, 4(3): 280–288
- Bshary R, Brown C. Fish cognition. *Current Biology*, 2014, 24(19): R947–R950
- Buchinger TJ, Li W, Johnson NS. Bile salts as semiochemicals in fish. *Chemical Senses*, 2014, 39(8): 647–654
- Cai L, Taupier R, Johnson D, *et al.* Swimming capability and swimming behavior of juvenile *Acipenser schrenckii*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2013, 319(3): 149–155
- Chapman BB, Morrell LJ, Krause J. Unpredictability in food supply during early life influences boldness in fish. *Behavioral Ecology*, 2010, 21(3): 501–506
- Covès D, Beauchaud M, Attia J, *et al.* Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: An example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 2006, 253(1–4): 385–392
- Frommen JG. Aggressive communication in aquatic environments. *Functional Ecology*, 2020, 34(2): 364–380
- Giaquinto PC, Volpato GL. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology and Behavior*, 1997, 62(6): 1333–1338
- Goodey W, Liley NR. The influence of early experience on escape behaviour in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology*, 1986, 64(4): 885–888
- Hsu Y, Earley RL, Wolf LL. Modulating aggression through experience. In: Brown C, Laland K, Krause J. *Fish cognition and behaviour*. John Wiley and Sons, 2006, 96–113
- Huntingford FA, Andrew G, Mackenzie S, *et al.* Coping strategies in a strongly schooling fish, the common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(7): 1576–1591
- Keller-Costa T, Saraiva JL, Hubbard PC, *et al.* A multi-component pheromone in the urine of dominant male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reduces aggression in rivals. *Journal of Chemical Ecology*, 2016, 42(2): 173–182
- Kieffer JD, Colgan PW. The role of learning in fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1992, 2(2): 125–143
- Kozak GM, Boughman JW. Experience influences shoal member preference in a species pair of sticklebacks. *Behavioral Ecology*, 2008, 19(3): 667–676
- Laland KN, Brown C, Krause J. Learning in fishes: From three-second memory to culture. *Fish and Fisheries*, 2003, 4(3): 199–202
- Lemasson B, Tanner C, Woodley C, *et al.* Motion cues tune social influence in shoaling fish. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9785
- Liu LL, Zheng XX, You YL, *et al.* Experiment on the artificial propagation of *Acrossocheilus hemispinus*. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(2): 57–61 [刘丽丽, 郑欣欣, 尤永隆, 等. 半刺厚唇鱼的人工繁殖试验. *淡水渔业*, 2010, 40(2): 57–61]
- Lucon-Xiccato T, Santacà M, Petrazzini MEM, *et al.* Guppies, *Poecilia reticulata*, perceive a reversed Delboeuf illusion. *Animal Cognition*, 2019, 22(3): 291–303
- Mamuneas D, Spence AJ, Manica A, *et al.* Bolder stickleback fish make faster decisions, but they are not less accurate. *Behavioral Ecology*, 2015, 26(1): 91–96
- Manassa RP, McCormick MI. Social learning and acquired recognition of a predator by a marine fish. *Animal Cognition*, 2012, 15(4): 559–565
- Millot S, Cerqueira M, Castanheira MF, *et al.* Behavioural stress responses predict environmental perception in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *PLoS One*, 2014, 9(9): e108800
- Pérez-Ruzafa A, Marcos C. Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). *Biology of European Sea Bass*, 2014, 3–33
- Ramasamy RA, Allan BJM, McCormick MI. Plasticity of escape responses: Prior predator experience enhances escape performance in a coral reef fish. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0132790
- Reebs SG. Can a minority of informed leaders determine the foraging movements of a fish shoal? *Animal Behaviour*, 2000, 59(2): 403–409
- Reiriz L, Nicieza AG, Braña F. Prey selection by experienced and naive juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 1998, 53(1): 100–114
- Rosenthal SB, Twomey CR, Hartnett AT, *et al.* Revealing the hidden networks of interaction in mobile animal groups allows prediction of complex behavioral contagion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(15): 4690–4695
- Rystrom TL, Bakker TCM, Rick IP. Mate assessment behavior is correlated to learning ability in female threespine sticklebacks. *Current Zoology*, 2019, 65(3): 295–304
- Shettleworth SJ. Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour*, 2001, 61(2): 277–286
- Shohet AJ, Watt PJ. Female guppies *Poecilia reticulata* prefer males that can learn fast. *Journal of Fish Biology*, 2009, 75(6): 1323–1330
- Sneddon LU. The bold and the shy: Individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 2003, 62(4): 971–975
- Strandburg-Peshkin A, Twomey CR, Bode NWF, *et al.* Visual sensory networks and effective information transfer in animal groups. *Current Biology*, 2013, 23(17): R709–R711
- Swaney W, Kendal J, Capon H, *et al.* Familiarity facilitates social learning of foraging behaviour in the guppy. *Animal Behaviour*, 2001, 62(3): 591–598
- Vega-Trejo R, O’Dea RE, Jennions MD, *et al.* The effects of familiarity and mating experience on mate choice in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Behavioral Ecology*,

- 2014, 25(5): 1205–1211
- Warburton K. Learning of foraging skills by fish. *Fish and Fisheries*, 2003, 4(3): 203–215
- Ware DM. Predation by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): The effect of experience. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1971, 28(12): 1847–1852
- Webster MM, Whalen A, Laland KN. Fish pool their experience to solve problems collectively. *Nature Ecology and Evolution*, 2017, 1(5): 0135
- Zhang PF, Chang Q, Chen SQ, *et al.* Diet feeding rhythm and analysis of gastric evacuation associated mathematical models in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 104–111 [张鹏飞, 常青, 陈四清, 等. 绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 104–111]
- Zhou CW, Lei L, Deng XX, *et al.* Cloning, tissue expression profiling, functional characterization of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 69–79 [周朝伟, 雷骆, 邓星星, 等. 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 69–79]

(编辑 马瑾艳)

Effect of Experience on Behavior and Parameter Correlation in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax*)

HU Yu^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, FAN Jize^{1,2}, ZHOU Cheng^{1,2}, ZHANG Zhiqiang^{1,2}, MA Zhen^{1,2}^①

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023;

2. Key Laboratory of Environment Controlled Aquaculture, Ministry of Education, Dalian 116023)

Abstract Learning and information transfer are two important parts of fish cognitive processes. This study aimed to compare the time and behavioral parameters of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) with or without experienced individuals under a specific environmental condition. The experimental device was “L”-shaped and consisted of three 60 cm×60 cm test compartments made of PVC material. The two adjacent compartments were connected by a cylinder channel with an inner diameter of 12 cm (i.e., first channel and second channel). The experiment comprised two trials: The first tested the time and behavior of an alone fish (AF) to complete the task, and the second tested the time and behavior of inexperienced fish (SF) in the presence of experienced fish to complete the task and the correlation of behavioral parameters between pairs of fish. The results showed that the time for the AF and SF to pass through the second channel was significantly lower than that through the first channel ($P<0.05$), regardless of the presence of experienced fish. Over the entire experiment, no significant difference was observed between the times taken for AF and SF to pass through the second channel ($P>0.05$), but less time was taken in the second trial. The pairs of fish showed similar motion trends within 10 min after they first met and kept the relative movement distance within one total length. There were significant correlations between the pairs of fish in terms of the distance moved, velocity, acceleration, turn angle, and activity. These results suggested that inexperienced fishes’ behavior might be influenced by an experienced individual, and that inexperienced fish might obtain more complex information in the process of exploring their environment.

Key words *Dicentrarchus labrax*; Behavior; Experience; Learning

① Corresponding author: MA Zhen, E-mail: mazhen@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190924001

http://www.yykxjz.cn/

曹梅, 王兴强, 秦传新, 沈晔, 张子杨, 钱诗悦. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 112-123
Cao M, Wang XQ, Qin CX, Shen Y, Zhang ZY, Qian SY. Transcriptome analysis of *Palaemon carincauda* subject to hypoxic stress. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 112-123

脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析*



曹梅¹ 王兴强^{1①} 秦传新² 沈晔¹ 张子杨¹ 钱诗悦¹

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300)

摘要 本研究通过高通量测序, 分析低氧胁迫下脊尾白虾(*Palaemon carincauda*)某些基因的差异表达, 获得 10.62 Gb 高质量测序数据, 组装得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene。注释 Unigene 37580 条。其中, 33659 条 Unigene 与 Nr 蛋白数据库基因同源; 11275 条 Unigene 注释到 KEGG 数据库, 归类到 223 个代谢通路。低氧胁迫产生 1392 条差异表达基因, 包括 311 条上调基因和 1081 条下调基因, 784 条差异基因得到注释, 并富集到抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程, 表明低氧胁迫激活了虾体适应缺氧的一系列生理活动。其中, 低氧胁迫下, 低氧诱导因子 1(HIF1) 2 个亚基 *HIF1α* 和 *HIF1β* 表达量上调; 实时定量测定证实, 在胁迫的后期, 脊尾白虾肝胰脏和鳃 *HIF1α* 和 *HIF1β* 明显上调, 推测脊尾白虾细胞在低溶氧环境下诱导 *HIF* 产生, 刺激机体增加血液氧的供应能力。同时, 低氧胁迫下, 脊尾白虾差异基因富集到糖酵解/葡萄糖生成、精氨酸和脯氨酸代谢和丙酮酸代谢等通路, 表明虾体缺氧使糖酵解等无氧代谢途径增强, 同时促进了部分糖类和氨基酸的代谢。另外, 低氧胁迫下, 脊尾白虾溶酶体通路、吞噬通路、过氧化物酶体通路和内含作用通路的差异基因较多, 推测低氧诱导因子可能通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

关键词 脊尾白虾; 低氧胁迫; 转录组分析; 差异基因表达

中图分类号 S917.4; S968.22 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)02-0112-12

溶解氧是对虾养殖环境中重要的环境因子, 直接影响对虾的存活、生长、代谢、消化和免疫能力。养殖环境中溶解氧受诸多因素的影响, 环境中浮游植物优势种群的突然改变或死亡、阴天暴雨及过量投饵造成的池塘水质污染等都会导致溶解氧急剧下降(郑慧等, 2014; 李根瑞等, 2016)。此时, 凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等抗氧化活性和免疫力发生显著变化(Han *et al*, 2018)。低氧胁迫时, 日本沼虾有氧代谢减弱, 无氧酵解和抗氧化能力增强, 糖原和磷酸精氨酸大量消耗, 以维持机体能量需

* 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金(HS16005)、广东省渔业生态环境重点实验室开放基金(FEEL-2019-3)、江苏省大学生实践创新项目(SZ201811641105001; SY201811641105001)和连云港市“海燕计划”科研项目共同资助 [This work was supported by Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology Open Fund (HS16005), Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment (FEEL-2019-3), Practical Innovation Project for College Students in Jiangsu (SZ201811641105001; SY201811641105001), and Lianyungang “Petrel Project” Scientific Research Project]. 曹梅, E-mail: 593627216@qq.com

① 通讯作者: 王兴强, 教授, E-mail: wangxingqiang@jou.edu.cn

收稿日期: 2019-09-24, 收修改稿日期: 2020-02-14

要(Sun *et al.*, 2018)。其中, 低氧诱导因子 1 (*HIF1*)是虾体维持氧稳态的关键异二聚体转录因子, 由受氧调节的 α 亚基和组成型表达的 β 亚基组成, 最先由 Semenza(1992)在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现, 参与许多重要的生物学反应。例如, *HIF1 α* 和 *HIF1 β* 亚基均参与虾类缺氧适应性反应(Terova *et al.*, 2010; 连春盎, 2016)。缺氧时, 凡纳滨对虾鳃 *HIF1 α* 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和肝胰脏磷酸果糖激酶、果糖-1,6-二磷酸酶表达量显著增高, 而 *HIF1 α* 或 *HIF1 α* 亚基的沉默阻断了鳃中己糖激酶表达和酶活性诱导(Camacho-Jiménez *et al.*, 2018)。通常情况下, *HIF1* 的稳定性和活性由 *HIF1 α* 决定, *HIF1 α* 的调节受多种因素影响, 且 *HIF1 α* 为专一受 O_2 调控的亚基。*HIF1 α* 的 N 末端用来介导 α 和 β 两亚基二聚化及与靶基因特异 DNA 序列结合, *HIF1 α* 的 C 末端用来介导降解和反式激活, 含有 2 个独立的反式激活结构域, 2 个结构域序列间为负调控反式激活结构域, 而中部是氧依赖降解结构域(Oxygen dependent degradation domain, ODDD), ODDD 决定 *HIF1 α* 的稳定性。在常氧条件下, 位于 *HIF1 α* ODDD 内的脯氨酸残基的羟基化可促进 *HIF1 α* 的泛素化和蛋白酶的降解, 这种羟基化作用由多聚羟化酶介导。其中, 脯氨酸羟化酶(PHDs)被认为在细胞质中广泛表达, 且在羟基化中作用最大。另一种羟基化酶是 *HIF1* 抑制剂, 主要进行天门冬氨酸残基的羟基化, 进而抑制 *HIF1 α* 的激活(李国青等, 2005)。转录组学可用于分析不同组织或生理状态下某些基因表达水平的差异, 发掘与特定生理功能相关的未知基因。本研究通过高通量测序, 分析低氧胁迫下脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*)某些基因的差异表达, 可为进一步揭示虾体响应低氧胁迫的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计

1.1.1 低氧胁迫实验 实验前, 脊尾白虾暂养 1 周, 以适应实验室环境。暂养期间, 海水温度为 $22^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、盐度为 29、pH 为 8.1, 人工增氧。随机挑选湿重为 (3.15 ± 0.26) g 的脊尾白虾 60 只, 分为 2 组, 每组 3 个重复, 每个水族箱(水体约 50 L)放养 10 只脊尾白虾, 人工增氧适应 24 h, 哈希(HACH) DR900 测定实验水体溶解氧浓度为 7.6 mg/L。实验开始时, 停止低氧胁迫组的人工增氧, 水族箱用 2 mm 厚液体石蜡封闭。胁迫约 3.5 h 后, 脊尾白虾虾体从尾部开始变白; 约 4 h 后, 开始侧卧游动, 猜测其处于昏厥

状态, 此时, 水体溶解氧浓度为 (1.13 ± 0.26) mg/L, 脊尾白虾整体取样, 速冻于液氮中备用。预实验表明, 低氧胁迫条件下, 白虾侧卧后约 10~20 min 死亡。为确保取到新鲜的样品, 白虾侧卧游动时马上取样。对照组保持人工增氧, 白虾游动正常, 溶解氧浓度为 (7.59 ± 0.66) mg/L, 同样取样冻存。

1.1.2 基因表达验证实验 实验前, 脊尾白虾暂养 1 周, 暂养条件同 1.1.1。随机挑选湿重为 (2.77 ± 0.34) g 的脊尾白虾 120 只, 分为 2 组, 每组设 3 个重复, 每个水族箱(水体约为 100 L)放养 20 只白虾, 人工增氧适应 24 h, 哈希(HACH) DR900 测得水体溶解氧浓度为 7.6 mg/L。实验开始时, 低氧胁迫组停止人工增氧, 水族箱用 2 mm 厚液体石蜡封闭, 在 0、10、20、40、120、240 和 480 min, 从每个箱中取 2 只虾, 解剖取出肌肉、鳃和肝胰脏, 液氮速冻, 取样时间点水体溶解氧浓度分别为 (8.05 ± 0.40) 、 (7.21 ± 0.23) 、 (6.71 ± 0.18) 、 (6.10 ± 0.22) 、 (5.81 ± 0.25) 、 (4.08 ± 0.47) 和 (2.03 ± 0.15) mg/L; 对照组保持人工增氧, 白虾游动正常, 溶解氧浓度为 (8.11 ± 0.42) mg/L, 同样取样冻存。

1.2 转录组测序

将 1.1.1 中冻存的低氧胁迫组和对照组样品分别在液氮中全虾研磨混合, 常规方法提取总 RNA。采用带有 Oligo (dT)的磁珠富集真核生物 mRNA, 加入破碎液, 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板, 反转合成双链 cDNA 链。利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA, 对纯化的双链 cDNA 进行末端修复、加尾并连接测序接头, 然后, 采用 AMPure XP beads 进行片段大小选择。最后, 通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。送北京百迈客生物科技有限公司进行 HiSeq2500 高通量测序, 测序读长为 PE125。

1.3 生物信息学分析

对原始数据进行过滤, 去除其中的接头及低质量 Reads, 获得高质量的测序数据。将高质量测序数据通过 Trinity 软件进行序列组装, 获得该物种的 Unigene 库。将低氧胁迫组和对照组高质量的测序数据与组装得到的 Unigene 库进行序列比对和基因表达量分析, 筛选差异表达的基因。使用 BLAST 软件将 Unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG 和 KEGG 数据库比对, 获得 Unigene 及差异表达基因的功能注释信息。使用 TransDecoder 软件进行 Unigene 基因结构预测。

1.4 实时定量测定

常规方法提取 1.1.2 中的样品 RNA, 反转录成

cDNA。同时,设计引物进行实时定量 PCR,引物序列见表1;利用软件 SPSS 11 进行统计分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

表1 脊尾白虾实时定量所用引物序列
Tab.1 Sequences of *P. carinicauda* qRT-PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
HIF1 α -F	GCTAAAGGTGGGGCAAGTGG
HIF1 α -R	TGACGCCTACCTCGTTGGAT
HIF1 β -F	GTCTCGCTCGCCTTCTACAC
HIF1 β -R	TGCTCCTTCTGTTCCCAAGC
HIF1 α i-F	GCCCTGAACACTATGAGCG
HIF1 α i-R	AGCTGATCAAGCCCAGGGAA
PHDs-F	GGGGATGGCCGATGTATCAC
PHDs-R	AGGGTCCGTCTATCCGACC

表2 高质量测序数据评估统计
Tab.2 Statistics for evaluation of clean sequencing data

处理 Treatment	双向测序读数 Pair-ends reads	碱基数量 Base number	GC 含量 GC content(%)	Q30(%)
对照 Control	20926999	5270136419	44.29	90.21
低氧胁迫 Hypoxic stress	21257665	5352900655	44.42	90.35

注: Q30: 质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比

Note: Q30: Percentage of bases quality score which is greater than or equal to 30

表3 组装结果统计
Tab.3 Statistics of assembly results

项目 Items	转录本 Transcript	Unigene
200~300 nt	57076(36.80%)	50868(42.76%)
300~500 nt	39602(25.53%)	33316(28.01%)
500~1000 nt	26081(16.81%)	19088(16.05%)
1000~2000 nt	15506(10.00%)	9112(7.66%)
≥ 2000 nt	16848(10.86%)	6569(5.52%)
总数 Total number	155113	118953
总长度 Total length	135682981	73521294
N50 长度 N50 length	1940	928
平均长度 Mean length	874.74	618.07

2.2 Unigene 功能注释

对脊尾白虾 Unigene 进行功能注释,选择 BLAST 参数 $E \leq 10^{-5}$ 和 HMMER 参数 $E \leq 10^{-10}$, 获得 37580 条有注释信息的 Unigene (表3)。其中, COG 得到注释的 Unigene 12527 条, GO 13878 条, KEGG 11275 条。

与 Nr 蛋白数据库进行同源性比对,有 33659 条白虾 Unigene 与已知基因同源,在 Nr 蛋白数据库中,与虾类相关的注释信息较少(图 1)。相似序列比例最

2 结果

2.1 转录组测序数据组装

完成对照和低氧胁迫组脊尾白虾样品的转录组测序,获得 10.62 Gb 高质量测序数据,各样品高质量测序数据均达到 5.27 Gb,质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比(Q30) $\geq 90.21\%$ (表 2)。

应用 Trinity 对高质量测序数据进行组装,得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene,转录本与 Unigene 的 N50 分别为 1940 和 928 (表 2)。序列长度为 200~300 nt 的 Unigene 最多,占总数的 42.76%; 300~500 nt 的有 33316 条,占 28.01%; 500~1000 nt 有 19088 条,占 16.05%; 1000~2000 nt 有 9112 条,占 7.66%; 2000 nt 以上的 Unigene 有 6569 条,占 5.52%。

表4 Unigene 注释统计
Tab.4 Statistics of Unigene annotated

注释数据库 Annotated databases	Unigene	≥ 300 nt	≥ 1000 nt
COG	12527	9481	4182
GO	13878	10018	3941
KEGG	11275	8707	3995
KOG	24738	18260	8144
Pfam	23791	18817	8903
Swiss-Prot	22344	17618	8421
Nr	33659	25595	10923
合计 Total	37580	27426	11044

高为内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*) (2787 条, 8%), 随后依次是蚤状蚤(*Daphnia pulex*, 1765)、隆头蛛(*Stegodyphus mimosarum*, 1169)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*, 1046)、囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*, 1019)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, 965)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*, 871)、卡氏棘阿米巴(*Acanthamoeba castellanii*, 735)、海蠕虫(*Capitella teleta*, 644)、霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*, 605)、凡纳滨对虾(217)、罗氏沼虾(107)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*, 92)和日本沼虾(*M. nipponense*, 79)。

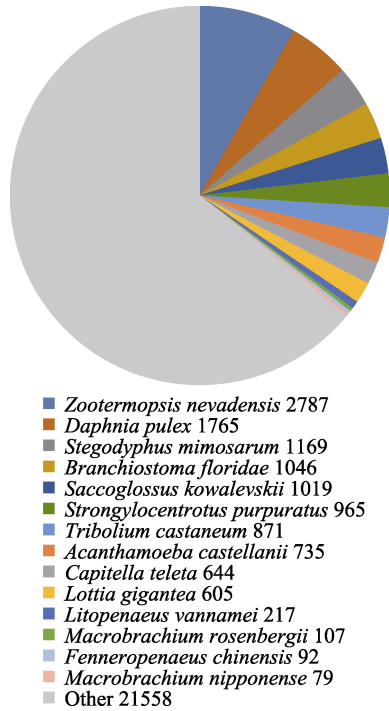


图 1 Nr 同源物种分布
Fig.1 Homologous species distribution of Nr

11275 条脊尾白虾 Unigene 注释到 KEGG, 归类为 223 个代谢通路, 其中, 基因数量排名前 20 的通路如图 2 所示, 包括核糖体、内质网中蛋白质加工、RNA 转运、剪接体、溶酶体、氧化磷酸化、糖酵解/糖异生、吞噬体、泛素介导的蛋白水解、嘌呤代谢、mRNA 监测、内吞、PI3K-AKT 信号通路、蛋白酶体、

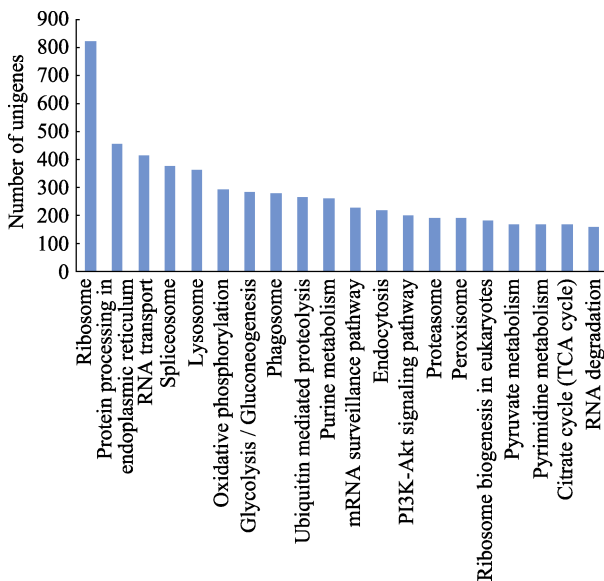


图 2 Unigene 的 KEGG 分析
Fig.2 KEGG analysis of Unigene

显示基因数量排名前 20 位的 KEGG 通路
Top 20 of gene number in KEGG pathway

过氧化物酶体、真核生物核糖体生物合成、丙酮酸代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环和 RNA 降解。另外, 在代谢通路中与低氧有关的还包括 Wnt 信号通路、mTOR 信号通路、自噬调节、p53 信号通路、癌症通路、HIF-1 信号通路和精氨酸与脯氨酸代谢。

2.3 差异表达基因分析

低溶氧胁迫脊尾白虾产生 1392 条差异表达基因, 包括 311 条上调基因和 1081 条下调基因。对脊尾白虾差异表达基因进行功能注释, 共注释到 784 条差异基因, 其中, COG 232 条, GO 240 条, KEGG 206 条, KOG 460 条, Pfam 587 条, Swiss-Prot 542 条, Nr 742 条。图 3 展示了白虾差异表达基因和所有基因在 GO 各二级功能中的注释情况, 发现差异基因主要富集到抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程。

利用 COG 对脊尾白虾差异表达基因产物进行直系同源分类, 发现碳水化合物运输和代谢、转录、复制、重组和修复、翻译后修饰、蛋白质周转和分子伴侣等 4 类富集的差异基因超过 20 个。其次, 无机离子转运与代谢、信号转导机制、氨基酸转运和代谢、细胞周期调控、细胞分裂和染色体分离、能量生产和转换、翻译、核糖体结构和生物合成、次生代谢产物生物合成、运输和代谢等过程富集的差异基因较多(图 4)。

按照 KEGG 通路类型分类, 脊尾白虾差异表达基因分别注释到环境信息处理、人类疾病、遗传信息处理、代谢、细胞过程和有机系统 6 个分支。其中, 遗传信息处理、代谢和细胞过程这 3 大类通路中脊尾白虾差异基因富集较多。在这些代谢通路中, 泛素介导的蛋白水解和溶酶体富集的差异基因最多, 分别为 11 和 10 条; 其次是吞噬(4)、过氧化物酶体(4)和内吞作用(3); 另外, 还包括糖酵解/葡萄糖生成(6)、精氨酸和脯氨酸代谢(4)、果糖和甘露糖代谢(4)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(4)和丙酮酸代谢(2)(图 5)。

表 5 为筛选出的部分脊尾白虾差异表达基因, KOG 分类注释包括 3 条氨基酸的运输和代谢基因(Amino acid transport and metabolism)、5 条碳水化合物的运输和新陈代谢基因(Carbohydrate transport and metabolism)、2 条防御机制基因(Defense mechanisms)、2 条能源生产和转化基因(Energy production and conversion)、7 条一般功能预测基因(General function prediction only)、6 条无机离子转运和代谢基因(Inorganic ion transport and metabolism)、3 条脂质转运和新陈代谢基因(Lipid transport and metabolism)、

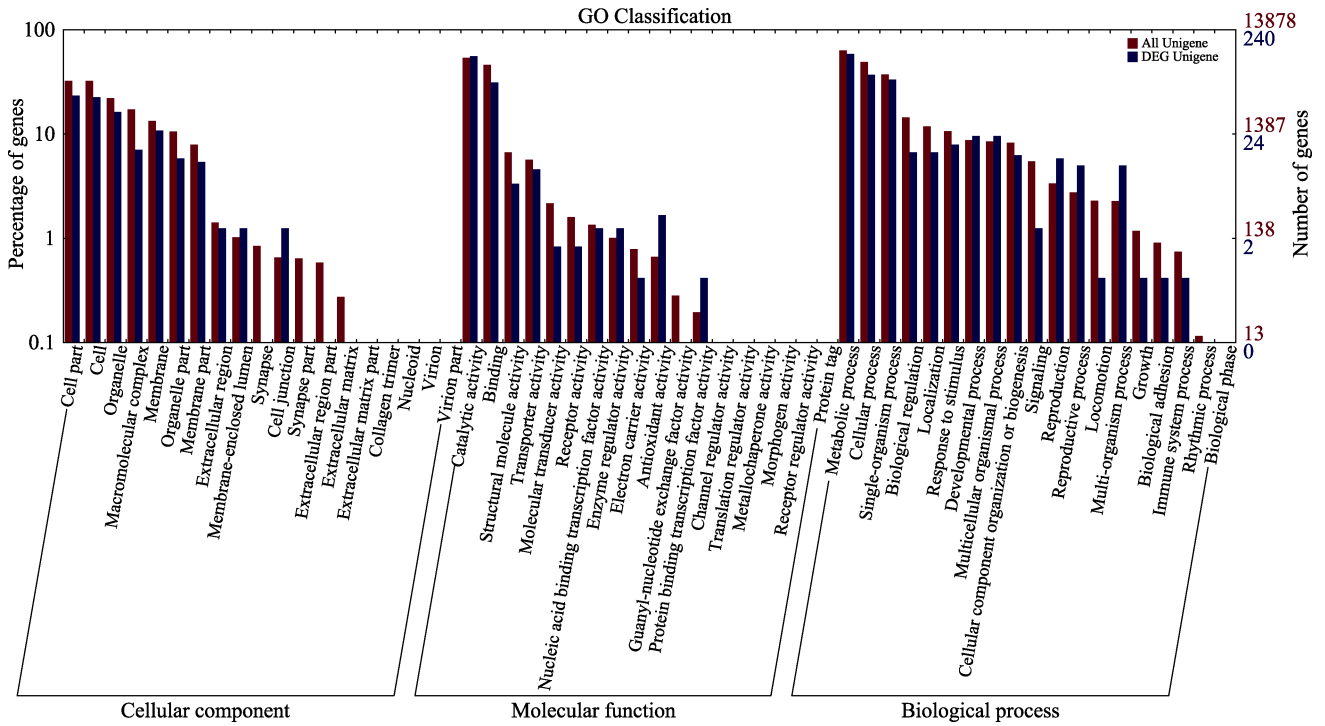


图 3 差异表达基因 GO 二级节点注释统计

Fig.3 Annotated statistical map of GO secondary node of differentially expressed genes

横坐标为 GO 三大分类下的二级节点，纵坐标表示注释到该节点的基因数目及占所有基因数目的百分比，红色柱体表示所有基因的注释情况，蓝色柱体表示差异表达基因的注释情况

The abscissa is the secondary node under the three categories of GO. The ordinates represent the number of genes annotated to the node and the percentage of all genes. The red column represents the annotation of all genes, and the blue column represents the annotation of differentially expressed genes

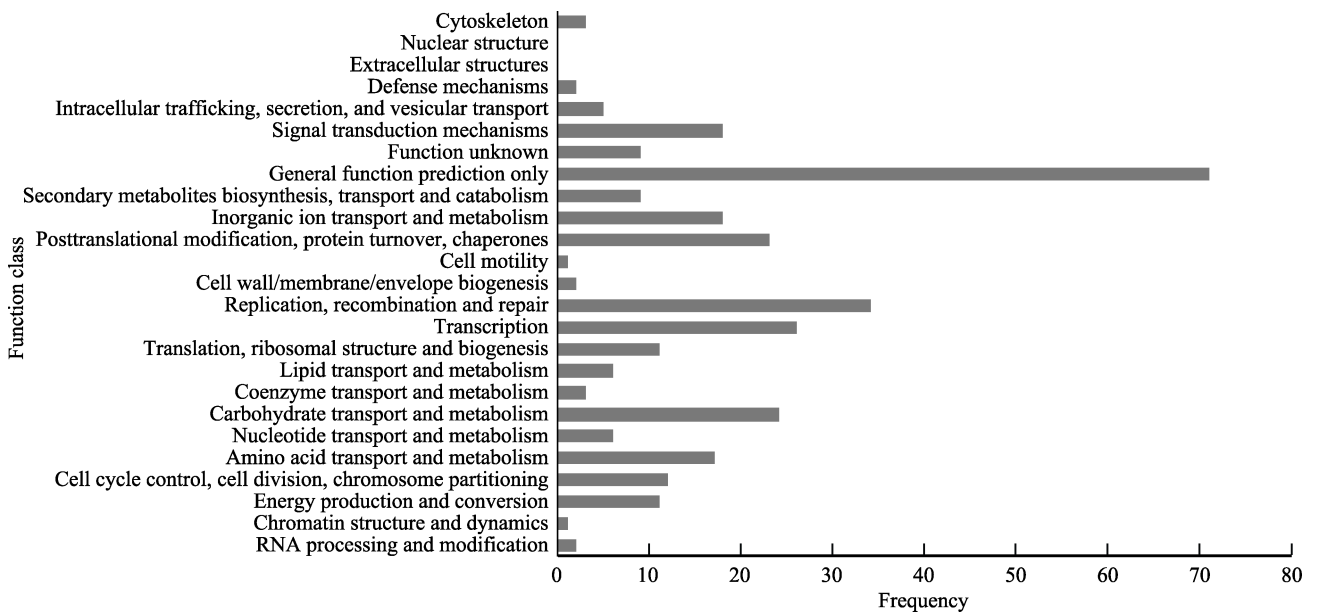


图 4 差异表达基因 COG 注释分类

Fig.4 Classification of COG annotations for differentially expressed genes

横坐标为 COG 各分类内容，纵坐标为基因数目

The abscissa is the classification content of COG, and the ordinate is the number of genes

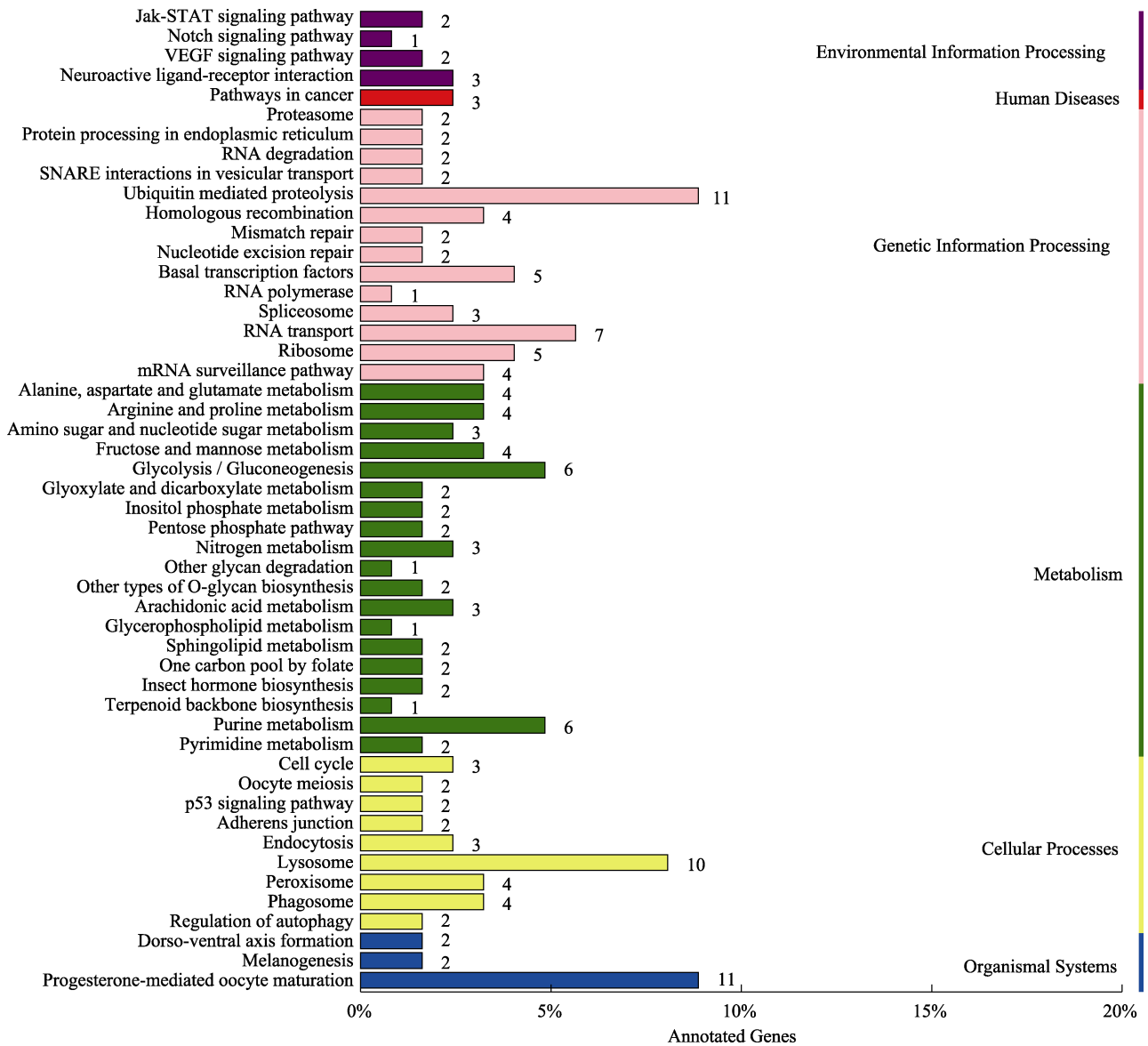


图 5 差异表达基因 KEGG 分类

Fig.5 KEGG classification map of differentially expressed genes

纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称，横坐标为注释到该通路下的基因个数及其个数占被注释上的基因总数的比例
The ordinate is the name of KEGG metabolic pathway. The abscissa is the number of genes annotated to the pathway and the proportion of the number of genes annotated to the total number of genes annotated

9 条翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质伴侣基因 (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)、1 条复制、重组和修复基因 (Replication, recombination and repair)、2 条次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢基因 (Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)、7 条信号转导机制基因 (Signal transduction mechanisms)、1 条转录基因 (Transcription) 和 1 条翻译、核糖体结构和生物起源基因 (Translation, ribosomal structure and biogenesis)。log₂FC 数值最大的为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (Serine/

threonine protein kinase), 为 4.98; 其次是 DNA 错配修复蛋白 (DNA mismatch repair protein), 为 3.38。log₂FC 数值最小的为组织蛋白酶 1 (Cathepsin 1), 为 -6.89; 其次是内切几丁质酶 (Endochitinase), -6.58。

2.4 低氧胁迫对 *HIF1* 信号通路基因表达的影响

本研究中, *HIF1* 密切相关的差异基因有 4 个, *HIF1α* 和 *HIF1β* 缺氧时表达量上调, 而 *HIF1α* 抑制剂 (*HIF1ai*) 和 *PHDs* 表达量下调。从转录组测序注释到的缺氧 *HIF1* 信号通路看出, *HIF1α* 的表达受 *PI3K*、*mTOR* 和 *MARK* 等信号通路关键因子的影响 (图 6)。

表5 部分差异表达基因
Tab.5 Part of differentially expressed gene

KOG 分类注释 KOG classification annotation	Unigene	对照组 FPKM 值 Control FPKM	低盐胁迫组 FPKM 值 Hypoxic stress FPKM	log ₂ FC
氨基酸的运输和代谢 Amino acid transport and metabolism	酚氧化酶原激活酶 Prophenoloxidase activating enzyme	16.60	65.77	2.13
	氨基酸转运体 Amino acid transporter	15.38	1.40	-3.27
	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase	3.77	0	-6.04
碳水化合物的运输和新陈代谢 Carbohydrate transport and metabolism	腺苷激酶 Adenosine kinase	1.84	0	-4.12
	磷酸甘油酸激酶 1 Phosphoglycerate kinase 1	1.21	0	-4.12
	糖原蛋白 1 Glycogenin 1	8.96	0.28	-4.64
	1,6-二磷酸果糖醛酸酶 Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	5.22	0.08	-5.06
	甘油醛 3 磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	1.95	0	-5.13
防御机制 Defense mechanisms	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine proteinase inhibitor	37.19	2.97	-3.46
	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	42.28	2.65	-3.84
能源生产和转化 Energy production and conversion	羟酸氧化酶 1 Hydroxyacid oxidase 1	0.90	0	-4.28
	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	1.90	0	-4.56
一般功能预测 General function prediction only	促性腺激素释放激素受体 Gonadotropin releasing hormone receptor	5.53	0.80	-2.58
	绒毛膜过氧化物酶 Chorion peroxidase	17.91	2.01	-2.98
	锌指蛋白 Zinc finger protein	2.76	0.25	-3.18
	神经肽 Neuropeptide	1.97	0.17	-3.20
	翻译起始因子 Translation initiation factor	3.90	0	-5.53
	几丁质识别蛋白 Chitin recognition protein	11.77	0	-6.08
	内切几丁质酶 Endochitinase	20.70	0.10	-6.58
无机离子转运和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	锌转运体 Zinc transporter	1.99	0.27	-2.49
	铜特异性金属硫蛋白 Copper specific metallothionein	21.23	0.5	-4.97
	铜伴侣 Copper chaperone	4.88	0	-4.99
无机离子转运和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	过氧化氢酶 Catalase	1.77	0	-5.46
	碳酸酐酶 1 Carbonic anhydrase 1	11.61	0.14	-5.75
	金属硫蛋白 Metallothionein	9.54	0	-6.32
脂质转运和新陈代谢 Lipid transport and metabolism	脂肪酸合酶 Fatty acid synthase	17.14	6.66	-1.22
	鞘磷脂磷酸二酯酶 Sphingomyelin phosphodiesterase	1.71	0.11	-3.65
	肌醇 3 磷酸合酶 Inositol 3 phosphate synthase	1.40	0	-5.13
翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质 伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	过氧化物酶 1 Peroxidase 1	0	1.36	4.24
	热休克蛋白 20 Heat shock protein 20	5.93	0.38	-3.34
	硫氧还蛋白 2 Thioredoxin 2	1.63	0	-4.12
	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	5.53	0.08	-5.00
	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase	1.81	0	-5.43

续表 5

KOG 分类注释 KOG classification annotation	Unigene	对照组 FPKM 值 Control FPKM	低盐胁迫组 FPKM 值 Hypoxic stress FPKM	log ₂ FC
翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	蛋白酶调节亚基 Protease regulatory subunit	15.38	0.22	-5.63
	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S transferase	4.43	0	-5.92
	组织蛋白酶 1 Cathepsin 1	46.67	0.30	-6.89
	腺苷三磷酸酶 ATPase	6.84	0	-7.23
复制、重组和修复 Replication, recombination and repair	DNA 错配修复蛋白 DNA mismatch repair protein	2.39	23.72	3.38
次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase	2.38	0	-4.21
	依赖于 NADP 的醇类氢化酶 NADP dependent alcohol hydrogenase	12.52	0.27	-4.88
信号转导机制 Signal transduction mechanisms	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase	0.11	5.97	4.98
	G 蛋白信号调节因子 Regulator of G protein signaling	2.52	6.72	1.54
	清道夫受体 B Scavenger receptor class B	53.43	5.47	-3.13
	卵黄蛋白原 Vitellogenin	50.02	3.23	-3.79
信号转导机制 Signal transduction mechanisms	卵黄蛋白原受体 Vitellogenin receptor	39.84	2.26	-3.99
	胰岛素受体 Insulin receptor	4.12	0.20	-4.11
	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase mos	4.36	0.13	-4.38
转录 Transcription	拉长素 C Elongin C	43.65	2.01	-4.21
翻译、核糖体结构和生物起源 Translation, ribosomal structure and biogenesis	蛋白质翻译因子 Protein translation factor	25.49	0.28	-5.98

注: FPKM: 基因表达量; log₂FC: 基因表达量差异倍数的对数值

Note: FPKM: Gene expression level; log₂FC: Logarithm of differential multiple of gene expression level

由图 7 可以看出, 在 0~120 min 内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1α* 基因表达与对照组相比明显下调; 而在 240 min, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1α* 基因表达与对照组相比, 明显上调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾肝胰脏 *HIF1α* 基因表达影响显著($P<0.05$)。在 10~20 min 时间范围内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1β* 基因表达与对照组相比明显下调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾鳃 *HIF1β* 基因表达影响显著($P<0.05$)。在 0~20 min 时间范围内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1α* 和 *PHDEs* 基因表达与对照组相比明显下调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾所有组织 *HIF1α* 和 *PHDEs* 基因表达影响显著($P<0.05$)。

3 讨论

曾地刚等(2013)通过 454 技术对凡纳滨对虾肝胰脏转录组测序, 获得 20225 条 Unigene。闫允君等(2020)利用 RNA-Seq 技术对中国对虾对照组和肌肉生长抑制素(*Mstn*)表达抑制组进行了测序分析, 发现 *Mstn* 表达被抑制后共筛选到 1657 个差异表达基因, 其中, 805 个显著上调, 852 个显著下调, 初步筛选出 29 个 *Mstn* 调控的与肌肉生长相关的基因, 为阐明对虾的肌肉发育调控机制提供了重要基础。刘欣(2016)获得日本沼虾 Unigenes 142560 条, 其中, 43038 条获得注释, 占总 Unigene 的 30.20%。本研究组装得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene, 获得 37580 条有注释信息的 Unigene, 占

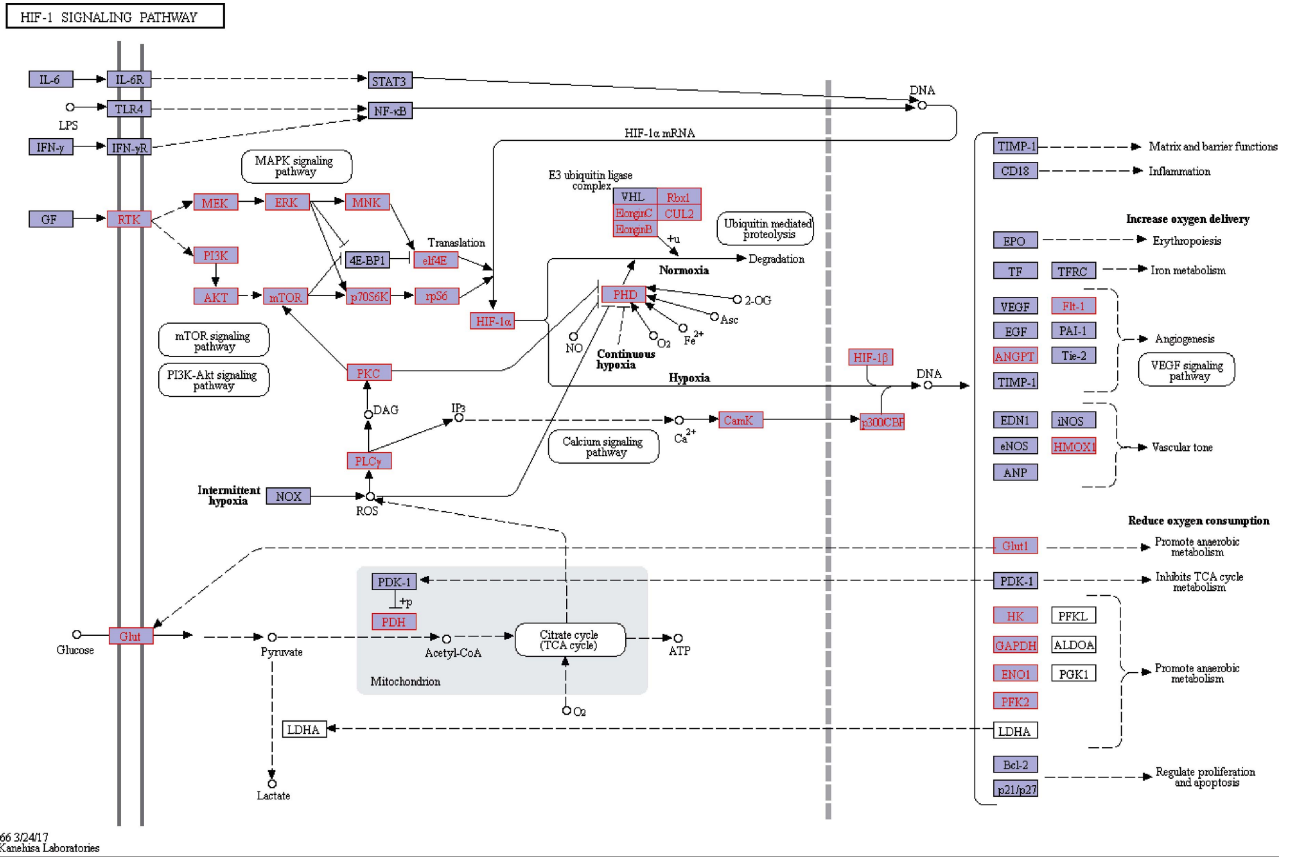


图6 缺氧 HIF1 信号通路
Fig.6 Hypoxic HIF1 signaling pathway

红色为转录组测序注释到的 Unigene
Red is the Unigene annotated by transcriptome sequencing

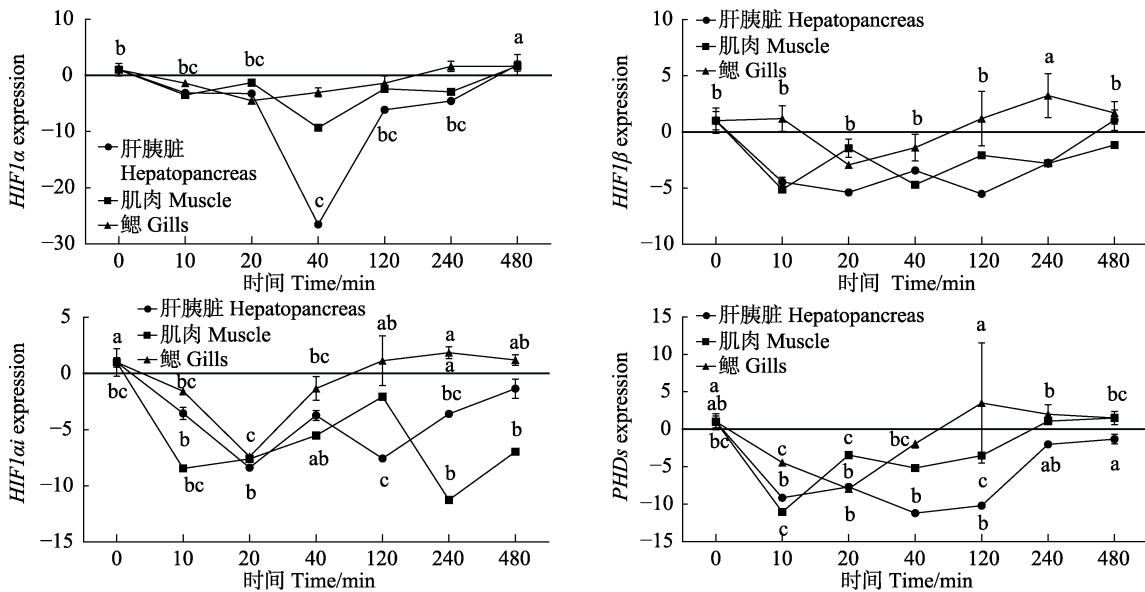


图7 低氧胁迫对脊尾白虾基因表达的影响
Fig.7 Effects of hypoxic stress on gene expression of *P. carinicauda*

同一线条中具有不同字母的数据间差异显著 ($P < 0.05$)
Data with different letters in the same line is significantly different ($P < 0.05$)

31.59%,其中,COG注释Unigene 12527条,GO 13878条,KEGG 11275条,Nr 33659条;在223个KEGG代谢通路中,*HIF1*信号通路、*Wnt*信号通路、*mTOR*信号通路、*p53*信号通路、癌症通路、自噬调节、精氨酸与脯氨酸代谢等通路与低氧胁迫有关。未获得功能注释的Unigene 81373条,占68.41%(表2、表3)。未注释的原因可能与组装的序列太短有关,转录组组装的Unigene长度在500 nt以下的占总量的70.77%,增加了功能注释的难度。另外,各类数据库功能注释信息不够全面,使一些基因不能够得到相应的注释,例如,在Nr注释中,白虾Unigene仅与217条凡纳滨对虾、107条罗氏沼虾、92条中国对虾和79条日本沼虾基因同源。

机体为适应缺氧环境会诱导一些与红细胞生成/铁代谢、血管生成、葡萄糖代谢、细胞增殖/生存和凋亡等相关基因的表达(Terova *et al.*, 2010)。本研究中,低氧胁迫产生1392条差异表达基因,784条差异基因得到注释(表5)。GO和COG注释表明,抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程富集的差异基因较多。与GO和COG注释类似,富集差异基因较多的与免疫有关的KEGG通路包括泛素介导的蛋白水解,含11条差异表达基因,其次是溶酶体10条、吞噬4条、过氧化物酶体4条和内存作用3条;而富集差异基因较多的与代谢有关的KEGG通路包括糖酵解/葡萄糖生成,含6条差异表达基因,其次是精氨酸和脯氨酸代谢4条、果糖和甘露糖代谢4条、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢4条和丙酮酸代谢2条(图5)。这些富集的差异基因表明,低氧胁迫激活了虾体适应缺氧的一系列生理活动,如诱导相关基因转录翻译,参与应激反应,增强白虾各类物质代谢。由表5可以看出,低氧胁迫条件下脊尾白虾酚氧化酶原激活酶、过氧化物酶1、DNA错配修复蛋白、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和G蛋白信号调节因子等基因显著上调。低氧胁迫对碳水化合物的运输和新陈代谢基、防御机制、能源生产和转化、一般功能预测、无机离子转运和代谢、脂质转运和新陈代谢、次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢、转录和翻译、核糖体结构和生物起源等过程产生了抑制效应,表现为富集大量下调的差异表达基因。

转录因子*HIF1 α* 是氧传感的核心成分,*HIF1 α* 还可作为许多基因的转录调节因子,这些基因在生理学和医学中至关重要(McNamee *et al.*, 2016; Semenza, 2012)。*HIF1 α* 抑制剂PHDs需要氧作为羟化作用的辅助因子,在正常条件下,PHDs通过PHD-HIF途径羟甲基化*HIF1 α* 保守的脯氨酰残基,从而靶向*HIF1 α* 被泛

素蛋白酶体降解失活。然而,在缺氧或炎症条件下,PHD-HIF途径失活,产生稳定的*HIF1 α* 、*HIF1 α* 和*HIF1 β* 组成转录活性二聚体*HIF1*移位至细胞核,与缺氧调节基因的启动子区域结合调控下游基因表达,这些区域通常是启动子内的“缺氧反应元件”;一方面,通过激活促红细胞生成素(EPO)基因表达促进红细胞生成,激活血清铁传递蛋白(TF)和转铁蛋白受体(TFRC)基因表达促进铁代谢,激活血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(Flt1)、表皮细胞生长因子(EGF)、血管生成素(ANGPT)和金属肽酶抑制剂(TIMP1)等基因表达促进血管生成,激活血红素加氧酶1(HMOX1)增强血管张力,通过以上调控增强氧的传递;另一方面,通过激活磷酸肌醇依赖的蛋白激酶1(PDK1)抑制三羧酸循环代谢,激活磷酸甘油脱氢酶(GPDH)、己糖激酶(HK)、 α 烯醇化酶(ENO 1)、6-磷酸果糖激酶2(PFK 2)和磷酸甘油酸激酶1(PGK1)等表达促进厌氧代谢,激活B淋巴瘤细胞瘤2(*bcl2*)和*p21/p27*蛋白调节增殖凋亡、降低O₂消耗,通过以上调控,缓解机体对缺氧的不适(图6)。当处于缺氧条件下,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、石首鱼(*Sciaenidae*)、黑鲈(*Micropterus salmoides*)和河鲈(*Perca fluviatilis*)一些组织中*HIF1 α* 转录水平显著上调(Terova *et al.*, 2010)。任倩妍等(2018)研究发现,大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)在缺氧环境下*HIF*信号通路被激活,肝中低氧诱导因子表达量上调。Okamura等(2018)研究发现,日本沼虾*HIF1 α* 表达水平在缺氧刺激24 h后显著增加,缺氧刺激6 h后*Von Hippel-Lindau*肿瘤抑制剂基因表达显著下降。与以上研究类似,转录组数据分析发现,*HIF1 α* 和*HIF1 β* 缺氧时表达量上调;低氧胁迫实时定量测定证实,在胁迫的后期,脊尾白虾肝脏和鳃*HIF1 α* 和*HIF1 β* 明显上调,表明脊尾白虾细胞在低溶氧环境下诱导*HIF*产生,刺激机体增加血液氧的供应能力。*HIF1 α* 还激活葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶、血管内皮生长因子等,通过提高糖转运和促进糖酵解以适应缺氧环境(Zhou *et al.*, 2018)。周晓黎等(2018)研究发现,阻断*PI3K/AKT*信号途径,结肠癌细胞中*HIF1 α* 下调,并可导致糖酵解相关蛋白如葡萄糖转运蛋白-1和乳酸脱氢酶A的表达下降,糖酵解代谢产物乳酸含量下降。本研究中,糖酵解/葡萄糖生成通路、精氨酸和脯氨酸代谢和丙酮酸代谢富集大量差异表达基因(图5),也说明机体缺氧使糖酵解等无氧代谢途径增强,同时促进了部分糖类和氨基酸的代谢。

细胞自噬通过分解代谢和再循环来消除受损或有害成分,以维持营养和能量稳态,涉及细胞质、细胞器或胞质组分的溶酶体降解;该途径可通过多种形

式的细胞应激来刺激,包括营养或生长因子剥夺、缺氧、活性氧物质、DNA 损伤、蛋白质聚集体、受损细胞器或细胞内病原体(Kroemer *et al.*, 2010; 马骊等, 2018)。在自噬过程中,细胞形成双膜囊泡、自噬体、隔离细胞器,蛋白质或部分细胞等递送至溶酶体细胞质,溶解体中的隔离内容物被降解(He *et al.*, 2009)。自噬构成了一种主要的保护机制,使细胞能够在多种应激源的作用下存活,并有助于保护生物免受退化、炎症、感染和肿瘤疾病的侵害(Levine *et al.*, 2008; Mizushima *et al.*, 2008)。在 Snare 蛋白及小 Rab GTP 激酶的作用下,自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,发挥其降解功能(徐倩等, 2017)。缺氧可通过 *NF- κ B* 途径诱导自噬激活,从而调节细胞增殖和迁移,以诱导肺血管重塑(Jing *et al.*, 2018)。闫广伟等(2018)研究发现,低氧环境可能通过 *HIF-1 α /Bnip3* 途径诱导滋养细胞自噬水平增强。本研究代谢通路中,溶酶体通路、吞噬通路、过氧化物酶体通路和内吞作用通路富集的差异基因较多(图 5),这些差异基因的表达也证实可能与缺氧引起的自噬有关。推测 *HIF* 可通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

综上所述,低氧胁迫可诱导脊尾白虾产生低氧诱导因子调控下游基因表达,进而激活虾体适应缺氧的一系列生理活动,增强脊尾白虾各类物质代谢,促进血管生成,增强血管张力,刺激虾体增加血液氧供应能力;另一方面,低氧胁迫促进厌氧代谢,缓解虾体对缺氧的不适,而低氧诱导因子可通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

参 考 文 献

- Camacho-Jiménez L, Peregrino-Urriarte AB, Martínez-Quintana, JA, *et al.* The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Marine Environmental Research*, 2018, 138: 65–75
- Han SY, Wang MQ, Liu M, *et al.* Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. *Aquaculture*, 2018, 490: 44–52
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 67–93
- Jing X, Jiang T, Dai L, *et al.* Hypoxia-induced autophagy activation through *NF- κ B* pathway regulates cell proliferation and migration to induce pulmonary vascular remodeling. *Experimental Cell Research*, 2018, 368(2): 174–183
- Kroemer G, Guillermo, M, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 280–293
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132(1): 27–42
- Li GQ, Zhang Y. Recent advances in the study of biological characteristics of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Practical Medicine*, 2005, 22(8): 749–750 [李国青, 张育. 缺氧诱导因子-1 生物学特性的研究新进展. *实用医药杂志*, 2005, 22(8): 749–750]
- Li GR, Ren LH, Sun GH, *et al.* Effects of hypoxic stress on oxidative stress indices in *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 133–139 [李根瑞, 任利华, 孙国华, 等. 低溶氧胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)氧化应激指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 133–139]
- Lian CA. Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes and HIF-1 in *Exopalaemon carinicauda*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [连春盎. 干露胁迫对脊尾白虾呼吸代谢相关酶和低氧诱导因子的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Liu X. High-throughput transcriptome analysis and immune gene discovery of *Macrobrachium nipponense*. Master's Thesis of Hebei University, 2016 [刘欣. 基于日本沼虾转录组的免疫基因发掘. 河北大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Ma L, Ge QQ, Xu Y, *et al.* Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (TCTP) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 101–109 [马骊, 葛倩倩, 许杨, 等. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 TCTP 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 101–109]
- McNamee EN, Vohwinkel C, Eltzhig HK. Hydroxylation-independent HIF-1 α stabilization through PKA: A new paradigm for hypoxia signaling. *Science Signaling*, 2016, 9(430): fs11
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069–1075
- Okamura Y, Mekata T, Elshopakey GE, *et al.* Molecular characterization and gene expression analysis of hypoxia-inducible factor and its inhibitory factors in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 79(8): 168–174
- Ren QY, Zhang MZ, Li M, *et al.* Differential induction of gene expressions, protein contents and enzyme activities involved in hypoxic responsive in liver tissues of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to acute hypoxia. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(4): 187–194 [任倩妍, 张木子, 黎明, 等. 急性缺氧对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)肝脏中缺氧应答相关基因表达、蛋白含量及酶活性的影响. *海洋与湖沼*, 2018, 49(4): 187–194]
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148(3): 399–408
- Sun SM, Guo ZB, Fu HT, *et al.* Based on the metabolomic approach the energy metabolism responses of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* hepatopancreas to acute hypoxia and reoxygenation. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 76
- Terova G, Rimoldi S, Ceccuzzi P, *et al.* Molecular characterization and in vivo expression of hypoxia inducible factor (HIF) 1 α in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to acute and chronic hypoxia. *Italian Journal of Animal Science*, 2010, 8(2s): 875–877
- Xu Q, Ha XQ. The protective function of autophagy in hypoxic stress and its regulatory mechanism. *Journal of Medical Research*, 2017, 46(2): 7–9 [徐倩, 哈小琴. 自噬在缺氧应激中的保护作用及其调控机制. *医学研究杂志*, 2017, 46(2): 7–9]

- Yan GW, Ding YZ, Xing JF, *et al.* Effects of hypoxia on expressions of HIF-1 α , BNIP3 and autophagy, invasion ability in trophoblasts. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2018, 227(2): 68–72 [闫广伟, 丁燕子, 邢金芳, 等. 低氧对滋养细胞 HIF-1 α 、BNIP3 表达及自噬和侵袭能力的影响. *郑州大学学报(医学版)*, 2018, 227(2): 68–72]
- Yan YJ, Lu X, Meng XH, *et al.* Screening of genes related to muscle growth under the Myostatin regulation by RNA-seq in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200324002> [闫允君, 卢霞, 孟宪红, 等. 基于转录组分析对中国对虾 Myostatin 基因调控的肌肉生长相关基因的筛选. *渔业科学进展*, <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200324002>]
- Zeng DG, Chen XL, Xie DX, *et al.* Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei*. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(3): 308–313 [曾地刚, 陈秀荔, 谢达祥, 等. 基于高通量测序的凡纳滨对虾的转录组分析. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(3): 308–313]
- Zheng H, Li B, Rong XJ, *et al.* Effects of salinity and dissolved oxygen variation on the non-specific immune response of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 118–124 [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 118–124]
- Zhou J, Li C, Yao W, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent autophagy plays a role in glycolysis switch in mouse graulosa cells. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(2): 308–318
- Zhou XL, Shu L, Liao Y, *et al.* Role of PI3K/AKT signal pathway in expression of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolysis in colon cancer cells under hypoxia. *Acta Mediciniae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong*, 2018, 47(2): 203–206 [周晓黎, 舒磊, 廖艳, 等. PI3K/AKT 通路在低氧环境下对结肠癌细胞 HIF-1 α 及糖酵解的作用. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(2): 203–206]

(编辑 冯小花)

Transcriptome Analysis of *Palaemon carinicauda* Subjected to Hypoxic Stress

CAO Mei¹, WANG Xingqiang¹*, QIN Chuanxin², SHEN Ye¹, ZHANG Ziyang¹, QIAN Shiyue¹

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment;

South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300)

Abstract A rapid reduction in the dissolved oxygen concentration of water is an important factor contributing to disease in shrimps. In this study, we examined differential gene expression in the shrimp *Palaemon carinicauda* under conditions of hypoxic stress. We obtained 10.62 Gb of high-quality sequencing data, from which 155113 transcripts and 118953 unigenes were assembled. Among the unigenes, 37580 were annotated and 33659 were found to be homologous to genes in the Nr protein database. We also annotated 11275 unigenes using the KEGG database, which were further classified into 223 metabolic pathways. We detected 1392 genes that were differentially expressed in shrimps exposed to hypoxic stress, among which 311 and 1081 were up- and down-regulated, respectively, and 784 were annotated. The enrichment of differentially expressed genes in antioxidant activity, cell connection, protein-binding transcription factor activity, multicellular biological processes, replication, and reproductive processes indicated that exposure to hypoxia activated a series of physiological responses in shrimps associated with adaptation to low levels of dissolved oxygen. Among the genes up-regulated under hypoxic stress was hypoxic induction factor 1 (*HIF1*), which is comprised the two subunits *HIF1 α* and *HIF1 β* . RT-PCR analysis revealed that during the latter stages of hypoxic stress, there was a notable up-regulated expression of *HIF1 α* and *HIF1 β* in the hepatopancreas and gills of *P. carinicauda*. These observations indicated that *P. carinicauda* cells induced hypoxic induction factor production in a hypoxic environment, thereby inducing an increase in blood oxygen supply. We also detected an enrichment of differentially expressed genes in the glycolysis/glucose generation pathway, arginine and proline metabolism, and pyruvate metabolism in response to hypoxic stress, which indicated an upregulation of anaerobic metabolic processes such as glycolysis, and increased metabolism of certain carbohydrates and amino acids. In addition, we detected numerous differentially expressed genes associated with the pathways involving lysozymes, phagocytosis, peroxisomes, and endocytosis in *P. carinicauda* exposed to hypoxia, thereby indicating that HIFs might reduce mitochondrial oxygen consumption by inhibiting mitochondrial biosynthesis and activating mitochondrial autophagy.

Key words *Palaemon carinicauda*; Stress hypoxic; Transcriptome analysis; Differential gene expression

* Corresponding author: WANG Xingqiang, E-mail: hyxywxq@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200211002

http://www.yykxjz.cn/

林瑞环, 赵玲, 曹荣, 刘淇. 南极磷虾与鹰爪糙对虾酚氧化酶生化性质对比分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 124–131
Lin RH, Zhao L, Cao R, Liu Q. Comparative analysis on the biochemical properties of phenoloxidase isolated from *Euphausia superba* and *Trachypenaeus curvirostris*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 124–131

南极磷虾与鹰爪糙对虾酚氧化酶 生化性质对比分析*



林瑞环^{1,2} 赵玲² 曹荣^{2,3①} 刘淇²

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 200090; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室 青岛 266071)

摘要 黑变是南极磷虾(*Euphausia superba*)贮运流通过程中的突出问题,为探究南极磷虾与普通海捕虾在黑变进程方面的异同,选取南极磷虾和海捕鹰爪糙对虾(*Trachypenaeus curvirostris*)作为研究对象,对 2 种虾在(2±1)℃贮藏过程中的黑变进程进行了感官评价,提取其酚氧化酶(PO)并进行了纯化,对 2 种虾 PO 的生化性质进行了对比分析。结果显示,冷藏条件下,24 h 时南极磷虾的黑变已非常严重,黑变部位主要集中在头胸部、腹部甲壳以及尾节部分。72 h 时鹰爪糙对虾的头胸部和尾节部分开始有轻微的黑变,之后逐渐扩散到躯干。南极磷虾和鹰爪糙对虾 PO 粗酶液经硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤后,酶的纯化倍数分别达到 17.22 和 19.67。2 种虾 PO 的最适温度分别为 30℃和 40℃,南极磷虾 PO 在低温下仍具有较高的活力。二者的最适 pH 均为 6.0~7.0 之间。焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸和抗坏血酸均可较好地抑制 2 种虾 PO 活力,其中,4-己基间苯二酚抑制效果最好。研究结果为南极磷虾冷链物流过程中的品质控制提供了依据,同时,为虾死后如何有效抑制其黑变提供了参考。

关键词 黑变; 南极磷虾; 鹰爪糙对虾; 酚氧化酶

中图分类号 S983 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0124-08

虾在我国渔业经济中占有重要地位,鲜销是其主要的产品形态,然而,鲜虾在流通和储藏过程中有一最为突出的问题—黑变。虾的黑变是其体内的酪氨酸或其衍生物等色原物质在酶的作用下经过一系列生化反应最终形成黑色素的过程,这一过程与酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)密切相关(Begoña *et al.*, 2010)。PO 可以催化虾体中的无色单酚化合物向双酚及双酚化合物转化,进而转化为醌类物质,醌类物质进一步与

氨基酸或蛋白质结合生成黑色素,产生黑变,从而严重影响虾的外观,制约其商业价值(Friedman, 1996)。

PO 是虾类黑色素生成反应的限速酶,研究其生化性质对于探究虾的黑变机理及防控方法具有重要的现实意义。目前,已有国内外学者对斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Rolle *et al.*, 1991)、桃红对虾(*Penaeus duorarum*) (Simpson *et al.*, 1998)、中国对虾(*Penaeus chinensis*) (汪小锋等, 2003)、日本对虾

* 山东省重大科技创新工程专项(2018SDKJ0304-2)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022020013)共同资助 [This work was supported by the Key Science and Development Innovation Program of Shandong Province (2018SDKJ0304-2), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020013)]. 林瑞环, E-mail: 2055853201@qq.com

① 通讯作者: 曹荣, 副研究员, E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-02-11, 收修改稿日期: 2020-03-02

(*Penaeus japonicus*) (Soottawat *et al.*, 2005)、长额拟对虾(*Parapenaeus longirostris*) (José-Pablo *et al.*, 2009) 和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (鲍俊旺等, 2019) 等的 PO 进行了分离纯化和生化性质研究, 发现不同种类虾的 PO 在分子量、等电点、最适 pH 值、热稳定性以及动力学参数等方面均有很大差异。对于虾黑变的控制目前主要采用化学法, 如亚硫酸盐类(李小蕾等, 2012)、4-己基间苯二酚(周宇芳等, 2019) 以及一些天然提取物(Jang *et al.*, 2003; Nilesh *et al.*, 2009; Nalan *et al.*, 2008) 等, 均表现出了很好的防黑变效果, 但对于酚酶活性的影响研究尚不够全面。

南极磷虾(*Euphausia superba*) 富含 8 种人体必需氨基酸且比例适宜, 具有很高的营养价值(聂玉晨等, 2016; 曹荣等, 2018b), 广泛分布于环南极大陆架水域, 资源量极为丰富。在世界近海渔业资源普遍衰退的情况下, 南极磷虾已成为世界渔业发达国家竞相开发利用的海洋新资源(曹荣等, 2018a)。在其运输过程中, 大部分采用船上冷冻保藏到陆地上解冻二次加工的方法, 在此过程中很容易发生自溶、黑变等变化, 影响南极磷虾品质(陈怡炫等, 2018)。我国从 2009 年开始对南极磷虾进行大规模的商业化捕捞和加工(黄洪亮等, 2015), 但在船载加工技术和设备方面还比较落后, 在南极磷虾贮运与利用方面的研究也比较薄弱(湛志新等, 2019)。鹰爪糙对虾(*Trachypenaeus curvirostris*) 又称立虾、红虾, 体型较小, 体长与南极磷虾相似, 是我国黄、渤海产量较高的一种海捕虾类, 味道鲜美, 是加工“金钩海米”的原材料(张树德等, 1992)。目前, 已有较多关于大宗虾类品种黑变方面的研究报道, 但对南极磷虾黑变以及 PO 性质的相关研究较少, 南极磷虾与普通海捕虾在黑变进程和机制方面是否存在差异也尚未可知。

本文选取南极磷虾及鲜活鹰爪糙对虾作为研究对象, 观察 2 种虾在(2±1)℃贮藏过程中的黑变进程, 从头胸部提取到 PO 粗酶并进行了纯化, 对 2 种虾 PO 的生化性质进行了对比分析, 旨在为南极磷虾冷链物流过程中的品质控制和死后黑变机理研究等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料与试剂

南极磷虾由辽宁省大连海洋渔业集团南极磷虾作业船于 2018 年 11 月在南极海域捕捞, 捕后包被冰衣, -30℃冻藏, 2019 年 5 月运抵实验室后, 迅速用流动水解冻, 选取完整的南极磷虾进行后续实验。

鲜活鹰爪糙对虾购于青岛市埠东水产品批发市场, 充氧条件下 30 min 内运送至实验室, 剔除死亡个体, 选取体长均一个体(4~5 cm), 流水冲洗后加冰猝死, 进行后续实验。

L-3,4-二羟基苯丙氨酸、硫酸铵、焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、植酸钠、L-半胱氨酸、4-己基间苯二酚(4-HR)、抗坏血酸、苯甲酸、柠檬酸和乳酸等均为分析纯, 购于美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑变进程观察 将解冻后的南极磷虾与猝死后的鹰爪糙对虾分别放置于(2±1)℃冰箱中, 定期取样观察其黑变情况。

1.2.2 PO 粗酶液的制备与部分纯化 参照汪小锋等(2003)的方法, 略有改动。取虾的头胸部按 1:5 (w/v) 比例加入预先冷却的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2), 剪碎、均质 30 min 后离心(4℃, 8000 r/min, 20 min), 取上清液, 测定蛋白质含量及酶活力。

在上清液中缓慢加入固体硫酸铵粉末, 并不断搅拌, 分别收集 0~40%、40%~75% 和 75%~100% 部分的沉淀。将 3 组沉淀分散于磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)中, 透析 24 h, 离心(4℃, 8000 r/min, 20 min)后取上清液, 分别测定蛋白质含量及酶活力。

Sephadex G-100 凝胶过滤柱(1.8 cm×75.0 cm)经磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)预平衡后, 取 40%~75% 硫酸铵沉淀对应的组分上柱, 以 0.5 ml/min 的流速进行洗脱, 检测 280 nm 下的吸光度值, 收集蛋白峰对应的组分, 检测酶活力, 收集酶活较高的管数, 超滤浓缩后-80℃保存, 留待后续实验测定。

1.2.3 PO 比活力测定 参照 Zamorano 等(2009)的方法, 略有改动。以 L-3,4-二羟基苯丙氨酸为底物, 将 2.0 ml 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)与 2.0 ml L-3,4-二羟基苯丙氨酸溶液(20.0 mmol/L)混合, 30℃水浴中孵育, 加入待测酶液 0.2 ml 混匀, 反应 5 min 后, 在波长为 475 nm 处测定吸光度值。每分钟吸光度值增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位(U)。

采用双缩脲法测蛋白质含量, 计算比活力(U/mg)。

1.2.4 温度对酚氧化酶活力的影响 将底物与待测酶液分别在 5℃、10℃、20℃、30℃、40℃、50℃ 和 60℃ 条件下孵育后混合, 反应 5 min 后测定酶活力。

1.2.5 pH 对酚 PO 活力的影响 将底物与不同 pH 的缓冲溶液混合, 使反应体系的最终 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 30℃水浴中孵育, 加入待测酶液 0.2 ml 混匀, 反应 5 min 后测定酶活力。

1.2.6 化学试剂对 PO 活力的影响 分别配制

0.1%(w/v)的焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、植酸钠、L-半胱氨酸、4-己基间苯二酚、抗坏血酸、苯甲酸、柠檬酸和乳酸水溶液。将底物溶液与上述溶液 1:1(v/v)混合, 30℃水浴中孵育, 加入待测酶液 0.2 ml 混匀, 反应 5 min 后, 在波长为 475 nm 处测定吸光度值, 计算酶活力。以磷酸盐缓冲溶液为对照, 计算相对酶活力。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理, 结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示, $P<0.01$ 为极显著, $P<0.05$ 为显著, $P>0.05$ 为不显著。

2 结果与分析

2.1 南极磷虾与鹰爪糙对虾冷藏过程黑变进程

由表 1 可以看出, 南极磷虾的黑变进程与鹰爪糙对虾相比更为迅速。冷藏条件下 24 h 时, 南极磷虾的黑变已经非常明显, 黑变部位集中在头胸部、腹部甲壳以及尾节部分, 这与长额拟对虾(José-Pablo *et al.*, 2009)发生黑变的规律类似。鹰爪糙对虾在 72 h 时可以观察到头胸部、尾节部分有轻微的黑变, 之后逐渐扩散到躯干。鹰爪糙对虾不同个体间的黑变进程略有差别, 这可能与其死前的生理状态有关, 虾个体在底物水平、酶激活因子等方面的差异也会影响黑变的进程。

2.2 南极磷虾与鹰爪糙对虾 PO 分离纯化结果

对 2 种虾 PO 的纯化结果见表 2。南极磷虾 PO 粗酶液的比活力为 1.58 U/mg, 经硫酸铵沉淀后, 得到初步纯化酶, 其中, 40%~75%硫酸铵沉淀组分的蛋白回收率为 40.67%, 酶活回收率高达 67.11%, 比活力提高至 2.61 U/mg, 该组分经 Sephadex G-100 凝胶过滤后, 比活力达 27.25 U/mg, 纯化倍数提高至 17.22。

鹰爪糙对虾 PO 粗酶液的比活力为 1.28 U/mg, 略低于南极磷虾, 且 PO 活性主要集中在 0~40%硫酸铵沉淀部分, 酶活回收率达 59.55%, 这与赵娇等(1997)发现日本对虾 PO 活性主要存在于 0~40%硫酸铵沉淀组分中一致。该组分经 Sephadex G-100 凝胶过滤后, 比活力提高至 25.21 U/mg, 酶的纯化倍数达到 19.67。

2.3 温度对 PO 活力的影响

温度对 2 种虾 PO 活力的影响如图 1。南极磷虾 PO 在 5℃和 10℃条件下, 活力极显著高于鹰爪糙对虾($P<0.01$), 这与其在低温储藏时黑变发生更为迅速的现象一致, 最适温度在 30℃左右, 50℃以上活力迅速下降, 这可能与南极磷虾生长的环境温度较低, 南

极海域海水温度范围在-1.3℃~3.0℃(李莹春等, 2012)有关。

鹰爪糙对虾 PO 在低温条件下活力较低, 而 50℃和 60℃下的活力显著高于南极磷虾。鹰爪糙对虾 PO 的最适温度在 40℃左右, 这与凡纳滨对虾(鲍俊旺等, 2019; Nilesh *et al.*, 2011)、中国对虾(樊廷俊等, 2002)等 PO 的最适温度接近。

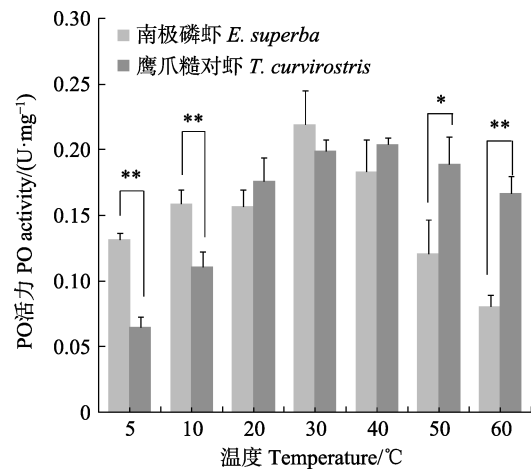


图 1 温度对南极磷虾与鹰爪糙对虾 PO 活力影响
Fig.1 Effects of temperature on the PO activity of *E. superba* and *T. curvirostris*

*表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)
*: The difference is significant ($P<0.05$);
**: The difference is highly significant ($P<0.01$)

2.4 pH 对 PO 活力的影响

南极磷虾和鹰爪糙对虾 PO 随 pH 的变化规律较为一致, 如图 2 所示, 最适 pH 均在 6.0~7.0 范围内, 酸性或碱性条件对酶活力都有一定的抑制作用, 因此, 南极磷虾在运输过程中提供一个酸性冷冻环境对其保鲜期延长效果会有帮助。

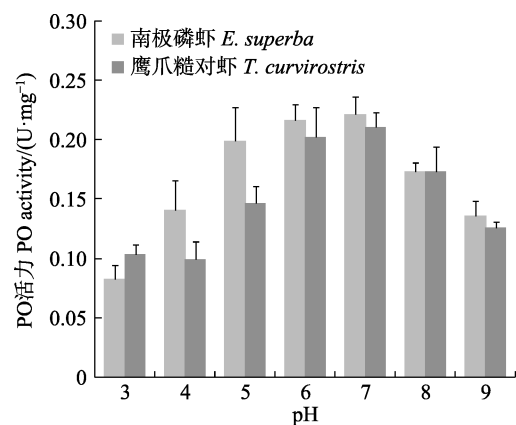


图 2 pH 对南极磷虾与鹰爪糙对虾 PO 活力影响
Fig.2 Effects of pH on the PO activity of *E. superba* and *T. curvirostris*

表 1 南极磷虾与鹰爪糙对虾冷藏过程中黑变情况
 Tab.1 Melanosis progress of *Euphausia superba* and *Trachypenaeus curvirostris* during refrigerated storage






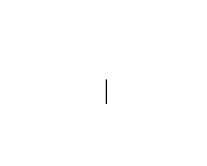
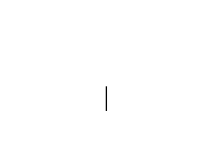
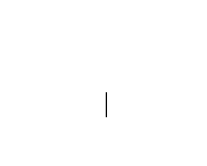
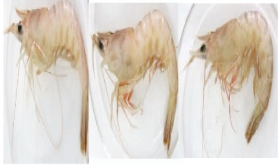

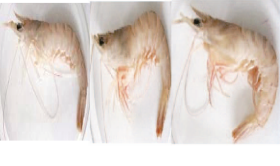


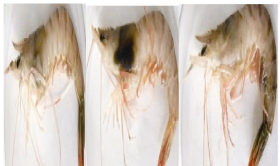

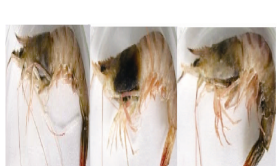
Species	贮藏时间 Storage time (h)							
	0	12	24	48	72	96	120	144
南极磷虾 <i>Euphausia superba</i>								
鹰爪糙对虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i>								

表 2 南极磷虾与鹰爪糙对虾酚氧化酶纯化结果
Tab.2 Results of PO purification of *E. superba* and *T. curvirostris*

品种 Species	纯化步骤 Purification steps	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total PO activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	蛋白回收率 Protein recovery (%)	酶活回收率 Enzyme recovery (%)	纯化倍数 Purification fold
南极磷虾 <i>E. superba</i>	粗酶液	782.53	1238.55	1.58	100.00	100.00	1.00
	Crude enzyme solution						
	0~40%硫酸铵沉淀组分	72.28	119.46	1.65	9.24	9.65	1.04
	0~40% ammonium sulfate fraction						
	40%~75%硫酸铵沉淀组分	318.27	831.20	2.61	40.67	67.11	1.65
	40%~75% ammonium sulfate fraction						
	75%~100%硫酸铵沉淀组分	174.55	107.23	0.61	22.31	8.66	0.39
	75%~100% ammonium sulfate fraction						
鹰爪糙对虾 <i>T. curvirostris</i>	凝胶过滤组分	10.38	282.85	27.25	1.33	22.84	17.22
	Gel filtration fraction						
	粗酶液	696.80	893.10	1.28	100.00	100.00	1.00
	Crude enzyme solution						
	0~40%硫酸铵沉淀组分	228.25	531.85	2.33	32.76	59.55	1.82
	0~40% ammonium sulfate fraction						
	40%~75%硫酸铵沉淀组分	134.09	165.89	1.24	19.24	18.57	0.97
	40%~75% ammonium sulfate fraction						
	75%~100%硫酸铵沉淀组分	68.04	90.18	1.33	9.76	10.10	1.03
	75%~100% ammonium sulfate fraction						
	凝胶过滤组分	9.90	249.60	25.21	1.42	27.95	19.67
	Gel filtration fraction						

2.5 化学试剂对 PO 活力的影响

化学法是抑制虾类黑变最为常见的方法。几种化学试剂对 2 种虾 PO 活力的影响见图 3。植酸钠、苯甲酸、柠檬酸和乳酸未表现出明显的 PO 抑制效果。焦亚硫酸钠和亚硫酸氢钠对南极磷虾和鹰爪糙对虾 PO 均有较好的抑制作用, 相对酶活都低于 60%。亚硫酸盐类在控制虾类黑变中应用广泛(李小蕾等, 2012; Ferrer *et al.*, 1989), 其分解后释放的 SO₂ 可有效抑制 PO 活性, 同时, 可与黑变的中间产物-醌类化合物发生反应从而阻断黑变发生, 但亚硫酸盐类在使用过程中往往存在过量使用、残留超标的问题, 存在一定的安全隐患。

4-HR 表现出很好的 PO 抑制效果, 南极磷虾和鹰爪糙对虾 PO 经 4-HR 处理后, 相对酶活力仅有 30.16% 和 19.75%。4-HR 可竞争性抑制 PO, 有效防止黑色素的形成(周宇芳等, 2019)。我国曾在 20 世纪 90 年代引进了美国瑞辉公司的“虾鲜宝”产品(殷邦忠等, 1994), 该产品的主要有效成份即 4-HR, 但 4-HR 成本相对较高, 限制了其大范围应用推广。

L-半胱氨酸和抗坏血酸也表现出较好的 PO 活力抑制效果。抗坏血酸是一种强还原剂, 可阻止底物被氧化成醌类以及醌类进一步聚合成黑色素, 从而抑制黑变。L-半胱氨酸则直接与酶促反应的中间产物-醌类化合物结合生成无色的硫氢化合物(Soottawat *et al.*, 2006), 从而阻断黑变的发生。这 2 种化合物均对人体无毒副作用, 在食品安全方面更符合要求。

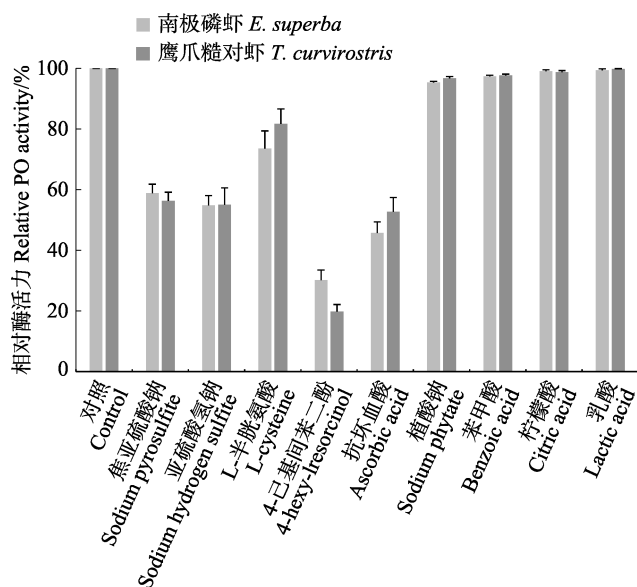


图 3 化学试剂对南极磷虾与鹰爪糙对虾 PO 活力的影响
Fig.3 Effects of chemical reagents on the PO activity of *E. superba* and *T. curvirostris*

3 结论

冷藏条件下南极磷虾与鹰爪糙对虾黑变情况差异较大, 南极磷虾黑变更为迅速, 这可能与其生存环境有关, 经过长期的自然选择, 南极磷虾更能适应低温环境, 所以其 PO 在低温条件下仍保持较高的活力。南极磷虾和鹰爪糙对虾 PO 的最适温度分别为 30℃、40℃, 最适 pH 均在 6.0~7.0 范围内, 酸性环境能较好地抑制其酶活, 因此, 在 2 种虾的运输、保存过程中, 可选择添加一些酸性物质来达到延长其保鲜期的目的。焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、4-HR、L-半胱氨酸和抗坏血酸均表现出较好的 PO 活力抑制效果, 适宜用来配制虾类防黑变保鲜剂。

参 考 文 献

- Bao JW, Li Y, Weng L, *et al.* Purification and characterization of polyphenol oxidase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Jimei University (Natural Science), 2019, 24(2): 100-109 [鲍俊旺, 李越, 翁凌, 等. 凡纳滨对虾多酚氧化酶的纯化及性质分析. 集美大学学报(自然科学版), 2019, 24(2): 100-109]
- Begoña G, Óscar MA, Pilar M, *et al.* Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(8): 1240-1245
- Cao R, Yu YK, Zhao L, *et al.* Study on the protein autolysis process of Antarctic krill (*Euphausia superba*) and its influencing factors. Progress in Fishery Sciences, 2018a, 39(6): 114-118 [曹荣, 余奕珂, 赵玲, 等. 南极磷虾(*Euphausia superba*)起捕后蛋白自溶进程及其影响因素. 渔业科学进展, 2018a, 39(6): 114-118]
- Cao R, Zhao L, Sun HH, *et al.* Nutritional characteristics and umami assessment of *Euphausia superba* and *Exopalaemon carinicauda*. Food Science, 2018b, 39(4): 149-153 [曹荣, 赵玲, 孙慧慧, 等. 南极磷虾(*Euphausia superba*)与脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)营养学特征分析及鲜味评价. 食品科学, 2018b, 39(4): 149-153]
- Chen YX, Chen X, Wang F, *et al.* Study on the basic enzymatic properties of protease in crude enzyme of Antarctic krill and the development of inhibitors. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 152-157 [陈怡炫, 陈昕, 王芳, 等. 南极磷虾粗酶液中蛋白酶的基础酶学性质研究及抑制剂的开发. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 152-157]
- Chen ZX, Wang ZY, Ouyang J. Development of technology for Antarctic krill fishing and processing equipment in China. Strategic Study of CAE, 2019, 21(6): 48-52 [谌志新, 王志勇, 欧阳杰. 我国南极磷虾捕捞与加工装备科技发展研究. 中国工程科学, 2019, 21(6): 48-52]

- Fan TJ, Wang XF. Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(5): 589–594 [樊廷俊, 汪小锋. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质. *生物化学与生物物理学报(英文版)*, 2002, 34(5): 589–594]
- Ferrer OJ, Otwell WS, Marshall MR. Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase. *Journal of Food Science*, 1989, 54(2): 478–480
- Friedman M. Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 631–653
- Huang HL, Chen XZ, Liu J, *et al.* Analysis of the status and trend of the Antarctic krill fishery. *Chinese Journal of Polar Research*, 2015(1): 25–30 [黄洪亮, 陈雪忠, 刘健, 等. 南极磷虾渔业近况与趋势分析. *极地研究*, 2015(1): 25–30]
- Jang MS, Sanada A, Ushio H, *et al.* Inhibitory effect of enokitake extract on melanosis of shrimp. *Fisheries Science*, 2003, 69(2): 379–384
- José-Pablo Z, Oscar M, Pilar M, *et al.* Characterization and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry*, 2009, 112: 104–111
- Li XL, Cai YQ, Qian BL, *et al.* Investigation on standard of sulfite used in crabs and shrimps. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2012, 2(1): 29–35 [李小蕾, 蔡友琼, 钱蓓蕾, 等. 亚硫酸盐用于虾蟹类保鲜剂的限量探讨. *中国渔业质量与标准*, 2012, 2(1): 29–35]
- Li YC, Zhu GP, Meng T, *et al.* Observation on the temperature tolerance of Antarctic krill under artificial conditions. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012(9): 216–218 [李莹春, 朱国平, 孟涛, 等. 人工条件下南极磷虾的温度耐受性试验观察. *江苏农业科学*, 2012(9): 216–218]
- Nalan G, Pinar Y. Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43(6): 1004–1008
- Nie YC, Zhang B, Zhao XY, *et al.* Seasonal variation in lipids and protein content of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 1–7 [聂玉晨, 张波, 赵宪勇, 等. 南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 1–7]
- Nilesh PN, Soottawat B. Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3578–3586
- Nilesh PN, Soottawat B. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44(4): 924–932
- Rolle RS, Guizani N, Chen JS, *et al.* Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Biochemistry*, 1991, 15: 17–32
- Simpson BK, Marshall MR, Otwell WS. Phenoloxidase from pink and white shrimp: Kinetic and other properties. *Journal of Food Biochemistry*, 1998, 12(3): 205–217
- Soottawat B, Wonnop V, Munehiko T. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Biochemistry*, 2005, 29(5): 470–485
- Soottawat B, Wonnop V, Tanaka M. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chemistry*, 2006, 98(1): 158–163
- Wang XF, Fan TJ. Some biochemical specificity studies of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. *Marine Sciences*, 2003, 27(4): 71–75 [汪小锋, 樊廷俊. 中国对虾酚氧化酶的部分生物化学特性的初步研究. *海洋科学*, 2003, 27(4): 71–75]
- Yin BZ, Yao J, Xu MQ. On using everfresh to prevent occurrence of blackspots on the shell of *Trachypenaeus curvirostris*. *Shandong Fisheries*, 1994, 11(6): 33–34 [殷邦忠, 姚建, 徐明起. “虾鲜宝”对鹰爪虾的防黑变试验. *齐鲁渔业*, 1994, 11(6): 33–34]
- Zhang SD, Song AQ. Talons shrimp and its fishery. *Bulletin of Biology*, 1992, 11: 12–14 [张树德, 宋爱勤. 鹰爪虾及其渔业. *生物学通报*, 1992, 11: 12–14]
- Zhao J, Qi XY, You YM, *et al.* Study on some characteristics of phenoloxidase from Japanese prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1997, 6(3): 157–165 [赵娇, 戚晓玉, 尤瑜敏, 等. 日本对虾的酚氧化酶特性研究. *上海水产大学学报*, 1997, 6(3): 157–165]
- Zhou YF, Hu JK, Hao YB, *et al.* Kinetic analysis of the inhibitory effect of 4-hexylresorcinol and ascorbic acid on polyphenoloxidase from *Solenocera crassicornis*. *Food Science*, 2019, 40(4): 69–74 [周宇芳, 胡建坤, 郝云彬, 等. 4-HR与抗坏血酸对中华管鞭虾多酚氧化酶的抑制动力学模拟分析. *食品科学*, 2019, 40(4): 69–74]

Comparative Analysis of the Biochemical Properties of Phenoloxidase Isolated from *Euphausia superba* and *Trachypenaeus curvirostris*

LIN Ruihuan^{1,2}, ZHAO Ling², CAO Rong^{2,3①}, LIU Qi²

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090;

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

3. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract Melanosis is a prominent problem in the transportation and storage of Antarctic krill. In order to explore the similarities and differences in the process of melanosis between Antarctic krill and common sea shrimps, *Euphausia superba* and *Trachypenaeus curvirostris* were selected as research objects. A sensory evaluation of the melanosis process of the two shrimps during storage at (2±1)°C were observed. The phenoloxidase (PO) was extracted and purified from the two species, the biochemical properties of which were further examined and compared. The results showed that the black spot formation was more serious in Antarctic krill under cold conditions at 24 h, and large areas of black spots were concentrated in the cephalothorax, abdominal shell, and tail of Antarctic krill. For *T. curvirostris*, slight black spots were observed in the cephalothorax and tail after 72 h, and then gradually spread to the whole body. The crude PO solutions of the two shrimp species were purified using ammonium sulfate and filtered through Sephadex G-100 gel. The purification fold of the PO solutions of *T. curvirostris* and *E. superba* reached 17.22 and 19.67, respectively. The optimum PO temperature was 30°C for *E. superba* and 40°C for *T. curvirostris*, respectively. The PO activity of Antarctic krill was higher at low temperatures and that of sea catch shrimp was higher at high temperatures. The optimum pH was between 6.0 and 7.0 for both species. Sodium metabisulfite, sodium bisulfite, 4-HR, L-cysteine, and ascorbic acid can all effectively inhibit the PO activity of the two shrimp species. Among these chemical reagents, 4-HR showed the best inhibitory effect on PO activity. The findings in this paper may provide a basis for the quality control during cold chain logistics of Antarctic krill, and also provide a reference for effectively suppressing melanosis in shrimps after death.

Key words Melanosis; *Euphausia superba*; *Trachypenaeus curvirostris*; Phenoloxidase

① Corresponding author: CAO Rong, E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200220002

http://www.yykxjz.cn/

霍恩泽, 张雯雯, 李加琦, 丁敬坤, 薛素燕, 王英朴, 于文涵, 侯兴, 蒋增杰, 方建光, 毛玉泽. 盐度骤降对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 132-138

Huo EZ, Zhang WW, Li JQ, Ding JK, Xue SY, Wang YP, Yu WH, Hou X, Jiang ZJ, Fang JG, Mao YZ. Effects of acute salinity changes on energy budgets of oysters *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea gigas*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 132-138

盐度骤降对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响*

霍恩泽^{1,2,3} 张雯雯^{1,2,3} 李加琦^{2,3} 丁敬坤^{1,2,3} 薛素燕^{2,3}
王英朴² 于文涵^{1,2,3} 侯兴^{1,2} 蒋增杰² 方建光² 毛玉泽^{2,3①}

(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 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071)

摘要 采用实验生态学方法,研究了盐度骤降(盐度分别为 10、20,自然海水为对照组)对近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)生理代谢的影响。结果显示,盐度骤降对长牡蛎和近江牡蛎的耗氧率(OR)、排氨率(NR)、排粪率(FER)均有显著影响($P < 0.05$),且 2 种牡蛎对盐度骤降的响应存在差异。长牡蛎的耗氧率、排氨率、摄食率(IR)和排粪率均在自然海水中最高,低盐对长牡蛎产生不同程度的胁迫。而近江牡蛎在盐度为 20 时的上述指标显著高于其他盐度处理组。通过测定不同规格牡蛎的代谢率,建立 2 种牡蛎在不同盐度下的代谢率与规格(湿重)的回归方程,该方程符合幂指数: $Y = aW^b$ 。通过归一化处理,比较湿重在 20 g 时,2 种牡蛎的能量分配差异。盐度为 20 时,近江牡蛎的呼吸代谢较强(呼吸能占 16.1%),而长牡蛎在自然海水中呼吸代谢较强(呼吸能占 7.8%),2 种牡蛎的呼吸代谢均在盐度为 10 时较低,其中,长牡蛎呼吸能仅占 0.7%。研究表明,盐度骤降对长牡蛎的影响大于近江牡蛎,小幅度的盐度骤降对近江牡蛎的能量代谢有一定的促进作用。本研究从能量代谢角度,探讨了近江牡蛎和长牡蛎对盐度骤变的响应,可为牡蛎礁修复工作和养殖生产过程中的品种选择提供参考。

关键词 盐度;长牡蛎;近江牡蛎;能量收支

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0132-07

牡蛎礁被誉为温带地区的“珊瑚礁”,在净化水体、提供鱼类生境及维持生物多样性等方面均具有重要的生态功能。近几十年来,过度捕捞、环境污染、围海造地和病害浸染使世界温带河口和滨海区野生牡蛎资源量急剧下降,牡蛎礁生境遭到破坏,面积减

小或丧失(Beck *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2001),牡蛎礁生态修复已经成为海洋生态系统保护和恢复的研究热点。除此之外,地表径流激增引发的河口区海水盐度骤降,严重威胁区域内牡蛎等贝类的养殖及牡蛎礁修复。2018~2019 年,降雨和地表径流对山东省淮

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2019YFD0900803)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD50)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022020001; 20603022020012)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Project (2019YFD0900803), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD50), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020001; 20603022020012)]. 霍恩泽, E-mail: 2262170688@qq.com

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

收稿日期: 2020-02-20, 收修改稿日期: 2020-03-16

坊小清河口区牡蛎产生重要影响, 在降水密集、盐度降低幅度大的月份, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的死亡率高于近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)。

长牡蛎俗称太平洋牡蛎, 是一种广温、广盐性双壳贝类, 是我国沿海地区的重要养殖经济贝类。近江牡蛎广泛分布于我国沿海(北自中朝边界的蜆子江, 南至海南岛), 是我国河口区牡蛎礁的核心种, 曾一度认为在我国北方濒临功能性灭绝。牡蛎具有超强的过滤功能, 被称为海洋工程师, 在沿岸带生态保护和修复中具有重要功能。贝类的生物能量学与其呼吸、代谢、滤食和摄食等生命活动密切相关, 滤水、摄食和呼吸代谢受水温、饵料浓度等多种环境因子的影响, 是反映滤食性贝类生理状况的重要指标, 也是评估贝类养殖容量的必要参数(包杰等, 2013; Mao *et al.*, 2006)。盐度是影响滤食性贝类摄食和代谢的一个重要环境因子, 低盐会影响牡蛎的正常生理代谢包括摄食、免疫活性及生长, 甚至引起大规模死亡(宫建文等, 2019)。本研究从能量代谢角度, 探讨了近江牡蛎和长牡蛎对盐度骤变的响应机制, 旨在为牡蛎礁修复和养殖生产过程中的品种选择提供参考。

表 1 2 种牡蛎的生物学数据

Tab.1 Biological parameters of two species of oyster

种类 Species	壳高 Shell height (mm)	壳长 Shell length (mm)	壳宽 Shell width (mm)	总湿重 Wet weight (g)	软体部湿重 Wet body weight (g)	软体部干重 Dry weight of soft tissue (g)
近江牡蛎 <i>C. ariakensis</i>	33.1~89.9	20.74~60.9	8.2~54.8	3.0~57.3	0.24~9.03	0.01~1.46
长牡蛎 <i>C. gigas</i>	32.8~95.0	19.45~65.9	8.6~30.4	4.0~49.4	0.27~12.11	0.05~2.07

1.3 耗氧率和排氨率测定

随机选取状态良好的 3 只牡蛎放入 400 ml 的呼吸瓶中, 流水保持水体中溶解氧(DO)充足, 待牡蛎壳张开时即盖上呼吸瓶的盖子, 实验持续 2 h。每组实验中呼吸瓶的水环境与上述盐度设置的水环境相同, 以不加牡蛎的呼吸瓶作为对照, 每个盐度处理组设 3 个平行, 3 个对照。测定实验前后呼吸瓶中溶解氧和氨氮(NH₄⁺-N)的浓度, DO 使用溶氧仪(德国, PreSens, OXY-4mini)测定, NH₄⁺-N 采用次溴酸盐氧化法测定。根据始末 DO 和 NH₄⁺-N 浓度的变化计算耗氧率(Oxygen consumption rate, OR, mg/h)和排氨率(Ammonia excretion rate, NR, μmol/h)。实验结束后, 用游标卡尺测量牡蛎的规格(壳长、壳高和壳宽), 称量湿重, 后用解剖刀将软组织与壳分开, 测其软体部湿重, 并在 60℃烘箱烘干 48 h 后称软组织干重。按以下方法计算耗氧率和排氨率:

$$OR=(DO_0-DO_t) \times V/t$$

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用牡蛎为 2 龄贝, 生物学参数见表 1。长牡蛎取自桑沟湾牡蛎养殖区, 近江牡蛎于 2018 年在山东省莱州湾海域人工育苗养殖获得。2019 年 6 月采集 2 种牡蛎, 经分离、清洁壳表面污物和附着物后, 放置在桑沟湾楮岛实验基地所属养殖区暂养。实验前 7 d, 取回 2 种牡蛎, 置于室内水族箱中微流水暂养, 暂养水温为(21.5±0.3)℃, 海水盐度为 29.0±0.1。

1.2 实验设计

2018~2019 年, 在莱州湾小清河口区, 牡蛎礁恢复工作中监测到降雨和上游河水注入, 使该区域盐度骤降到 10 甚至更低, 致使长牡蛎大量死亡。本研究根据盐度的降低情况, 设计了 2 个低盐度梯度, 分别为 10 和 20, 自然海水作为对照组(盐度约为 29), 利用淡水和自然海水不同配比调至所需盐度, 使用流水装置开展实验, 随机挑选不同规格的近江牡蛎和长牡蛎若干。

式中, OR 为归一化后(20 g)的耗氧率, DO₀ 和 DO_t 分别为实验开始和结束时实验水中 DO 的含量(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), t 为实验持续时间(h)。

$$NR=(N_0-N_t) \times V/t$$

式中, NR 为归一化后(20 g)排氨率, N₀ 和 N_t 分别为空白组与实验组的 NH₄⁺-N 浓度(μmol/L)。

氧氮比(O : N)指呼吸消耗氧原子数与排出氨态氮原子数之比, 按下式计算:

$$O : N=(OR/16 \times 1000)/NR$$

1.4 摄食率和排粪率测定

采用流水装置进行滤水实验(王晓芹等, 2019)。根据生物沉积法测定滤食性动物滤水率(周毅等, 2002), 每种牡蛎每个盐度处理设置 3 个平行, 每个平行放入 3 只牡蛎, 自然海水作为对照(3 个平行), 实验在 50 L 流水槽中进行, 实验时间为 24 h, 实验结束后, 收集粪便, 分离假粪。测定实验前后水体和粪便中的总颗粒物浓度(PIM)和颗粒有机物(POM)浓

度, 计算无机颗粒物浓度:

$$PIM=TPM-POM$$

POM 和 TPM 采用 GF/C 膜过滤, 采用灼烧法测定, 详见海洋监测规范(GB 17378-2007)。

$$IFR=IBD \quad (1)$$

$$CR=IFR/PIM=IBD/PIM \quad (2)$$

$$FR=CR \times TPM=IBD \times TPM/PIM \quad (3)$$

式中, IFR 和 IBD 为贝类对海水中无机物的过滤速率和生物沉积速率, CR (Clearance rate)和 FR (Filtration rate)分别为滤水率和滤食率。当颗粒物浓度很高以致引起假粪产生时, 摄食率需减去假粪的排出速率。

1.5 能量代谢测定

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。 C 、 R 、 U 和 F 分别通过食物中 POM、呼吸率、排泄率和粪便中 POM 计算, 采用的能量转换因子为 $1 \text{ mg POM}=20.78 \text{ J}$ 、 $1 \text{ mg O}_2=14.24 \text{ J}$ 、 $1 \mu\text{mol 氨氮}=0.34 \text{ J}$, 生长能通过上式计算。

1.6 代谢率的归一化处理

由于近江牡蛎和长牡蛎成体个体差异较大, 为比较 2 种牡蛎对盐度骤降胁迫的差异响应, 对 2 种牡蛎的代谢率进行归一化处理。测定不同盐度梯度下, 不同规格的长牡蛎和近江牡蛎单位个体代谢指标(耗氧率、排氨率、排粪率和摄食率), 建立各代谢指标与牡蛎总湿重的相关方程, 方程符合幂指数函数:

$$Y=aW^b$$

式中, Y 为代谢速率; W 为湿重; a 和 b 为系数。

对 2 种牡蛎的规格实验进行统计比较, 选择湿重为 20 g 时进行归一化处理, 计算 2 种牡蛎在湿重为 20 g 时的代谢率指标, 并通过能量转换因子和贝类能量收支方程计算呼吸能、排泄能、排粪能和生长能(见 1.5), 建立不同盐度的能量收支方程。

1.7 数据分析

使用 Excel 2013 和 SPSS 18.0 软件进行数据分析和作图, 实验结果采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 采用单因素方差(One-way ANOVA)进行数据分析, 以 $P<0.05$ 为不同处理组间差异显著。

2 结果

2.1 代谢率与体重(湿重)的相关方程

2 种牡蛎的摄食率、耗氧率、排氨率、排粪率与总湿重相关, 且符合幂指数关系: $Y=aW^b$, 相关系数见表 2。从表 2 可以看出, 2 种牡蛎的系数 b 都小于

1, 近江牡蛎的系数 b 范围为 $0.3669\sim 0.9369$, 长牡蛎的系数 b 范围为 $0.1954\sim 0.9641$ 。

表 2 不同盐度下 2 种牡蛎代谢率与湿重关系
Tab.2 Allometric relationships of metabolic rate to wet weight of two oysters under different salinity

代谢率 Metabolic rate	盐度 Salinity	近江牡蛎 <i>C. ariakensis</i>		长牡蛎 <i>C. gigas</i>	
		a	b	a	b
摄食率 Ingestion rate (mg/h)	10	0.2715	0.3681	0.4648	0.1954
	20	0.2149	0.7278	0.3607	0.3520
	对照组 Control	0.1590	0.8564	0.2916	0.4550
耗氧率 Oxygen consumption rate (mg/h)	10	0.0112	0.5750	0.0009	0.7417
	20	0.0242	0.7858	0.0048	0.8458
	对照组 Control	0.0076	0.8154	0.0123	0.7883
排氨率 Ammonia excretion rate ($\mu\text{mol/h}$)	10	0.2789	0.5724	0.3899	0.6857
	20	0.3733	0.8797	0.2521	0.8714
	对照组 Control	0.2907	0.8218	0.9878	0.4827
排粪率 Feces production rate (mg/h)	10	0.1235	0.3669	0.2750	0.9641
	20	0.6524	0.3940	0.2688	0.2847
	对照组 Control	0.0740	0.9369	0.3439	0.2953

2.2 不同盐度对近江牡蛎和长牡蛎呼吸代谢的影响

根据湿重和耗氧率的相关方程对 2 种牡蛎的耗氧率进行归一化处理, 计算湿重为 20 g 时, 2 种牡蛎的耗氧率(图 1)。从图 1 可以看出, 盐度对近江牡蛎和长牡蛎的耗氧率均有显著影响($P<0.05$)。长牡蛎的耗氧率在盐度为 10 时最低, 为 0.008 mg/h , 对照组的

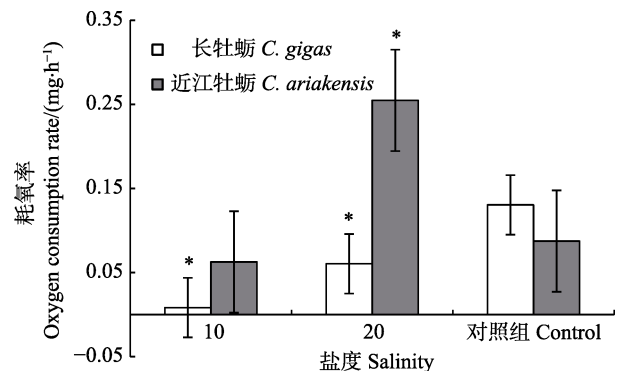


图 1 不同盐度对牡蛎耗氧率的影响

Fig.1 Effects of salinity on oxygen consumption rate of oysters

*为同一种牡蛎不同盐度处理组与对照组之间差异显著($P<0.05$), 下同
* represents significant difference between treatment groups and control group ($P<0.05$), the same as below

耗氧率最高, 为 0.13 mg/h。而近江牡蛎的耗氧率在盐度为 20 时最高, 为 0.25 mg/h。

盐度对近江牡蛎和长牡蛎排氨率的影响差异显著($P < 0.05$), 在盐度为 10 和 20 时, 长牡蛎排氨率较低, 在对照组中, 排氨率达到最大值, 为 4.19 $\mu\text{mol/h}$ 。而近江牡蛎的排氨率在盐度为 20 时最高, 为 3.98 $\mu\text{mol/h}$ (图 2)。

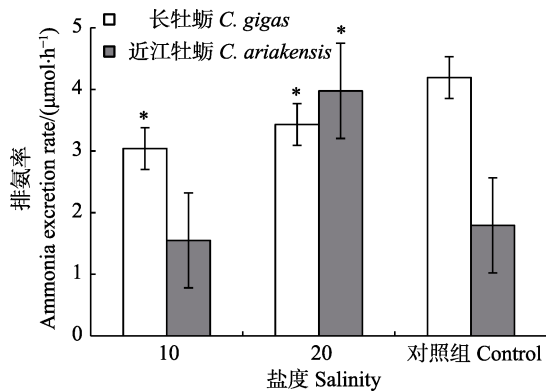


图 2 不同盐度对牡蛎排氨率的影响

Fig.2 Effects of salinity on ammonia excretion rates of oysters

2.3 不同盐度对近江牡蛎和长牡蛎氧氮比(O:N)的影响

长牡蛎呼吸排泄的 O : N 值波动范围为 5.5~9.4 (图 3), O : N 值在盐度为 10 和 20 时相近且低于对照组; 而近江牡蛎不同盐度之间的 O : N 值均有显著差异($P < 0.05$), 在盐度为 20 时, 近江牡蛎的 O : N 值最大, 为 24.2。

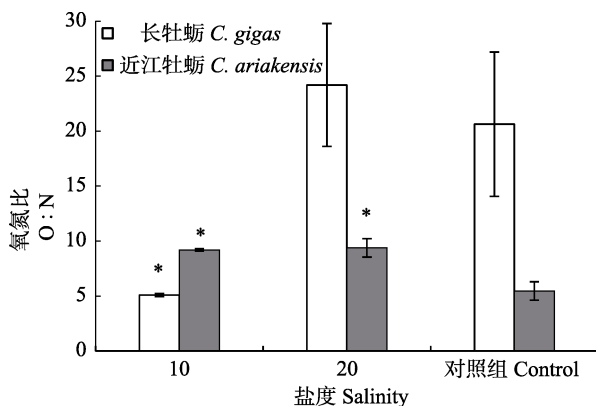


图 3 不同盐度对牡蛎 O : N 的影响

Fig.3 Effects of salinity on O:N of oysters

2.4 不同盐度对近江牡蛎和长牡蛎摄食率、排粪率的影响

盐度对长牡蛎的摄食率和排粪率均具有显著影响($P < 0.05$), 近江牡蛎在盐度为 10 和 20 时, 摄食率

无显著差异($P > 0.05$)。长牡蛎在盐度为 10 和 20 时, 摄食率和排粪率均低于对照组, 而近江牡蛎的摄食率和排粪率在盐度为 20 时最高, 分别为 1.90 和 0.73 mg/h (图 4 和图 5)。

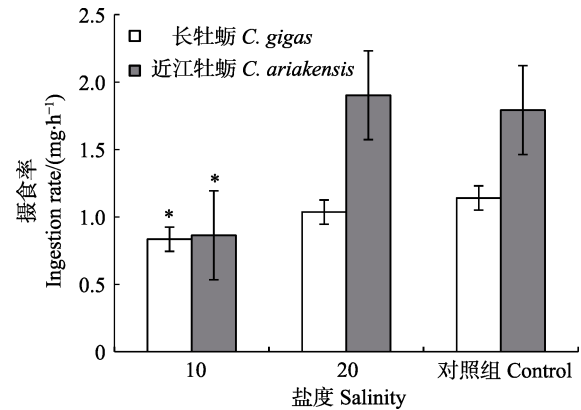


图 4 不同盐度对牡蛎摄食率的影响

Fig.4 Effects of salinity on ingestion rates of oysters

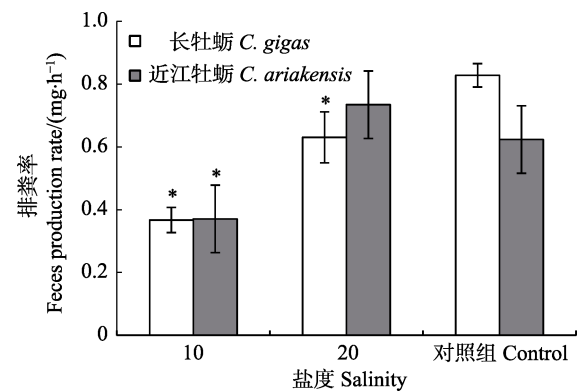


图 5 不同盐度对牡蛎排粪率的影响

Fig.5 Effects of salinity on feces production rate of oysters

2.5 不同盐度对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响

长牡蛎在盐度为 10 时摄食能最低, 为 0.37 J/(g·h), 而近江牡蛎在盐度为 20 时摄食能最高, 为 1.97 J/(g·h), 且近江牡蛎在盐度为 20 时, 呼吸能、排泄能、排粪能及生长余能均达到最大。长牡蛎和近江牡蛎在响应盐度骤降胁迫时, 二者的能量收支差异明显(表 3)。

3 讨论

贝类的摄食和代谢受多种环境因子的影响, 盐度是决定海洋贝类分布并影响其生理代谢的重要环境因子之一(陈丽梅等, 2007)。这是因为贝类属于变渗透压动物, 当盐度发生变化时, 需要消耗大量能量用于维持渗透压平衡, 能量分配也发生变化(杜美荣等, 2007)。盐度主要通过影响海洋贝类的胞内等渗透调节、新陈代谢、消化吸收效率、免疫能力等控制个体的生

表 3 不同盐度下长牡蛎和近江牡蛎的能量收支方程
Tab.3 Energy budget equation of two species of oyster under different salinities

盐度 Salinity	物种 Species	能量收支方程 Energy budget equation
10	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	$100C=0.68R+7.50U+43.98F+47.84G$
	近江牡蛎 <i>C. ariakensis</i>	$100C=4.98R+2.94U+42.95F+49.13G$
20	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	$100C=6.50R+2.01U+51.13F+40.36G$
	近江牡蛎 <i>C. ariakensis</i>	$100C=16.09R+3.42U+43.96F+36.53G$
对照组 Control	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	$100C=7.85R+1.25U+49.52F+41.38G$
	近江牡蛎 <i>C. ariakensis</i>	$100C=6.68R+5.80U+50.54F+36.98G$

长、发育、数量消长和分布等(许岚等, 2017)。

3.1 不同盐度下近江牡蛎和长牡蛎归一化处理系数的变化

动物的体型关系通常符合异速生长模型, 一般符合幂指数方程: $Y=aW^b$, 其中, 系数 a 和 b 是由方程两边分别取对数, 再进行线性回归计算, 系数 b 被称为功能常数, 系数 a 指单位体重的代谢速率, 与种类有关。最重要的体型关系是呼吸作用, 即耗氧量或 CO_2 产量, 其中, 单细胞生物的系数 b 约为 0.66, 恒温动物约为 0.88, 变温动物约为 0.69(Kooijman, 1986)。本研究中, 2 种牡蛎的摄食率、耗氧率、排氨率、排粪率与总湿重的关系均可用幂函数式 $Y=aW^b$ 表示, 与 Bayne 等(1976、1973)的研究结果相一致, 系数 b 的范围一般为 0.40~0.75。本研究中, 近江牡蛎在不同盐度下, b 值的变化在 0.3669~0.9369 之间, 长牡蛎在不同盐度下 b 值的变化在 0.1954~0.9641 之间。长牡蛎在盐度为 10 时, 摄食率 b 值最低, 可能与长牡蛎在低盐条件下贝壳出现部分或全部关闭现象有关(Djangmah *et al.*, 1979), 导致单位体重摄食率较低。

3.2 盐度对近江牡蛎和长牡蛎能量代谢的影响

盐度是影响贝类生理代谢及其分布规律的环境因子之一。研究表明, 盐度通过影响贝类鳃纤毛运动(Berger *et al.*, 1997)、心脏跳动、附着力等生理代谢, 进而导致贝类选择性分布。不同贝类对盐度的变化具有一定的适应范围, 过高或过低的盐度都将影响贝类的正常代谢(吕昊泽等, 2016)。

本研究中, 长牡蛎与近江牡蛎对盐度的适应范围不同, 长牡蛎在自然海水中(盐度约为 29)的代谢率相对较高, 而近江牡蛎在盐度为 20 时的代谢率相对较高, 研究结果与姚托等(2015)对 2 种牡蛎稚贝生长的研究结果一致。以耗氧率为例, 在自然海水中, 长牡蛎耗氧率最大, 在盐度为 10 时最低, 与王芳等(2003)对长牡蛎的研究结果一致。在盐度为 15~35 范围内, 长牡蛎耗氧率随盐度的升高而增大, 其原因可能是因为低盐度条件下, 贝壳会出现部分或全部关闭现象

(Djangmah *et al.*, 1979)。本研究也观察到长牡蛎在盐度为 10 时, 出现闭壳和个别个体死亡现象, 可能无法迅速适应骤降的低盐环境, 导致代谢紊乱, 甚至死亡, 其主要原因是盐度骤变引起海水渗透压的改变超出了贝类自身调节能力所致(刘志刚等, 2006)。

O : N 值的大小反映了动物特定状态下机体脂肪和糖类与蛋白质分解代谢的比率, 可作为机体适应环境压力的指标(焦海峰等, 2017)。当机体以蛋白质代谢为主要供能方式时, 其代谢产物以氨的形式释放, O : N 值较低; 如果由脂肪和碳水化合物供能, O : N 值约为 24。本研究中, 盐度为 20 时, 对照组中长牡蛎 O : N 值较高, 盐度降低时, O : N 值下降, 这表明在低盐环境下, 长牡蛎蛋白质代谢比例增大。近江牡蛎在各盐度处理组的 O : N 值都低于长牡蛎, 可能是归一化引起的个体差异, 但相对于低盐度, 其在高盐度下 O : N 值更低。

盐度骤降对近江牡蛎影响的研究相对较少, 主要涉及到个体免疫(Xu *et al.*, 2012)、敌害生物、生态毒理和倍性等, 也有少数研究涉及到其生理特性(Audemard *et al.*, 2008)。本研究中, 近江牡蛎的代谢率在盐度为 20 时较高, 说明该盐度是近江牡蛎较适宜的盐度, 这与姚托等(2015)的研究结果相一致, 表明近江牡蛎的最适盐度范围为 10~25。

本研究在模拟现场条件下, 建立了 2 种牡蛎在不同盐度下的能量收支方程可以看出, 2 种牡蛎在不同盐度下的能量分配不同, 长牡蛎在低盐下呼吸能非常低, 说明受到盐度骤降的胁迫较大, 而近江牡蛎在低盐下的生长能相对较高。本研究采用生物沉积物法建立能量方程中的生长能相对于自然环境中较高, 可能由于自然海水中饵料浓度相对较低, 产生一定误差。但从能量代谢的角度分析, 长牡蛎在自然海水中代谢速率较高, 而近江牡蛎更能适应低盐环境。

参 考 文 献

Audemard C, Carnegie RB, Bishop MJ, *et al.* Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the

- Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 344–350
- Bao J, Jiang HB, Dong SL, *et al.* Comparison of oxygen consumption rate and ammonia-N excretion rate between green type and red type *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(11): 1689–1696 [包杰, 姜宏波, 董双林, 等. 红刺参和青刺参耗氧率与排氨率的比较研究. 水产学报, 2013, 37(11): 1689–1696]
- Bayne BL. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1973, 53(1): 39–58
- Bayne BL, Bayne CJ, Carefoot T, *et al.* The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad. 2. Adaptations to low oxygen tension and air exposure. Oecologia, 1976, 22(3): 229–250
- Beck MW, Brumbaugh RD, Airoidi L, *et al.* Oyster reefs at risk and recommendations for conservation, restoration, and management. Biology Science, 2011, 61(2): 107–116
- Berger VJ, Kharazova AD. Mechanisms of salinity adaptations in marine mollusc. Hydrobiologia, 1997, 355(1–3): 115–126
- Brett JR, Groves TD. Physiological energetics in fish physiology. New York: Academic Press, 1979, 279–352
- Chen LM, Ren YP, Xu BD. Effects of environmental factors on the clearance rate of the transplant enhanced Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Jiaozhou Bay. South China Fisheries Science, 2007, 3(2): 30–35 [陈丽梅, 任一平, 徐宾铎. 环境因子对胶州湾移植底播菲律宾蛤仔滤水率的影响. 南方水产, 2007, 3(2): 30–35]
- Djangmah JS, Shumway SE, Davenport J. Effects of fluctuating salinity on the behaviour of the West African blood clam *Anadara senilis* and on the osmotic pressure and ionic concentrations of the haemolymph. Marine Biology, 1979, 50(3): 209–213
- Du MR, Fang JG, Ge CZ, *et al.* Effects of salinities and microalgae densities on filtration rates of scallop *Chlamys farreri* spats. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(3): 74–78 [杜美荣, 方建光, 葛长宇, 等. 盐度和饵料密度对栉孔扇贝稚贝滤水率的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 74–78]
- Gong JW, Li Q, Yu H, *et al.* Screening and validation of internal reference genes by quantitative PCR under normal and low salt stress in rock oyster. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 26(4): 657–663 [宫建文, 李琪, 于红, 等. 岩牡蛎正常和低盐胁迫下定量 PCR 内参基因的筛选与验证. 中国水产科学, 2019, 26(4): 657–663]
- Ikeda T. Nutritional ecology of marine zooplankton. Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 1974, 22(1): 1–97
- Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, *et al.* Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. Science, 2001, 293(5530): 629–637
- 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]
- Kooijman SALM. Energy budgets can explain body size relations. Journal of Theoretical Biology, 1986, 121(3): 269–282
- Liu JY, Yu DH, Li JB. Effects of salinity and pH on oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Pinctada fucata*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(4): 603–607 [刘建业, 喻达辉, 李金碧. 盐度和 pH 对合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)耗氧率和排氨率的影响. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 603–607]
- Liu Y, Shi KT, Zhang SH, *et al.* Advancement of respiratory metabolism study in bivalve molluscs. South China Fisheries Science, 2007, 3(4): 65–69 [刘勇, 施坤涛, 张少华, 等. 贝类呼吸代谢的研究进展. 南方水产, 2007, 3(4): 65–69]
- Lü HZ, Liu J, Chen JH, *et al.* Effects of salinity on the filtration rate, feeding rate and assimilation rate of three filter feeding shellfish in the Changjiang estuary. Marine Sciences, 2016, 40(8): 10–17 [吕昊泽, 刘健, 陈锦辉, 等. 盐度对长江口 3 种滤食性贝类滤水率、摄食率、同化率的影响. 海洋科学, 2016, 40(8): 10–17]
- Liu ZG, Liu JY, Wang H, *et al.* Study on salinity adaptability of juvenile scallops in Gulf of Mexico. Journal of Zhanjiang Ocean University (Natural Science), 2006, 26(6): 12–16 [刘志刚, 刘建勇, 王辉, 等. 墨西哥湾扇贝稚贝盐度适应性的研究. 湛江海洋大学学报(自然科学版), 2006, 26(6): 12–16]
- Mao YZ, Zhou Y, Yang HS, *et al.* Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. Aquaculture, 2006, 253(1–4): 322–333
- Mayzaud P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. IV. The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. Marine Biology, 1976, 37(1): 47–58
- Wang F, Dong SL, Zhang S, *et al.* Experimental studies on feeding selectivity and the filter-feeding rate of *Argopecten irradians* and *Crassostrea gigas*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2000, 31(2): 139–144 [王芳, 董双林, 张硕, 等. 海湾扇贝和太平洋牡蛎的食物选择性及滤除率的实验研究. 海洋与湖沼, 2000, 31(2): 139–144]
- Wang F, Wang ZP, Dong SL, *et al.* Marine sciences effects of salinity on respiration and excretion of diploid and triploid oysters *Crassostrea gigas*. Marine Science, 2003, 27(6): 73–76 [王芳, 王昭萍, 董双林, 等. 盐度对二倍体和三倍体长牡蛎呼吸和排泄的影响. 海洋科学, 2003, 27(6): 73–76]
- Wang XQ, Wu YL, Fang JH, *et al.* Effects of acidification stress on the energy distribution of *Mytilus galloprovincialis*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 21–30 [王晓芹, 吴亚林, 房景辉, 等. 海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 21–30]
- Yao T, Wang ZP, Yan XW, *et al.* Effect of salinity on growth and survival of *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis* and juvenile hybrids. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1581–1586 [姚托, 王昭萍, 闫喜武, 等. 盐度对长牡蛎和近江牡蛎及其杂交稚贝生长和存活的影响. 生态学报, 2015, 35(5): 1581–1586]

- Xu L, Li Q, Kong LF, *et al.* Effects of temperature and salinity on the growth and survival of larva of *Crassostrea gigas*. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2017, 47(8): 44–50 [许岚, 李琪, 孔令锋, 等. 温度和盐度对壳黑长牡蛎幼虫生长和存活的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(8): 44–50]
- Xu T, Xie J, Li J, *et al.* Identification of expressed genes in cDNA library of hemocytes from the RLO-challenged oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould with special functional implication of three complement-related fragments (CaC1q1, CaC1q2 and CaC3). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32: 1106–1116
- Yang XX, Lin XT, Ji XL, *et al.* Influences of temperature, salinity and illumination on clearance rate of *Perna viridis* (Linnaeus). *Marine Sciences*, 2000, 24(6): 36–38 [杨晓新, 林小涛, 计新丽, 等. 温度、盐度和光照条件对翡翠贻贝清滤率的影响. *海洋科学*, 2000, 24(6): 36–38]
- Zhou Y, Mao YZ, Yang HS, *et al.* Biodeposition method used in bivalval physio-ecological studies. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(6): 74–76 [周毅, 毛玉泽, 杨红生, 等. 应用于贝类生理生态研究的生物沉积法. *生态学杂志*, 2002, 21(6): 74–76]

(编辑 陈 严)

Effects of Acute Salinity Changes on Energy Budgets of Oysters *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea gigas*

HUO Enze^{1,2,3}, ZHANG Wenwen^{1,2,3}, LI Jiaqi^{2,3}, DING Jingkun^{1,2,3}, XUE Suyan^{2,3}, WANG Yingpu², YU Wenhan^{1,2,3}, HOU Xing^{1,2}, JIANG Zengjie², FANG Jianguang², MAO Yuze^{2,3}^①

(1. College of Fisheries and Life Science, Ocean University of Shanghai, 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 of Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract The restoration of oyster reefs is a hot issue and has been attracting the attention of researchers worldwide. *Crassostrea gigas* and *C. ariakensis* are two important species that build up oyster reefs; however, the population dynamics of these two species in low-salinity estuaries are not the same. We used experimental ecology methods to study the effects of acute lowered salinity (10 and 20, with natural seawater about 29 as a control) on the variations in the physiological metabolism of *C. gigas* and *C. ariakensis*. The results showed that acute lowered-salinity incubation significantly affected the oxygen consumption rate, ammonia excretion rate, and feces production rate of these two oysters ($P < 0.05$), but the responses of these two species were also different. The highest oxygen consumption rate, ammonia excretion rate, feeding rate and feces production rate of *C. gigas* were found in the control group, which indicated that a decrease in salinity impacted the metabolism of this species. However, *C. ariakensis* showed better metabolic parameters at salinity 20 than that in the other two groups. To normalize the metabolic rate of oysters with a broad range of wet weights, a regression equation for the metabolic rate to wet weight was established: $Y=aW^b$. The wet weight (20 g) was used for the comparison after normalization. At salinity 20, the respiration rate of *C. ariakensis* was strong, and the respiration energy accounted for 16.1% of the total energy consumption, while *C. gigas* showed a stronger oxygen consumption rate in natural seawater (respiratory energy accounted for 7.8% of the total energy consumption), and a lower oxygen consumption rate at salinity 10 (respiratory energy accounted for 0.7% of the total energy consumption). Our results indicated that the acute lowered-salinity incubation had a more significant influence on *C. gigas* than *C. ariakensis*, and a low-level reduction in salinity can even promote the energy metabolism of *C. ariakensis*. From the perspective of energy metabolism, this study explored the response of *C. gigas* and *C. ariakensis* to acute reductions in salinities, and provided references for oyster reef restoration, selective breeding, and aquaculture.

Key words Salinity; *Crassostrea gigas*; *Crassostrea ariakensis*; Energy budget

① Corresponding author: MAO Yuze, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200109002

http://www.yykxjz.cn/

郑浩然, 陈修报, 刘洪波, 杨健. 背角无齿蚌稚蚌的生长和发育研究. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 139–146
Zheng HR, Chen XB, Liu HB, Yang J. Growth and development of the early juvenile *Anodonta woodiana*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 139–146

背角无齿蚌稚蚌的生长和发育研究*



郑浩然¹ 陈修报² 刘洪波² 杨健^{1,2①}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
中国水产科学研究院长江中下游渔业生态环境评价和资源养护重点实验室 无锡 214081)

摘要 背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)为具有食用、育珠、净水及生物监测等重要经济和生态价值的淡水双壳贝类。为把握其早期生活史过程中形态变化、器官发育和生长速率的特征,本研究对从脱落后第 1~30 天稚蚌期的个体开展了连续性、系统性的研究。结果显示,在稚蚌 1~30 d 的生长过程中,铰合部的前缘和后缘向上突起,壳顶相对向内收缩,前端生长迅速、向外侧扩展,后端向腹缘方向生长,而腹缘相对向后端生长。第 1 天,稚蚌出现了斧足;第 4 天,内脏团较为明显;第 10 天,鳃清晰可见,前、后闭壳肌已经形成;第 15 天,肠道和心脏清晰可见;第 20 天,进水管和出水管形成;第 25 天以后,稚蚌的器官已经全部发育完成。壳长、壳高和年龄之间呈指数型相关关系,壳长与壳高之间呈正异速生长关系。上述结果可为背角无齿蚌的人工繁育、种质资源保护和种群恢复以及有效开发、利用其为水污染监测专用指示生物等工作提供理论指导。

关键词 背角无齿蚌; 稚蚌; 形态; 器官; 生长; 指示生物

中图分类号 Q174 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0139-08

背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)是起源于我国黑龙江和长江流域的一种淡水双壳贝类(Demayo *et al.*, 2012)。其不仅具有食用、育珠等传统的水产经济价值,而且具有净水、监测水体污染等重要生态价值(Liu *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012; 孙珊等, 2017)。特别是该蚌已被筛选为“淡水贝类观察”研究体系的专用指示生物和模式动物(杨健等, 2005; 杨健, 2015),分别应用于水污染的被动监测(刘洪波等, 2009; Bian *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010)、主动监测(陈修报等, 2014; Chen *et al.*, 2019)和毒理学研究(陈修报等, 2017; Liu *et al.*, 2018)。值得注意的是,由于人类活动对水域生态环境的破坏,野生背角无齿蚌的资源量正急剧

减少(董志国等, 2004),因此,迫切需要有效的人工繁养增殖和自然种群复壮。

稚蚌是指钩介幼虫从宿主鱼身上破囊脱落下来的幼体(常亚青, 2007)。背角无齿蚌稚蚌阶段的死亡率最高,是决定其人工繁养成败的关键时期(苏彦平等, 2014)。虽然,闻海波等(2006)报道了圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)刚脱落(第 1 天)和生长第 6 天的稚蚌形态特征。徐良等(2016)初步研究了背角无齿蚌 30 d 稚蚌的壳长等生长状况。刘士力等(2009a)对背角无齿蚌稚蚌形态进行了较为详细的记录,并对壳长的生长特征进行了研究。Chen 等(2015)在人工繁养背角无齿蚌稚蚌的研究中取得突破。然

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019GH10)、国家自然科学基金(31502166)、江苏省自然科学基金(BK20161144)和中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费(2019JBFM05)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of CAFS (2019GH10), National Natural Science Foundation of China (31502166), Natural Science Funds of Jiangsu Province (BK20161144), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Freshwater Fisheries Research Center, CAFS (2019JBFM05)]. 郑浩然, E-mail: 1750313712@qq.com

① 通讯作者: 杨健, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2020-01-09, 收修改稿日期: 2020-03-04

而,以上报道都未对稚蚌的形态、器官及生长动态等进行连续性、系统性的研究。本研究通过连续采集背角无齿蚌稚蚌(1~30 d)的个体样本,探究和掌握其形态变化、器官发育和个体生长等方面的特征,以期为其人工繁养、种质资源保护、自然种群恢复及水污染监测指示生物群体的建立、开发和利用提供理论支撑和技术基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

背角无齿蚌的人工繁育在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖基地进行。2019年5月中旬,从成熟母蚌中人工获取钩介幼虫,并选用黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)作为寄生鱼(Chen *et al.*, 2015),在稚蚌脱落高峰时将其转移至自主研发的立体循环水淡水贝类繁育系统(LFER-FWMW-1901型,中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)进行培育。每天16:00~17:00进行稚蚌的采集,连续采集30 d,每天在同一培育池中随机采集30个稚蚌。

1.2 形态结构分析

应用光学显微镜(BX-51型, Olympus, 日本)和连续变倍体视显微镜(XTL-3400型, 上海精密仪器仪表有限公司)观察、记录其形态和器官发育情况。拍照并用测量软件(Olympus, 日本)测定壳长和壳高。利用tpsDig2软件(闫宝荣等, 2010; 姜涛等, 2011)对拍摄好并经过处理的稚蚌形态建立的地标点(图1),获取地标点的坐标值,建立地标点数据文件。随后,使用tpsRelw计算平均型,并用tpsRegr根据稚蚌的平均型对不同阶段稚蚌进行薄板样条分析并绘制网格图。

1.3 生长分析

利用绝对生长率(AGR)(Mohamed *et al.*, 2006)和

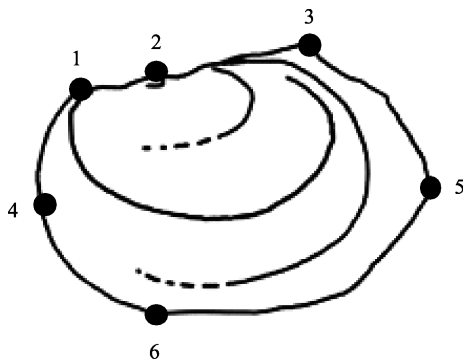


图1 稚蚌所选定的形态学地标点示意图

Fig.1 Landmark points for morphological measurements of the *A. woodiana* juvenile

相对生长率(IGR)(Hopkins *et al.*, 1992)比较稚蚌的生长速率:

$$AGR=(L_t-L_i)/t$$

式中, L_i 为初始长度, L_t 为在 t 时刻的最终长度。

$$IGR=(\ln t-\ln i)/t$$

式中, $\ln i$ 为初始长度的自然对数, $\ln t$ 为在 t 时刻长度的自然对数。

通过对数据进行线性函数拟合来分析壳长和壳高之间的关系(Kovitvadi *et al.*, 2009):

$$\text{Log}Y=\text{Log}b+a\text{Log}X$$

式中, $\text{Log}Y$ 和 $\text{Log}X$ 为指壳长、壳高的对数, $\text{Log}b$ 为截距, a 为斜率。线性回归得到的 a 值显示生长是等速的($a=1$)还是变速的(负变速: $a<1$; 正变速: $a>1$)。变量之间的关联程度由相关系数(R^2)计算得出。

1.4 统计分析

应用 SPSS 23.0 和 Excel 2010 进行数据分析。选定相关系数(R^2)为最大值的函数关系式作为最佳回归曲线(姚建平等, 2018; 徐大风等, 2019);利用形态地标点法(闫宝荣等, 2010; 姜涛等, 2011)分析稚蚌的形态变化;应用独立样本 t 检验分析壳长和壳高的绝对生长率、相对生长率之间的差异。 $P<0.05$ 表示相关性或差异水平显著。

2 结果

2.1 形态变化

稚蚌的形态变化见图2。第1天,稚蚌的外部形态类似于成熟的钩介幼虫(图2A),壳钩依然存在(图2B);第4天,稚蚌的内侧已长出1对新壳,壳钩完全退化,双壳可完全闭合(图2C);第10天,稚蚌分泌形成的新贝壳的生长轮清晰可见,前、后端分化明显(图2D);第15天,稚蚌的前后端增长显著,呈椭圆形,铰合部呈直线生长(图2E);第20天,稚蚌的铰合部前缘和后缘开始向上生长(图2F);第25天,稚蚌的背角开始形成(图2G);第30天,稚蚌的形态已趋于成体(图2H)。

使用 tpsRegr 软件将不同日龄稚蚌的差异可视化,进行网格变形分析后获得网格变形图(变异扩大3倍)(图3)。从图3可以看出,在稚蚌1~30 d的生长过程中,铰合部的前缘和后缘(1、3地标点)向上突起,壳顶(2地标点)相对向内收缩,中轴线前端(4地标点)生长迅速、向外侧扩展,中轴线后端(5地标点)向腹缘方向生长,腹缘(6地标点)相对向后端生长。

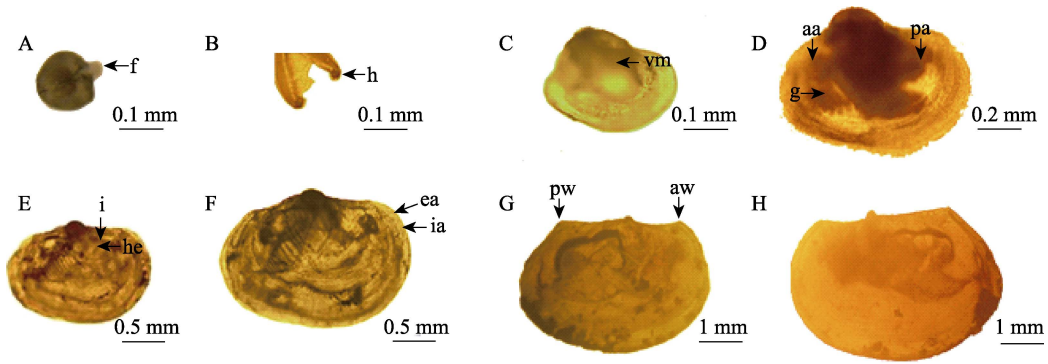


图 2 背角无齿蚌稚蚌的生长发育形态

Fig.2 Morphological development of early juvenile *A. woodiana*

A: 第 1 天; B: 第 1 天壳钩; C: 第 4 天; D: 第 10 天; E: 第 15 天; F: 第 20 天; G: 第 25 天; H: 第 30 天
 f: 斧足; h: 壳钩; vm: 内脏团; g: 鳃; aa: 前闭壳肌; pa: 后闭壳肌; he: 心脏;

i: 肠道; ea: 出水管; ia: 入水管; aw: 前背角; pw: 后背角

A: 1st day; B: The hook of 1st day juvenile; C: 4th day; D: 10th day; E: 15th day; F: 20th day; G: 25th day; H: 30th day
 f: Foot; h: Hook; vm: Visceral mass; g: Gill; aa: Anterior adductor; pa: Posterior adductor; he: Heart; i: Intestine;

ea: Exhalant aperture; ia: Inhalant aperture; aw: Anterior wing; pw: Posterior wing

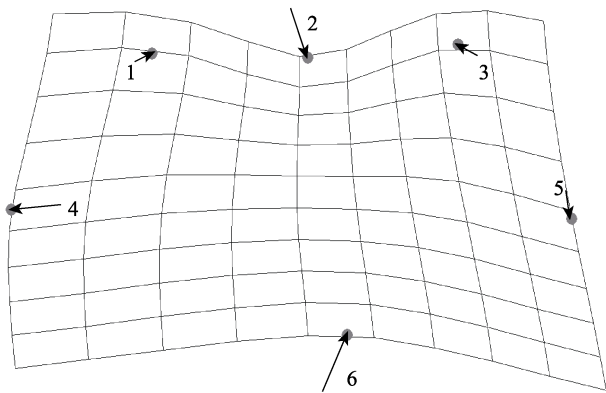


图 3 背角无齿蚌稚蚌形态的网格变形图(变异扩大 3 倍)

Fig.3 Morphological grid deformation for early juvenile *A. woodiana* (variation enlarged 3 times)

2.2 器官发育

第 1 天, 稚蚌最明显的特征是出现斧足, 可自由爬行(图 2A); 第 4 天, 稚蚌的内脏团较为明显(图 2C); 第 10 天, 稚蚌内脏团和鳃均清晰可见, 前、后闭壳肌已经形成(图 2D); 第 15 天, 稚蚌的肠道和心脏清晰可见(图 2E); 第 20 天, 稚蚌鳃的外端与外套膜逐渐愈合, 形成进水管和出水管(图 2F); 第 25 天(图 2G) 和第 30 天(图 2H), 稚蚌的器官已全部发育完成。

2.3 生长特征

表 1 为背角无齿蚌第 1~30 天的形态测定结果。第 1 天, 稚蚌的壳长为(0.257±0.007) mm, 壳高为(0.291±0.011) mm; 第 15 天, 稚蚌的壳长为(1.399±0.128) mm, 壳高为(0.933±0.115) mm; 第 30 天, 稚

表 1 背角无齿蚌第 1~30 天稚蚌的形态变化

Tab.1 Variation of morphological morphometrics from 1~30 day-old juvenile *A. woodiana*

日龄 Day age	壳长 Shell length (mm)	壳高 Shell height (mm)	壳长/壳高 Shell length/Shell height
1	0.257±0.007	0.291±0.011	0.883
2	0.265±0.012	0.296±0.012	0.895
3	0.291±0.019	0.306±0.020	0.950
4	0.326±0.025	0.331±0.024	0.985
5	0.375±0.036	0.349±0.023	1.074
6	0.463±0.081	0.374±0.057	1.238
7	0.586±0.055	0.406±0.040	1.443
8	0.631±0.107	0.454±0.059	1.390
9	0.741±0.107	0.529±0.077	1.401
10	0.857±0.130	0.614±0.083	1.396
11	0.984±0.136	0.667±0.069	1.475
12	1.181±0.151	0.781±0.093	1.512
13	1.261±0.130	0.876±0.083	1.439
14	1.365±0.130	0.910±0.113	1.500
15	1.399±0.128	0.933±0.115	1.499
16	1.479±0.199	0.955±0.133	1.549
17	1.626±0.256	1.060±0.170	1.534
18	1.651±0.312	1.089±0.197	1.516
19	1.806±0.357	1.146±0.227	1.576
20	1.998±0.413	1.262±0.241	1.583
21	2.070±0.276	1.304±0.156	1.587
22	2.297±0.322	1.443±0.185	1.592
23	2.418±0.279	1.613±0.137	1.499
24	2.807±0.607	1.738±0.341	1.615
25	3.170±0.732	1.917±0.327	1.654
26	3.846±0.894	2.162±0.591	1.779
27	4.326±0.706	2.477±0.337	1.746
28	4.881±1.123	2.816±0.584	1.733
29	5.494±1.111	3.167±0.613	1.735
30	5.746±1.191	3.288±0.657	1.748

蚌的壳长为 (5.746 ± 1.191) mm,壳高为 (3.288 ± 0.657) mm。背角无齿蚌稚蚌壳长、壳高与日龄之间均呈指数型相关关系(图4)。

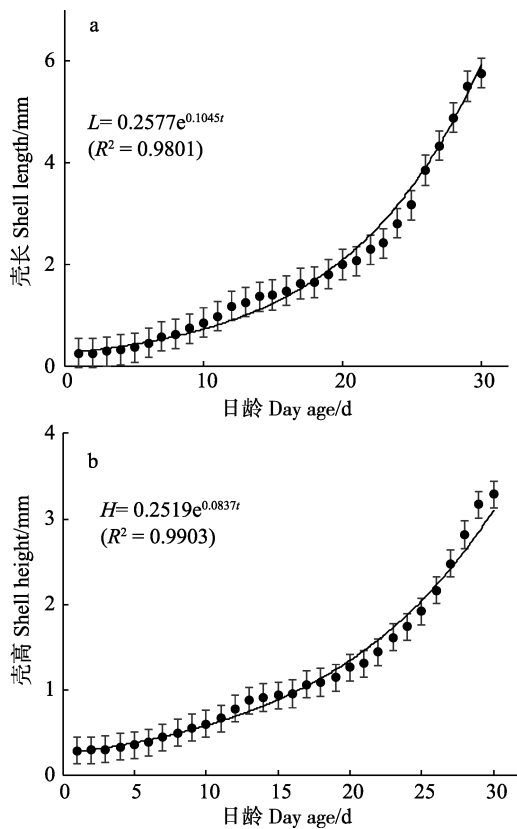


图4 背角无齿蚌稚蚌壳的形态与日龄之间的关系
Fig.4 Relationships between shell morphology and day age of early juvenile *A. woodiana*

第1、15和30天稚蚌的壳长与壳高比分别为0.883、1.499和1.748。壳长和壳高比在第26天达到最高值(1.779)(表1)。稚蚌壳长的绝对生长率明显高于壳高的绝对生长率($P < 0.05$; 图5a)。壳长绝对生长率的峰值(0.676)在第26天出现;壳高绝对生长率的峰值(0.351)出现在第29天。壳长的相对生长率也明显高于壳高的相对生长率($P < 0.05$),壳长相对生长率的峰值出现在第10天,达0.151;壳高相对生长率的峰值出现在第13天,达0.092(图5b)。壳长和壳高之间呈正异速($a > 1$)生长,即壳长比壳高增长得快(图6)。

3 讨论

3.1 形态变化

一般来说,通过传统形态学方法来了解生物生长发育较为简便、直观、成本低,但其结果可能会受到不够客观或不够精确的限制。本研究采用的地标点法能较灵敏地把握水生动物(特别是甲壳类、软体动物

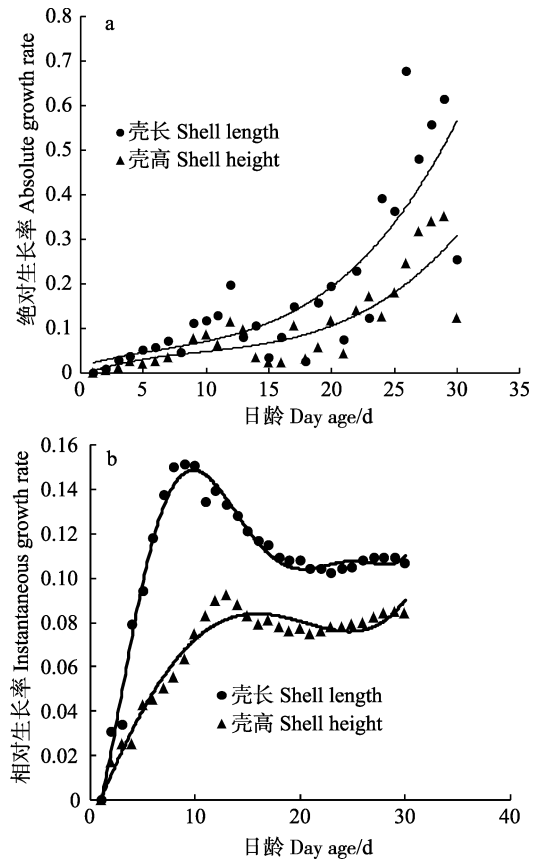


图5 背角无齿蚌稚蚌壳长、壳高的生长率
Fig.5 Growth rate of shell length and height of early juvenile *A. woodiana*

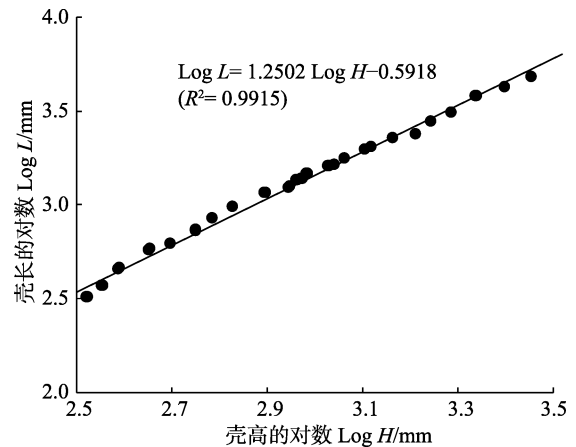


图6 背角无齿蚌稚蚌壳长和壳高之间的生长关系
Fig.6 Relationship between $\text{Log } L$ and $\text{Log } H$ of early juvenile *A. woodiana*

和鱼类)的形态变化(陈新军等, 2013)。该法主要优点是可将研究对象的形状作为变量来进行比较,从而找出形态学观察中难以发现的形态变化特征(Urban, 2002),并且以图形化的方式更加直观地再现形态差异,清晰展现稚蚌形态变化的趋势(Ponton, 2006)。在本研究中,选择稚蚌的壳顶、铰合部前缘后缘、中轴

线前端后端等6个特征点作为地标点, 1、2、3、5为I型地标点, 4、6为III型地标点(图1)。其中, 壳顶(2地标点)、稚蚌前端(4地标点)和腹缘(6地标点)在形态变化中最明显(图3)。壳顶是原钩介幼虫的双壳所在位置, 是形成新贝壳的中心点。壳顶(2地标点)相对向内收缩, 提示壳顶的形成可能是钩介幼虫双壳退化和稚蚌贝壳增长的双重作用引起的。稚蚌壳前端(4地标点)显示出明显的近乎水平向外侧生长的趋势, 表明该部分是决定稚蚌形态生长方向的重要因素, 且生长速率较快。腹缘(6地标点)相对向后端生长, 值得注意的是, 腹缘是稚蚌壳钩的所在位置, 这可能与稚蚌生长过程中壳钩退化有关。壳钩是钩介幼虫附着寄生鱼类、完成寄生过程的主要器官(陈修报等, 2011)。传统观点认为, 刚脱落的稚蚌壳钩就已经退化(陈修报等, 2010; 王宏等, 2007)。刘士力等(2009a)观察到刚脱落的稚蚌壳钩并没有退化, 但对其具体退化时间没有详细记录。本研究首次发现虽然稚蚌壳钩的大小相对于钩介幼虫时期明显变小, 但直到第4天才完全退化; 且在第1~4天, 双壳由于壳钩的存在而无法紧密闭合。另外, 在第4天之前, 稚蚌的鳃尚未发育完全(图2), 还不能完全进行自主呼吸; 故认为, 稚蚌壳钩的“延迟”退化可能与维护蚌体的呼吸效率有关。

3.2 器官发育

本研究中, 背角无齿蚌稚蚌的大部分器官出现的时间与先前的研究较一致(Chen *et al.*, 2015), 即第1天观察到斧足, 第4天观察到内脏团, 第10天观察到鳃和闭壳肌, 第15天观察到肠道和心脏, 第20天观察到进水管和出水管。然而, 与其他淡水贝类相比具有明显差异性。例如, 淡水帆蚌属贝类*Hyriopsis myersiana*的鳃直到第13天才完全发育成熟, 100 d后进水管和出水管才完全发育成熟(Kovitvadh *et al.*, 2009); 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)的鳃直到第15天才完全发育成熟, 27 d后才出现进水管和出水管(刘士力等, 2009b)。鳃是淡水贝类的呼吸器官, 进水管和出水管则是促进摄食的重要器官(陈修报等, 2011)。背角无齿蚌稚蚌相关器官的出现时间均明显早于*H. myersiana*和三角帆蚌, 提示前者呼吸和摄食的需求较早。

3.3 生长特征

刘士力等(2009a)研究显示, 背角无齿蚌稚蚌壳长与日龄之间呈三次函数($L=370.11-32.66t+14.27t^2-0.15t^3$, $R^2=0.9526$)生长, 而本研究发现, 背角无齿蚌1~30 d稚蚌的壳长与日龄之间呈指数型相关关系

($L=0.2577e^{0.1245t}$, $R^2=0.9801$)(图4a)。前者是每5 d测定1次稚蚌规格, 而本研究是每天采样进行连续测定, 因此, 本研究拟合的生长关系更精准地反映稚蚌的生长特征(R^2 更接近于1)。本研究首次阐明了稚蚌壳高与日龄的关系(图4b), 壳长和壳高的绝对、相对生长率(图5)及二者的关系(图6)。刘士力等(2009b)研究发现, 刚脱落的三角帆蚌稚蚌的平均壳长为0.221 mm, 平均壳高为0.249 mm, 其规格小于刚脱落的背角无齿蚌稚蚌(平均壳长为0.257 mm, 平均壳高为0.291 mm)。此外, 背角无齿蚌稚蚌生长速度比三角帆蚌快。需要关注的是, 背角无齿蚌壳长、壳高的绝对生长率和相对生长率的峰值及达到峰值的时间是不同的, 而相对生长率更加准确的反映出稚蚌生长发育的关键时期(如在峰值出现期, 正是稚蚌鳃和心脏等关键器官的发育期), 因此, 建议在背角无齿蚌人工繁育过程中根据相对生长率适时调整繁育对策。

背角无齿蚌稚蚌的壳长和壳高呈正异速生长关系($a>1$, 即壳长比壳高增长得更快)(图6), 这与壳长和壳高的比值相一致(表1)。通过比较可发现, 刚脱落的背角无齿蚌和三角帆蚌的壳长/壳高比值相近, 均为0.9左右(刘士力等, 2009a、2009b)。随着日龄的增加, 背角无齿蚌稚蚌前后两端的生长速度更快, 30 d稚蚌的壳长/壳高比值为1.7(表1, 图6), 形状类似于椭圆形; 而三角帆蚌30 d稚蚌的壳长约为2 mm, 壳高约为1.5 mm, 壳长/壳高比值为1.3(刘士力等, 2009b), 形状向三角形演变(刘士力等, 2009b; 孙朝虎等, 2019), 表明背角无齿蚌稚蚌的生长(特别是壳长)速度相对更快。作者认为这是由二者的种间差异造成的。淡水贝类中, 基于壳长和壳高间生长关系(包括壳长和壳高的比值)的差异是否具有种类鉴别的潜力尚待进一步确证。

4 结论

本研究较为连续而系统地研究和阐释了背角无齿蚌1~30 d稚蚌的形态变化、器官发育及生长速率的特征。稚蚌形态变化的总体特征为铰合部的前缘和后缘向上突起, 壳顶相对向内收缩, 前端生长迅速、向外侧扩展, 后端向腹缘方向生长, 而腹缘相对向后端生长。稚蚌器官发育形成的先后顺序可能是斧足、内脏团、鳃、闭壳肌、心脏、肠道、进水管和出水管, 直至最后发育完全。稚蚌生长的特点表现在壳长、壳高与日龄之间均呈指数型相关关系, 生长速率呈前期快、后期慢的生长特征, 且壳长与壳高为正异速生长关系。上述结果将为破解人工繁育过程中稚蚌期死亡

率高的“瓶颈”提供思路,也可作为背角无齿蚌的种质资源保护、自然种群恢复及水污染监测指示生物群体的建立、开发和利用提供理论支撑和技术基础。

参 考 文 献

- Bian XS, Liu HB, Gan JL, *et al.* HCH and DDT residues in bivalves *Anodonta woodiana* from the Taihu Lake, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 56(1): 67–76
- Chang YQ. *Mollusca 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]
- Chen XB, Liu HB, Su YP, *et al.* Acute toxicity of cadmium and its effects on lipid peroxidation and DNA damage in “standardized” *Anodonta woodiana*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(10): 1960–1967 [陈修报, 刘洪波, 苏彦平, 等. 镉对“标准化”背角无齿蚌的急性毒性及脂质过氧化和DNA损伤的影响. *农业环境科学学报*, 2017, 36(10): 1960–1967]
- Chen XB, Liu HB, Su YP, *et al.* Morphological development and growth of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* from early juvenile to adult. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2015, 59(3): 131–140
- Chen XB, Su YP, Liu HB, *et al.* Active biomonitoring of metals with cultured *Anodonta woodiana*: A case study in the Taihu Lake, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2019, 102(2): 198–203
- Chen XB, Su YP, Liu HB, *et al.* Biomonitoring of heavy metal pollution in Wulihu Bay of Taihu Lake by transplanting “standardized” *Anodonta woodiana*. *China Environmental Science*, 2014, 34(1): 225–231 [陈修报, 苏彦平, 刘洪波, 等. 移植“标准化”背角无齿蚌监测五里湖重金属污染. *中国环境科学*, 2014, 34(1): 225–231]
- Chen XB, Yang J, Liu HB, *et al.* Element concentrations in a unionid mussel (*Anodonta woodiana*) at different life stages. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2012, 57(1): 139–144
- Chen XB, Yang J, Wen HB, *et al.* Studies on the morphology of *Anodonta woodiana elliptica* at several important developmental stages and its effective temperature sum during parasitism. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(4): 100–104 [陈修报, 杨健, 闻海波, 等. 椭圆背角无齿蚌发育关键阶段形态结构以及寄生有效积温的研究. *南京农业大学学报*, 2010, 33(4): 100–104]
- Chen XB, Yang J. Gametogenesis and development of freshwater bivalve molluscs: A review. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 944–952 [陈修报, 杨健. 淡水蚌类发生与发育研究进展. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 944–952]
- Chen XJ, Fang Z, Su H, *et al.* Review and application of geometric morphometrics in aquatic animals. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1873–1885 [陈新军, 方舟, 苏杭, 等. 几何形态测量学在水生动物中的应用及其进展. *水产学报*, 2013, 37(12): 1873–1885]
- Demayo CG, Cabacaba KMC, Torres MAJ. Shell shapes of the Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) from Lawis stream in Iligan City and Lake Lanao in Mindanao, Philippines. *Advances in Environmental Biology*, 2012, 6(4): 1468–1473
- Dong ZG, Li JL. Biodiversity and conservation of freshwater mollusks. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(4): 440–444 [董志国, 李家乐. 淡水贝类生物多样性保育. *水生生物学报*, 2004, 28(4): 440–444]
- Hopkins KD. Reporting fish growth: A review of the basics. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1992, 23(3): 173–179
- Jiang T, Yang J, Liu HB, *et al.* A comparative study of the morphology of sagittal otolith in *Coilia nasus*, *Coilia mystus* and *Coilia nasus taihuensis*. *Marine Sciences*, 2011, 35(3): 23–31 [姜涛, 杨健, 刘洪波, 等. 刀鲚、凤鲚和湖鲚矢耳石的形态学比较研究. *海洋科学*, 2011, 35(3): 23–31]
- Kovitvadhi S, Kovitvadhi U, Sawangwong P, *et al.* Morphometric relationship of weight and size of cultured freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*, under laboratory conditions and earthen pond phases. *Aquaculture International*, 2009, 17(1): 57–67
- Liu HB, Chen XB, Oshima Y, *et al.* Biochemical changes in Chinese pond mussel *Anodonta woodiana* following exposure to copper. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2018, 63(2): 311–318
- Liu HB, Yang J, Gan JL. Residues of mercury in the bivalve mussels *Anodonta woodiana* from the Wulihu Area of the Taihu, China. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2): 411–415 [刘洪波, 杨健, 甘居利. 太湖五里湖水域背角无齿蚌中汞的残留. *农业环境科学学报*, 2009, 28(2): 411–415]
- Liu HB, Yang J, Gan JL. Trace element accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 59(4): 593–601
- Liu J, Gu B, Bian J, *et al.* Antitumor activities of liposome-incorporated aqueous extracts of *Anodonta woodiana* (Lea, 1834). *European Food Research and Technology*, 2008, 227(3): 919–924
- Liu SL, Li JL, Zhang GF, *et al.* Morphological development and growth characteristics of the juvenile of *Anodonta woodiana*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2009a, 18(3): 269–274 [刘士力, 李家乐, 张根芳, 等. 背角无齿蚌稚蚌形态发育与生长特性. *上海海洋大学学报*, 2009a, 18(3): 269–274]
- Liu SL, Li JL, Zhang GF, *et al.* Morphological development and growth characteristics of the juvenile of *Hyriopsis cumingii*. *Journal of Fisheries of China*, 2009b, 33(4): 604–609 [刘士力, 李家乐, 张根芳, 等. 三角帆蚌稚蚌形态发育与生长

- 特性. 水产学报, 2009b, 33(4): 604–609]
- Mohamed KS, Kripa V, Velayudhan TS, *et al.* Growth and biometric relationships of the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) on transplanting from the Gulf of Mannar to the Arabian Sea. *Aquaculture Research*, 2006, 37(7): 725–741
- Ponton D. Is geometric morphometric efficient for comparing otolith shape of different fish species? *Journal of Morphology*, 2006, 267(6): 750–757
- Su YP, Chen XB, Liu HB, *et al.* The dietary algae at different juvenile stages of *Anodonta woodiana*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 736–746 [苏彦平, 陈修报, 刘洪波, 等. 背角无齿蚌幼蚌食物中的藻类组成. 中国水产科学, 2014, 21(4): 736–746]
- Sun CH, Bai ZY, Li QQ, *et al.* The optimization of early compound selection for growth traits and shell color in *Hyriopsis cumingii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 91–97 [孙朝虎, 白志毅, 李清清, 等. 三角帆蚌生长和壳色性状早期复合选择的优化研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 91–97]
- Sun S, Zhao YT, Wang LM, *et al.* Status of heavy metal pollution in the shellfish culture area of Shangdong Province and the risk analysis of heavy metal elements in the shellfish. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 118–125 [孙珊, 赵玉庭, 王立明, 等. 山东省主要贝类养殖区重金属环境状况及贝类安全风险. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 118–125]
- Urban HJ. Modeling growth of different developmental stages in bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 238: 109–114
- Wang H, Li JL, Wang GL, *et al.* Preliminary studies on morphological change of the glochidia of *Hyriopsis cumingii* in stage of parasiting. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(4): 394–398 [王宏, 李家乐, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌介幼虫寄宿阶段形态变化的初步研究. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 394–398]
- Wen HB, Xu GC, Hua D. Preliminary observation on parasitic metamorphosis development of *Anodonta woodiana pacifica*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(2): 252–256 [闻海波, 徐钢春, 华丹. 圆背角无齿蚌寄生变态发育的初步观察. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 252–256]
- Xu DF, Liu YS, Chang Q, *et al.* Morphology, growth and development in the early life of *Octopus vulgaris*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 145–154 [徐大风, 刘永胜, 常青, 等. 真蛸早期发育形态特征及生长规律研究. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 145–154]
- Xu L, Ma XY, Wen HB, *et al.* Comparison of the parasitism effect of glochidia in four host fishes and early juvenile mussel development in *Anodonta woodiana*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2016, 35(6): 489–492 [徐良, 马学艳, 闻海波, 等. 背角无齿蚌在4种鱼上的寄生效果及早期稚贝的生长. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2016, 35(6): 489–492]
- Yan BR, Hua BZ. Geometric morphometrics and its application in the systematics and phylogenetics of insects. *Entomotaxonomia*, 2010, 32(4): 313–320 [闫宝荣, 花保祯. 几何形态测量学及其在昆虫分类学和系统发育中的应用. 昆虫分类学报, 2010, 32(4): 313–320]
- Yang J, Harino H, Liu HB, *et al.* Monitoring the organotin contamination in the Taihu Lake of China by bivalve mussel *Anodonta woodiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 81(2): 164–168
- Yang J, Wang H, Zhu HY, *et al.* Bioaccumulation of heavy metals in *Anodonta woodiana* from Wulihu area of Taihu Lake. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2005, 14(3): 362–366 [杨健, 王慧, 朱宏宇, 等. 背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)在五里湖中的重金属富集. 长江流域资源与环境, 2005, 14(3): 362–366]
- Yang J. Research progress of diagnosis and early-warning technology by bioindicator and biomarker for fisheries ecological environment. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(2): 1–7 [杨健. 渔业生态环境指示生物诊断和预警技术研究进展. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(2): 1–7]
- Yao JP, Shan XJ, Chen YL, *et al.* Effects of ocean warming and acidification on the growth and development of *Nibea albiflora* Richardson during its early life history. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 24–33 [姚建平, 单秀娟, 陈云龙, 等. 海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长发育的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 24–33]

(编辑 马瑾艳)

Growth and Development of the Early Juvenile *Anodonta woodiana*

ZHENG Haoran¹, CHEN Xiubao², LIU Hongbo², YANG Jian^{1,2①}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Research Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract The freshwater mussel *Anodonta woodiana* is a freshwater bivalve with important economic and ecological values, e.g., as a food source or for pearl cultivation, water purification, and aquatic biological monitoring. In order to understand the morphological change, organ development, and growth rate characteristics of *A. woodiana* during its early life stages, relevant studies were conducted on 1~30-day-old juveniles. From the 1 to 30-day stages, the leading and trailing edges of the hinge for the juveniles were raised upward. The umbo was contracted relatively inward. The anterior grew rapidly and extended outwards, but the posterior grew toward the ventral edge. The ventral edge grew toward the ventral edge. The most obvious feature in the one-day-old juveniles was the appearance of a mobile foot. The visceral mass was more obvious in 4-day-old juveniles. At 10 days old, the gills were clearly visible, and the anterior and posterior adductors were formed. The intestine and heart were obviously visible in 15-day-old juveniles. The incurrent and excurrent siphons had been formed in 20-day-old juveniles. For the 25-day-old juveniles, the organs were fully developed. The shell length, height, and age grew exponentially, and the shell length and height grew at a positive allometry. These results can provide theoretical guidance for the artificial breeding of *A. woodiana*, its germplasm resource protection and population restoration, and the effective development and utilization of this bivalve as a special indicator for aquatic pollution biomonitoring.

Key words *Anodonta woodiana*; Juvenile; Morphology; Organ; Growth; Bioindicator

① Corresponding author: YANG Jian, E-mail: jiany@ffrc.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200205001

http://www.yykxjz.cn/

郑姚, 吴开年, 王利, 魏勇. 枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 147-154
Zheng Y, Wu KN, Wang L, Wei Y. Transcriptome and sRNA analyses of the response of *Bacillus subtilis* to ammonia nitrogen. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 147-154

枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析*

郑姚¹ 吴开年¹ 王利^{1①} 魏勇²

(1. 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部和四川省重点实验室 成都 610041;

2. 四川省畜牧科学研究院 成都 610041)

摘要 为探索枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)脱氮的分子机制,筛选枯草芽孢杆菌对氨氮的分子生态学应答相关候选基因及 small RNA(sRNA),本研究对处于富含氨氮环境和对照组的枯草芽孢杆菌 R47 进行原核链特异性转录组及 sRNA 分析,并采用 Real-time PCR 方法检测差异表达基因的相对表达量。结果显示,平均每个测序样本得到约 1.40×10^7 条 reads。对照组与处理组 DESeq2 分析得到 3918 个差异表达基因,并富集在 KEGG 数据库中的 176 个信号通路,其中,包括 8 个与适应富含氨氮环境相关的信号通路(细菌双组分系统通路、精氨酸生物合成、嘌呤代谢等),同时发现, *epsA*、*tasA*、*sinR*、*glnR*、*glnA*、*tnrA* 和 *ureABC* 基因可能参与枯草芽孢杆菌对氨氮的应答过程。经 sRNA 分析获得已注释的枯草芽孢杆菌 sRNA 62 条。对 sRNA 靶基因的分析结果显示,其有 3960 个对应的潜在靶基因,主要参与碳水化合物运输和新陈代谢、氨基酸转运和代谢、转录过程,其中, sRNA2073 和 sRNA2182 对应的靶基因分别为 *sinR* 和 *tnrA*。Real-time PCR 结果显示, *argH*、*codY*、*argG*、*glnA* 和 *glnR* 基因的相对表达量变化与转录组测序结果一致。本研究为进一步探究枯草芽孢杆菌污水脱氮的分子机理提供参考数据。

关键词 枯草芽孢杆菌; 氨氮应答; 转录组; 差异表达基因; sRNA 分析

中图分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0147-08

生活污水排放量的剧增、部分工厂未正确处理工业废水等原因使水体中含氮有害物质积累,导致水体氨氮污染,这对水生生物的生存造成威胁(Liu *et al.*, 2004)。因此,水体净化已是养殖业的关注焦点,当前主要提倡微生物脱氮,以微生物作为生态调节剂来维持水生态平衡,不仅效率高、成本低,而且不易造成二次污染(康传磊等, 2018)。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为革兰氏阳性菌,其抗逆性强、环境兼容性好,优异的蛋白质分泌功能使其成为生产抗生素、药用蛋白和工业酶的重要宿

主(Kewcharoen *et al.*, 2019; 王成强等, 2019)。枯草芽孢杆菌因具有多种优良特性而在水产养殖中得到广泛应用。枯草芽孢杆菌 HAINUP40 可降低模拟废水及养殖废水水体中氨氮含量,是净化水质的一种良好生物制剂(刘树彬等, 2018)。枯草芽孢杆菌对氨的利用途径为谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(Glutamine synthetase/glutamate synthase, GS/GOGAT)途径(Magasanik, 1982)。本研究以枯草芽孢杆菌 R47 为研究对象,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为水体氨氮污染源,模拟富含氨氮污水,采用高通量测序技术建立富含氨氮条

* 四川省农业科技成果转化资金项目(2018NZZJ008)、四川省科技支撑项目(2016NZ0044)和四川肉羊创新团队防疫岗位共同资助 [This work was supported by Sichuan Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund Project (2018NZZJ008), Sichuan Province Science and Technology Support Project (2016NZ0044), and Sichuan Meat Sheep Innovation Team Epidemic Prevention Post]. 郑姚, E-mail: 1793946322@qq.com

① 通讯作者: 王利, 教授, E-mail: qinxin916@aliyun.com

收稿日期: 2020-02-05, 收修修改稿日期: 2020-03-11

件下枯草芽孢杆菌转录组数据库,初步筛选参与枯草芽孢杆菌响应富含氨氮环境的相关基因及通路,为进一步探究其对氨氮应答的分子机制提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

枯草芽孢杆菌 R47 分离于鲫鱼(*Carassius auratus*)粪便,保存于西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部和四川省重点实验室。

1.2 枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮的应答实验

将枯草芽孢杆菌 R47 接种于 LB 液体培养基, 37℃ 培养, 待菌液浓度达 1.4×10^8 CFU/ml 时, 取 10 ml 菌液加入 100 ml 水样中, 分别于 6、18 和 24 h 取样, 根据水质检测试剂盒(杭州陆恒生物科技有限公司)操作指南测定氨氮含量(mg/L)。

1.3 转录组测序分析

1.3.1 测序样品制备及测序 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氨氮污染来源, 模拟富含氨氮污水。将枯草芽孢杆菌 R47 接种于 LB 液体培养基, 37℃ 培养, 待菌液浓度达 1.4×10^8 CFU/ml 时, 向 LB 液体培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 对照组(C)和处理组(T)的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 0 和 40 mmol/L, 37℃ 180 r/min 培养 24 h 后, 4℃ 12000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀, -80℃ 中保存。每个样品 3 个生物学重复。参照细菌总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取 2 组细菌总 RNA, 经 NanoDrop ND-1000 核酸检测仪(LabTech, 美国)检测 RNA 的浓度与纯度。基于 Illumina 二代高通量测序平台(HiSeq 4000)测序, 由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3.2 转录组数据处理与分析 将质控后的原始数据, 即 Clean data, 与参考基因组使用软件 Bowtie 进行比对, 获得用于后续分析的 Mapped data, 同时, 对本次转录组测序的比对结果进行质量评估, Reads

在参考基因组不同区域分布以及 Reads 在不同染色体分布分析, 以此获得各样品 Reads 的比对效率和 Reads 在基因组上的位置信息。比对参考基因组进行基础功能注释, 基于蛋白序列与 NR 库(Non-Redundant Protein Database)、Swiss-prot 库(Swissprotein sequence database)、Pfam 数据库、COG 数据库(Cluster of Orthologous Groups of proteins)和 KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 6 大数据库进行比对, 得到相应的功能注释信息, 综合 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG 和 Pfam 数据库的注释结果, 选择最佳的 Unigene 进行分析。利用软件 RSEM(RNA-Seq expression estimation by Expectation-Maximization)以 TPM 为定量指标对基因的表达水平进行定量分析。基于负二项分布的 DESeq2 软件对 Raw counts 进行组间表达差异的基因统计分析, 标准为对比组样品间表达倍数(Fold Change) ≥ 2 和错误发现率(False Discover Rate, FDR) < 0.05 且 $|\log_2^{\text{FC}}| > 1$ 。采用软件 Goatools 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG Pathway 富集分析, 预测其可能参与的生物学过程和功能。

1.3.3 small RNA(sRNA)分析 采用软件 Rockhopper 获得 sRNA 预测结果后, 使用 Blast 及公共数据 sRNAMap、sRNATarBase、SIPHT 及 Rfam 资源对鉴定到的 sRNA 进行注释。采用 RNAPlex 和 IntaRNA 分别对 sRNA 靶基因预测, 然后对潜在靶基因的功能进行分析。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)制备 cDNA。选择了 5 个差异表达基因, 以高水平、恒定表达的 16S rDNA 基因为内参基因, 设计特异性引物(表 1)。以合成的 cDNA 为模板, 使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa 公司)进行实时荧光定量分析, 检测其 mRNA 水平的相对表达量, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果。Real-Time PCR 结果与转录组测序数据结果均以 $|\log_2^{\text{FC}}|$ 表示。

表 1 Real-Time PCR 引物
Tab.1 Primers of Real-Time PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
<i>argH</i>	GCAGAGGAGGGAGCATTG	AGTCGCCACCTGGTCATT
<i>argG</i>	AATCTTGACAGCCCGTAT	AAGCGAGTAGGAAACACC
<i>glnA</i>	GAGCCAACGCTTGAACATAA	TCGTGTTGACCAGGTGCTAC
<i>glnR</i>	GCCGCTCAATGCCTTTAT	CCTTGTTCTATCAGGTGCT
<i>codY</i>	AACAGTTGTCGGAATGGA	TAACAGAACGGGTAATGC'
16S rDNA	GTAGTCCACGCCGTAAACGA	CGAATTAACACCATGCTCCA

2 结果

2.1 枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮的应答

枯草芽孢杆菌菌株 R47 对氨氮的应答实验结果显示,在 6 h 后水样中氨氮含量从 0.8 降至 0.01 mg/L, 18 和 24 h 后,水样中氨氮含量也均维持在 0.01 mg/L, 这表明枯草芽孢杆菌 R47 可明显降低氨氮含量,可能存在同化吸收作用。

2.2 转录组测序数据拼接与组装

平均每个测序样本得到约 1.40×10^7 条 reads。质控后碱基错误率(Clean Error Rate)为 0.01%, 碱基质量值大于 20 的占 99.24%, 大于 30 的占 97.55%, GC 含量为 43.51%。以上结果显示, 转录组测序结果质量较高。将各样本比对到参考基因组上的 Reads (Mapped Reads)占 Clean Reads 的百分比均大于 80%, 表明所选参考基因组组装可以满足信息分析的需求。

2.3 Unigene 的功能注释

分别基于 NR、Swiss-prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库进行总 Unigene 注释, 注释到 NR 库的基因占比最高, 高达 96.95%, 注释到 KEGG 库的基因占总基因数最少, 为 42.51%。6 个数据库总计能注释的 Unigene 数目为 4420。

2.4 转录组测序差异表达基因分析

转录组测序数据相关性检查结果显示, 每组样品间基因表达水平皮尔逊相关系数的平方(R^2)均大于 0.65, 即各组样品之间表达模式的相似度较高, 增加了实验的可靠性。将 2 个组基因表达水平分析中得到的数据采用 DESeq2 进行分析, 结果显示, 与对照组相比, 处理组共筛选出 3918 条差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs), 其中, 包括 1887 个 DEGs 上调表达, 2031 个 DEGs 下调表达。利用 KEGG 数据库, 可将 DEGs 按照参与的 Pathway 通路或行使的功能进行分类, 结果发现, 表达下调基因主要参与氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输过程, 上调基因则主要参与碳水化合物代谢、氨基酸代谢与辅助因子和维生素的代谢等过程。

2.5 差异表达基因功能富集分析

采用软件 Goatools 对差异表达基因进行 GO 富集分析, 获得差异表达基因主要具有的 GO 功能(图 1)。上调基因中对与氨氮代谢功能有关的 GO 条目及候选基因进行筛选, 共得到 1 个 GO 条目, 包含 37 个

DEGs。下调基因中 GO 条目及候选基因筛选共得到 13 个 GO 条目, 包含 574 个 DEGs。将 DEGs 标注到 KEGG 数据库中, 对基因进行 KEGG Pathway 富集分析, 结果显示, 共富集到 176 个信号通路, 上调基因与下调基因共同信号通路有 130 个。在差异基因 KEGG 富集结果中, 挑选了富集最显著的 20 条通路在图形中展示(图 2)。在所有 KEGG 通路中, 对参与枯草芽孢杆菌氨氮代谢通路及候选基因筛选, 共得到 8 个信号通路, 包含 260 个 DEGs(表 2)。根据对差异表达基因 GO 与 KEGG 富集分析中筛选出 9 个与枯草芽孢杆菌 R47 对水中氨氮应答的相关基因(表 3)。

2.6 sRNA 的预测和分析

去除接头并滤去低质量数据后, 获得 3348 条长度为 50~500 nt 的 sRNA 序列, 其中, 以 50~100 nt 的序列居多。用 Blast 及公共数据库 sRNA Map、sRNA TarBase、SIPHT 及 Rfam 资源对鉴定到的 sRNA 进行注释, 被注释到的 sRNA 总数为 62。

2.7 sRNA 的潜在靶位点及功能分类

对 sRNA 靶基因的分析结果显示, 其有 3960 个对应的潜在靶基因。KEGG 数据库将潜在的靶基因分为代谢、环境信息处理等 6 大类(表 4)。这些潜在靶基因涉及较广的生物学过程及功能, 其中主要参与碳水化合物运输和新陈代谢、氨基酸转运和代谢、转录过程等, 但由于数据有限, 有 1285 个靶基因功能不明确。根据富集分析所得 9 个相关基因中, 其中, *sinR* 和 *mra* 分别是 sRNA2073 和 sRNA2182 的靶基因。

2.8 实时荧光定量 PCR 验证

为评估转录组测序结果的可靠性, 随机挑选 *argH*、*codY*、*argG*、*glnA* 和 *glnR* 共 5 个基因进行 Real-time PCR 分析。相关性分析结果显示, 皮尔逊相关系数为 0.947, $P < 0.05$, Real-time PCR 与转录组测序结果具有一致性, 表明基于转录组分析差异表达基因的表达结果较为可靠(图 3)。

3 讨论与结论

微生物可参与水环境中的物质代谢, 将有机和无机污染物转化为无毒化合物, 从而达到改善水质的作用(Hu *et al*, 2012)。比较来自海水分离的枯草芽孢杆菌、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 枯草芽孢杆菌所分泌的酶具有最高的活性, 去除污渍能力最强(Marathe *et al*, 2018)。分离于水产养殖水体及底泥中枯草芽孢杆菌

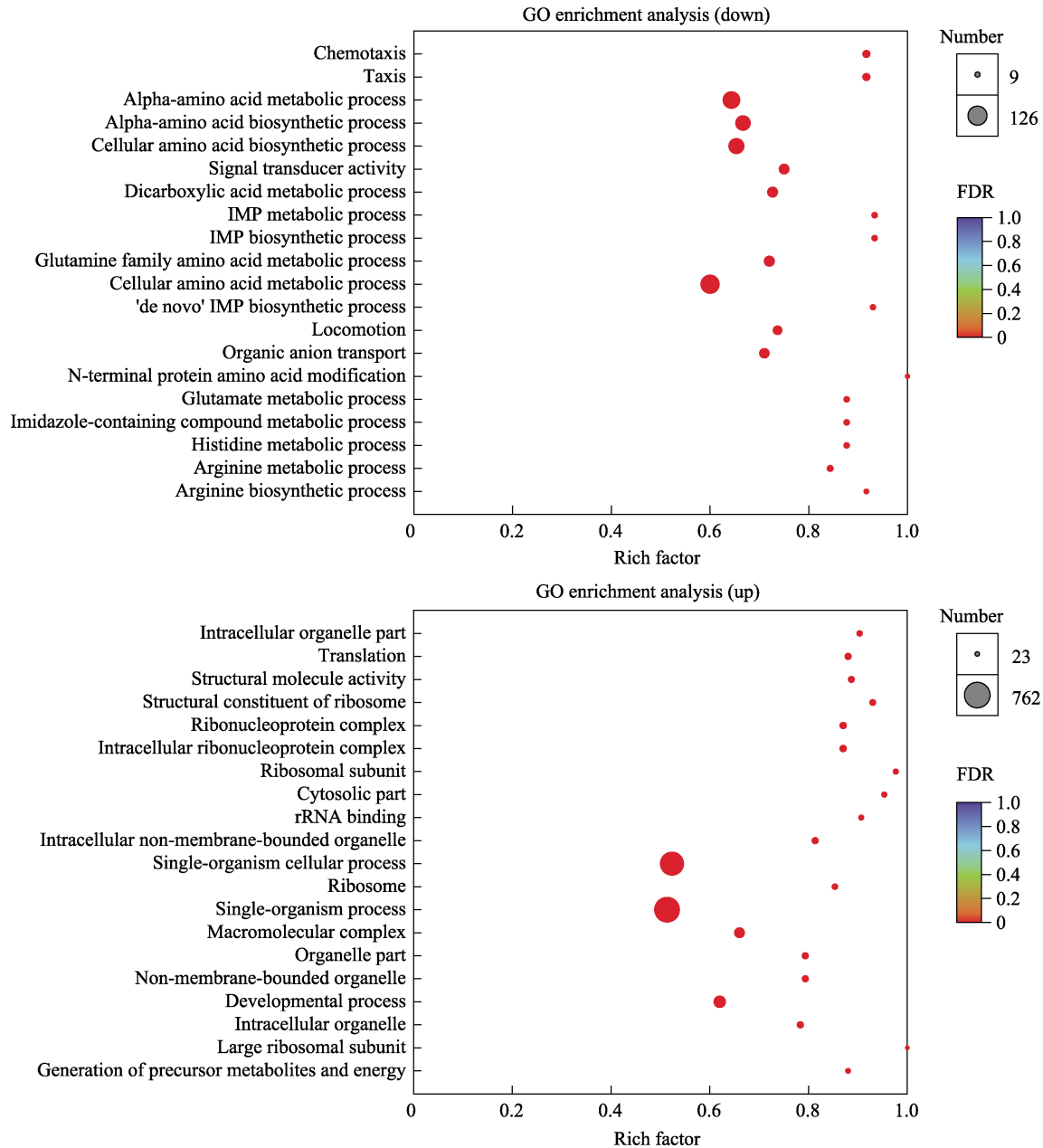


图 1 差异表达基因 GO 富集散点图

Fig.1 Scattered plot of GO enrichment of DEGs

B7 具有良好的水质调控作用, 对水体中氨氮的去除率大于 80%(陈静, 2008)。鲫鱼粪便中分离的枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮具有相似响应, 在一定时间内可降低氨氮含量, 从而改善水质。

生物体对某一刺激作出反应时, 阐明其生物功能涉及的信号通路是至关重要的。本研究在 GO 富集分析的基础上, 进一步开展了 KEGG 信号通路分析, 发现 DEGs 富集最多的候选信号通路为细菌双组分系统(Two component system, TCS)。TCS 在细菌、古细菌中均有发现, 是其对环境刺激作出反应的多种信号转导过程。枯草芽孢杆菌通过 TCS 来应对高浓度氨

氮环境, 得以在逆境中生存(Galperin *et al*, 2018; Krell *et al*, 2010)。*epsA*、*tasA* 和 *sinR* 参与枯草芽孢杆菌对高浓度氨氮的应激反应。TCS 可影响细菌的生物膜形成(Plate *et al*, 2012)。枯草芽孢杆菌生物被膜的胞外基质主要由胞外多糖和胞外蛋白质 TasA 2 个主要组分组成, 分别由 *epsA-O* 操纵子和 *tapA-sipW-tasA* 操纵子诱导合成(Kolodkin *et al*, 2010; Nagorska *et al*, 2010)。SinR 是枯草芽孢杆菌生物被膜形成过程中重要的调控蛋白, 通过抑制胞外多糖和胞外蛋白质 TasA 的合成, 进而抑制生物被膜的形成(Kearns *et al*, 2005)。差异表达分析结果显示, *epsA* 和 *tasA* 均表现出

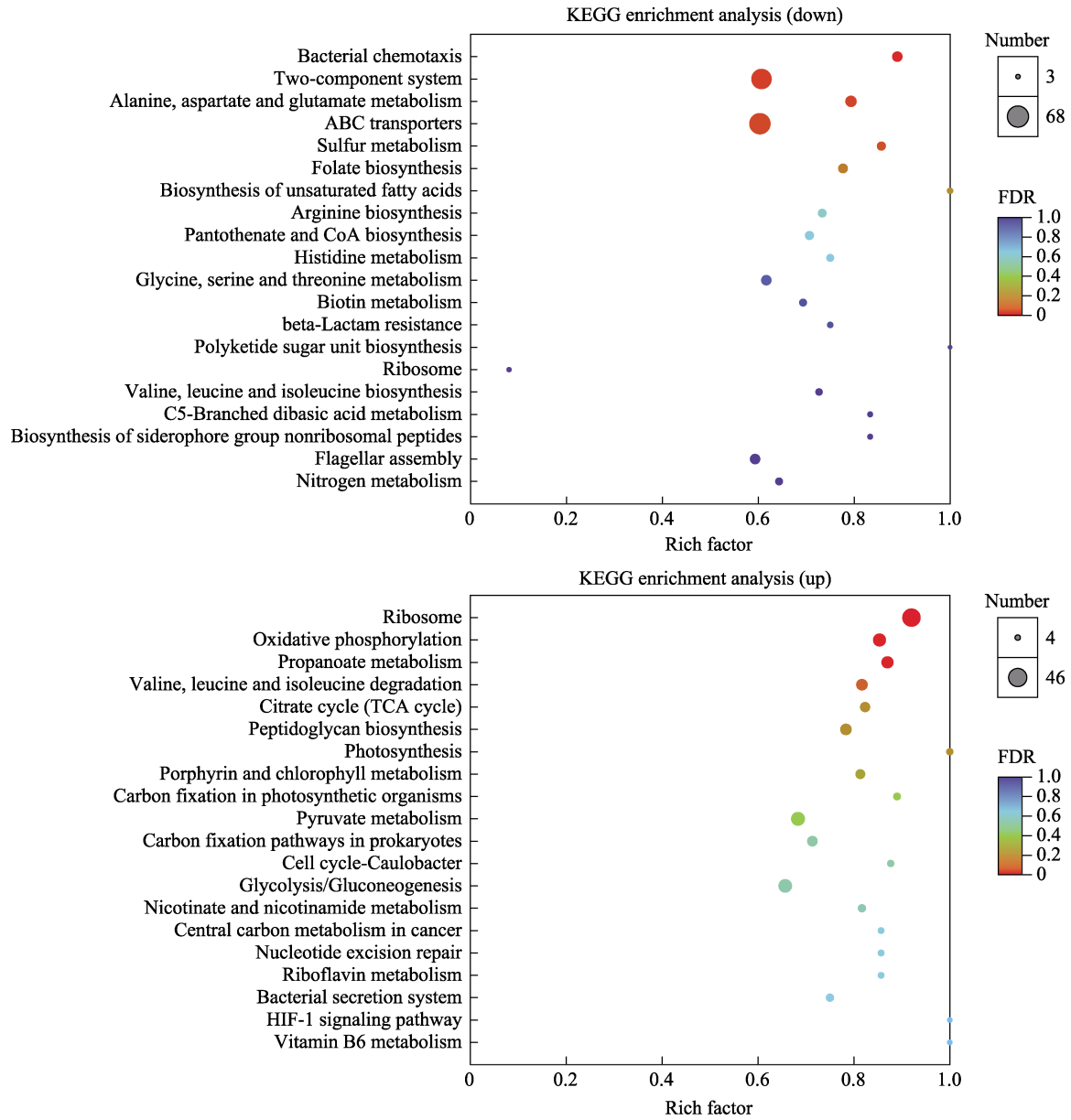


图 2 差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig.2 Scattered plot of KEGG enrichment of DEGs

表 2 氨氮代谢相关差异表达基因 KEGG 富集通路

Tab.2 The enrichment pathway of ammonia nitrogen metabolism related DEGs

通路 Pathway	Pathway ID	DEGs		
		up	down	
细菌双组分系统	Two component system	map02020	40	62
精氨酸生物合成	Arginine biosynthesis	map00220	4	11
嘌呤代谢	Metabolism	map00230	23	31
赖氨酸生物合成	Lysine biosynthesis	map00300	5	8
氮代谢	Nitrogen metabolism	map00910	5	9
硫胺素代谢	Thiamine metabolism	map00730	9	8
精氨酸和脯氨酸代谢	Arginine and proline metabolism	map00330	11	11
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	Alanine, aspartic acid and glutamate metabolism	map00250	4	19

表3 氨氮代谢相关差异表达基因
Tab.3 DEGs related ammonia nitrogen metabolism

基因 Gene	描述 Description
<i>epsA</i>	hypothetical protein
<i>glnR</i>	MerR family transcriptional regulator
<i>glnA</i>	glutamine synthetase
<i>sinR</i>	XRE family transcriptional regulator
<i>tasA</i>	spore coat protein N
<i>tnrA</i>	MerR family transcriptional regulator
<i>ureA</i>	urease subunit gamma
<i>ureB</i>	urease subunit beta
<i>ureC</i>	urease subunit alpha

表4 sRNA 潜在靶基因的 KEGG 代谢通路分类统计
Tab.4 Classification of KEGG metabolic pathways of sRNA potential target genes

KEGG 代谢通路 KEGG metabolic pathway	基因数目 Number of gene
代谢 Metabolism	834
遗传信息处理 Genetic information processing	143
环境信息处理 Environmental information processing	234
细胞过程 Cellular processes	113
生物体系统 Organismal systems	27
人类疾病 Human diseases	71

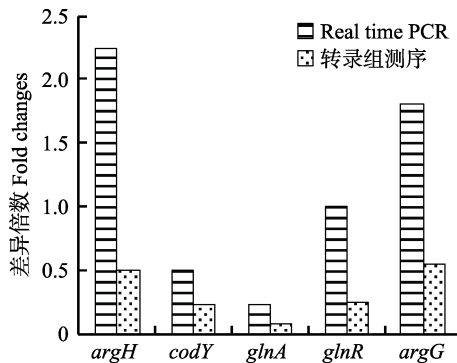


图3 转录组测序结果的实时定量 PCR 验证

Fig.3 Verification of RNA-sequence by Real-time PCR

下调趋势，而 *sinR* 表现出上调趋势。这可能是由于枯草芽孢杆菌 R47 正处于高浓度氨氮水体的初级适应阶段。

枯草芽孢杆菌没有谷氨酸脱氢酶活性，通过 GS/GOGAT 途径同化氨，*glnR*、*glnA*、*ureABC* 和 *tnrA* 参与此过程。*glnR* 基因编码的蛋白是氮代谢全局调控因子(Global nitrogen regulator, GlnR)，一种转录调控因子。枯草芽孢杆菌氮代谢途径的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 受 GlnR 的调节(杨帆等, 2019)，这一观点在本研究也得以证实。*glnR* 位于 *glnA* 上游，参与双顺

反子 *glnRA* 操纵子的组成。具有一个 α -螺旋-转角-螺旋结构域的 GlnR 形成二聚体后，结合到 *glnRA* 操纵子上，在氮源丰富时抑制 *glnA* 转录，降低谷氨酰胺合成酶的活性(Brown *et al*, 1996; Wray *et al*, 2008)，同时，GlnR 也能抑制脲酶 *ureABC* 操纵子的转录，作为阻遏物阻碍 *tnrA* 基因表达(Brandenburg *et al*, 2002; Randazzo *et al*, 2017)。差异表达基因分析结果显示，*glnA*、*ureABC* 和 *tnrA* 呈下调趋势，与其保持一致。枯草芽孢杆菌对氨氮的应答是一个复杂反应，多个信号通路相互协调完成。本研究仅对枯草芽孢杆菌 R47 的双组分系统与部分基因进行了探讨，还需深入开展研究。

sRNA 介导的转录后基因调控是生物体的一种新型基因调控机制，它在有机体适应环境、调节生命活动等生物过程中有极为重要的作用。氮胁迫诱导 RNA1 和 RNA4 可调节念珠藻(*Nostocales*)和蓝细菌(*Cyanobacteria*)对氮的可利用性(Álvarez-Escribano *et al*, 2018; Klähn *et al*, 2018)。Gaimster 等(2019)发现，副球菌(*Paracoccus denitrificans*) sRNA29 的过表达下调亚硝酸盐还原酶并限制细胞产生 NO 和 N₂O。本研究对样本 sRNA 的靶基因进行预测分析，sRNA2073 和 sRNA2182 所介导的调控通路可能是枯草芽孢杆菌 R47 进行氮代谢的重要辅助。

本研究利用 Illumina 二代高通量测序技术对在富含氨氮环境中枯草芽孢杆菌 R47 进行测序，并初步分析发现细菌双组分系统和 *epsA*、*tasA*、*sinR*、*glnR*、*glnA*、*tnrA*、*ureABC* 等基因可能参与枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮应答过程，同时进行了 sRNA 分析，为后续深入探讨枯草芽孢杆菌的脱氮分子机理提供数据支撑。

参 考 文 献

- Álvarez-Escribano I, Vioque A, Muro-Pastor AM. NsrR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of nblA in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(1): 2267
- Brandenburg JL, Wray LV, Beier L, *et al*. Roles of PucR, GlnR, and TnrA in regulating expression of the *Bacillus subtilis* ure P3 promoter. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(21): 6060–6064
- Brown SW, Sonenshein AL. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* operon. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(8): 2450–2454
- Chen J, Xu HY, Gu W. *Bacillus subtilis* B7: Isolation and function in water purification. *Hebei Fisheries*, 2008(11): 10–11, 29 [陈静, 徐海燕, 谷巍. 枯草芽孢杆菌 B7 的分离和净化水质的初步研究. *河北渔业*, 2008(11): 10–11, 29]
- Commichau FM, Gunka K, Landmann JJ, *et al*. Glutamate

- metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(10): 3557–3564
- Gaimster H, Hews CL, Griffiths R, *et al.* A central small RNA regulatory circuit controlling bacterial denitrification and N₂O emissions. *mBio*, 2019, 10(4): e01165–19
- Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, *et al.* Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00681–17
- Hu M, Wang X, Wen X, *et al.* Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454. pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 72–79
- Kang CL, Li QF, Zhang Y, *et al.* Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 42–48 [康传磊, 李秋芬, 张艳, 等. 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲃养殖水质的净化效果. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 42–48]
- Kearns DB, Chu F, Branda SS, *et al.* A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(3): 739–749
- Kewcharoen W, Srisapoome P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 94: 175–189
- Klähn S, Bolay P, Wright PR, *et al.* A glutamine riboswitch is a key element for the regulation of glutamine synthetase in cyanobacteria. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10082–10094
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, *et al.* D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 2010, 328(5978): 627–629
- Krell T, Lacal J, Busch A, *et al.* Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64(1): 539–5593
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Virio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 321–334
- Liu SB, Wang XR, Lin ZQ, *et al.* Purification of aquaculture effluent by *Bacillus subtilis* HAINUP40. *Journal of Fisheries Science*, 2018, 37(2): 159–166 [刘树彬, 王新锐, 林壮其, 等. 枯草芽孢杆菌 HAINUP40 水质净化作用的研究. *水产科学*, 2018, 37(2): 17–24]
- Magasanik B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 1982, 16: 135–168
- Marathe SK, Vashistht MA, Prashanth A, *et al.* Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(1): 39–46
- Nagorska K, Ostrowski A, Hinc K, *et al.* Importance of EPS genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of Applied Genetics*, 2010, 51(3): 369–381
- Plate L, Marletta MA. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Molecular Cell*, 2012, 46(4): 449–460
- Randazzo P, Aucouturier A, Delumeau O, *et al.* Revisiting the *in vivo* GlnR-binding sites at the genome scale in *Bacillus subtilis*. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 422
- Wang CQ, Li BS, Wang JY, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices and antioxidant capacity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 47–56 [王成强, 李宝山, 王际英, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 47–56]
- Wray LV, Fisher SH. *Bacillus subtilis* GlnR contains an autoinhibitory C-terminal domain required for the interaction with glutamine synthetase. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(2): 277–285
- Yang F, Qin JX, Peng Q, *et al.* Transcriptional regulation and overexpression of *glnA* gene in *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019, 35(4): 563–569 [杨帆, 秦嘉欣, 彭琦, 等. 苏云金芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的转录调控和过表达. *中国生物防治学报*, 2019, 35(4): 563–569]

(编辑 冯小花)

Transcriptome and sRNA Analyses of the Response of *Bacillus subtilis* to Ammonia Nitrogen

ZHENG Yao¹, WU Kainian¹, WANG Li^{1①}, WEI Yong²

(1. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education and Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041;

2. Animal Science Academy of Sichuan Province, Chengdu 610041)

Abstract To explore the molecular mechanism of denitrification by *Bacillus subtilis* and screen out candidate genes and small RNA (sRNA) related to the response of *B. subtilis* to ammonia nitrogen. Transcriptome sequencing and sRNA analysis were performed on *B. subtilis* in both an ammonia-rich environment and a control group. The relative expression changes in differentially expressed genes were analyzed using real-time PCR. The results showed that each sequencing sample yielded approximately 1.40×10^7 reads on average. There were 3918 differentially expressed genes in the control and treatment groups as per DESeq2 analysis, which enriched 176 signaling pathways in the KEGG database, including eight signaling pathways (bacterial two-component system pathway, arginine biosynthesis, purine metabolism, and so on) adapted to the ammonia-rich environment. We found that *epsA*, *tasA*, *SinR*, *glnR*, *glnA*, *tnrA*, and *ureABC* genes may be involved in the response of *B. subtilis* to ammonia nitrogen in water. Sixty-two annotated strains of *B. subtilis* sRNA were obtained. The prediction and analysis results of sRNA target genes revealed that there are 3960 potential target genes involved in carbohydrate transport and metabolism, amino acid transport and metabolism, and transcription processes. Among them, the target genes corresponding to sRNA2073 and sRNA2182 were *sinR* and *tnrA*, respectively. Real-time PCR analysis showed that the relative expression changes of *argH*, *codY*, *argG*, *glnA* and *glnR* were consistent with transcriptome sequencing. These results provide reference data for further exploring the molecular mechanism of nitrogen removal by *B. subtilis* in wastewater.

Key words *Bacillus subtilis*; Response to ammonia nitrogen; Transcriptome; Differentially expressed genes; sRNA analysis

① Corresponding author: WANG Li, E-mail: qinxin916@aliyun.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200115003

http://www.yykxjz.cn/

任宁欣, 史成银, 万晓媛, 谢国驹, 王仁宝, 王海波. 海水鱼蛭阿鲁加姆锡兰蛭(*Zeylanicobdella arugamensis*)的在体感染与生活史观察. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 155–161

Ren NX, Shi CY, Wan XY, Xie GS, Wang RB, Wang HB. *In vivo* infestation and life cycle observation of marine leech *Zeylanicobdella arugamensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 155–161

海水鱼蛭阿鲁加姆锡兰蛭(*Zeylanicobdella arugamensis*)的在体感染与生活史观察*



任宁欣^{1,2} 史成银^{1①} 万晓媛¹ 谢国驹¹ 王仁宝^{1,2} 王海波¹

(1. 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 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 阿鲁加姆锡兰蛭(*Zeylanicobdella arugamensis*)是重要的鱼类体外寄生虫,可感染 30 余种海水鱼类。阿鲁加姆锡兰蛭病在我国和东南亚多个国家海水养殖鱼类中流行,严重时可导致鱼类大量死亡。为持续、稳定、足量地获得活体寄生虫,供防治鱼蛭病研究使用,本研究通过鱼蛭在体感染实验,建立了阿鲁加姆锡兰蛭的传代培养体系。研究结果证实,2 种海水观赏鱼[棘颊雀鲷(*Premnas biaculeatus*)和白条双锯鱼(*Amphiprion frenatus*)]可作为宿主鱼,用于该鱼蛭的传代培养,且传 9 代后产生的子代仍具有很强的感染力。鱼蛭的生活史观察显示,该鱼蛭的生活史可分为卵茧孵化和幼蛭发育 2 个阶段。在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下,鱼蛭最短 20 d 即可完成其生活史。其中,卵茧孵化为幼蛭需要 9 d,孵化率高达 83.8%;幼蛭感染宿主、发育成熟并开始产卵茧最短需要 11 d。本研究可为海水鱼蛭的生物学和鱼蛭病的防治研究提供技术支撑。

关键词 鱼蛭; 在体感染; 生活史; 棘颊雀鲷; 白条双锯鱼

中图分类号 S941.54 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)02-0155-07

鱼蛭是鱼类重要的体外寄生虫,通常寄生在鱼体表面,吸食鱼的血液,使宿主鱼营养不良、身体消瘦,产生体表创伤或溃疡,并造成继发感染(王永波等, 2018)。鱼蛭还可作为细菌、病毒、真菌和血液寄生虫的载体,传播鱼类疾病,具有较强的危害性(Cruz-Lacierda *et al*, 2000; Kua *et al*, 2009、2010; Hayes *et al*, 2006; Ahne, 1985; Mulcahy *et al*, 1990)。

海水鱼蛭阿鲁加姆锡兰蛭(*Zeylanicobdella arugamensis*)隶属于环节动物门(Annelida)、蛭亚纲

(Hirudinea)、蛭目(Hirudinida)、鱼蛭科(Piscicolidae)、锡兰蛭属(*Zeylanicobdella*),最早由 De Silva(1963)定种。阿鲁加姆锡兰蛭可感染多种海水鱼类,其引起的鱼蛭病在我国和东南亚的多个国家广泛流行并导致海水养殖鱼类的死亡。例如,2000 年,在菲律宾养殖的点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)幼鱼和成鱼中,其流行率分别为 83%和 17%,且成鱼在感染 3 d 后死亡(Cruz-Lacierda *et al*, 2000)。2009 年,在马来西亚某养殖场的尖吻鲈(*Lates calcarifer*)幼鱼中,其流行率为

* 农业国际交流与合作项目和国家重点研发计划课题(2018YFD0900301)共同资助 [This work was supported by Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, and National Key R&D Program of China (2018YFD0900301)]. 任宁欣, E-mail: rnxqz7@163.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-01-15, 收修改稿日期: 2020-02-21

100%，感染幼鱼的死亡率达 60% (Kua *et al.*, 2009)。2018~2019 年，我们在中国、马来西亚和印度尼西亚养殖的豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*) 和红鳍笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*) 鱼体上多次发现了阿鲁加姆锡兰蛭的感染和流行，危害较为严重。

国内外关于阿鲁加姆锡兰蛭的研究不多，主要集中在分类鉴定、宿主、生活史和药物防治等方面 (王永波等, 2018, 2011; Cruz-Lacierda, 2000; Kua *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2006; Murwantoko *et al.*, 2017; Ravi *et al.*, 2017)。文献已报道的阿鲁加姆锡兰蛭宿主鱼类有 33 种，包括豹纹鳃棘鲈、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*)、紫红笛鲷 (*Lutjanus argentimaculatus*)、军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 等 (王永波等, 2018; Kua *et al.*, 2010; Nagasawa *et al.*, 2012)。阿鲁加姆锡兰蛭属于专性寄生类型，幼蛭感染宿主鱼后，会一直留在鱼体上吸血，成熟后离开宿主鱼产卵，产卵后不再感染宿主鱼并衰老死亡。Kua 等 (2010) 和 Murwantoko 等 (2017) 研究发现，阿鲁加姆锡兰蛭生活史比较简单，包含卵孵化和幼蛭发育 2 个阶段；在 27℃ 和 24℃~25℃ 时，阿鲁加姆锡兰蛭卵孵化分别需要 7 d 和 12 d。国内对阿鲁加姆锡兰蛭的研究很少，仅有王永波等 (2018) 对阿鲁加姆锡兰蛭开展过种类鉴定、宿主和寄生偏好等研究，发现在常见的 5 种石斑鱼中，豹纹鳃棘鲈是该鱼蛭最喜好寄生的宿主。

棘颊雀鲷 (*Premnas biaculeatus*) 和白条双锯鱼 (*Amphiprion frenatus*) 是雀鲷科 (Pomacentridae) 常见的 2 种海水观赏鱼类，最适养殖水温为 26℃，盐度为 30。棘颊雀鲷俗称透红小丑鱼，体型小。白条双锯鱼俗称番茄小丑鱼，体型比棘颊雀鲷稍大 (张薇等, 2018)。棘颊雀鲷和白条双锯鱼都具有体型小、容易在实验室内养殖、体色鲜艳、易于实验观察等优点。目前，尚未有阿鲁加姆锡兰蛭感染棘颊雀鲷和白条双锯鱼的报道。鉴于这 2 种观赏鱼与阿鲁加姆锡兰蛭生活的最适水温和盐度相近，本研究选择棘颊雀鲷和白条双锯鱼作为宿主鱼开展了阿鲁加姆锡兰蛭的在体感染和传代实验，并对传代培养鱼蛭的生活史进行了观察和分析，以期为海水鱼蛭病的病原、病理、致病机制、检测与防治研究提供生物材料和技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

在患病的豹纹鳃棘鲈鳍条上采集数十尾活鱼蛭，带回实验室供研究使用。棘颊雀鲷 (全长为 40~45 mm，

体重为 2.0~2.5 g) 和白条双锯鱼 (全长为 70~75 mm，体重为 9.0~11.0 g)，均由中国水产科学院黄海水产研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 阿鲁加姆锡兰蛭的在体感染和传代培养 将棘颊雀鲷和白条双锯鱼分别养殖于不同的塑料水族箱 (0.8 m × 0.6 m × 0.4 m) 或 2 L 的玻璃烧杯中，水温为 26℃，盐度为 30。每天换 1/3 海水，投喂 1 次。将采集的成熟鱼蛭转移至 12 孔细胞培养板中，1 条/孔，各孔中含 2 ml 无菌过滤海水，于 26℃ 恒温培养箱中培养，每 2 d 换 1/2 海水。待鱼蛭产出卵后，计数卵数量，测量卵大小，观察其孵化情况。待卵孵出幼蛭后，在解剖镜下将幼蛭转移至水族箱或玻璃烧杯中，使其自然感染棘颊雀鲷和白条双锯鱼，并发育成熟。幼蛭成熟后，即体长 > 10 mm 并从鱼体脱落时，将脱落的成熟鱼蛭转移到新的 12 孔细胞培养板中，26℃ 恒温培养。重复上述操作，建立鱼蛭阿鲁加姆锡兰蛭的在体感染和传代培养体系。

1.2.2 阿鲁加姆锡兰蛭卵的孵化 取从鱼体脱落的尚未产卵的成熟鱼蛭 (静止时体长为 11~14 mm)，置于含 2 ml 无菌海水的 12 孔细胞培养板中，海水水温为 26℃、盐度为 30。待鱼蛭产出卵后，每隔 2~24 h 在倒置显微镜 (Optec BDS 300PH) 下观察、记录并拍照卵的发育情况，直至孵出幼蛭。

1.2.3 阿鲁加姆锡兰蛭幼蛭的发育 在含 1.5 L 无菌海水的 2 L 玻璃烧杯中，分别放入 2 尾健康的棘颊雀鲷或 1 尾白条双锯鱼，于 26℃ 恒温培养箱中培养。将刚孵出的 30 条幼蛭转移至上述含棘颊雀鲷或白条双锯鱼的烧杯中，每个烧杯 10 尾。每天观察幼蛭的发育情况，记录并拍照。实验期间保持养殖海水水温为 26℃、盐度为 30。每天换 1/3 海水，投喂 1 次。

2 结 果

2.1 阿鲁加姆锡兰蛭的在体感染和传代培养

在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下，12 孔细胞培养板中的 16 条鱼蛭共产卵 259 个。随机测量了 50 枚卵，大小为 0.53~0.77 mm，平均大小为 (0.66±0.06) mm。每个卵内只有 1 个受精卵，可孵出 1 条幼蛭。9 d 后，259 个卵共孵出幼蛭 217 条，中途停止发育或不发育的卵 42 个，孵化率为 83.8%。

从孵出的幼蛭中随机挑取 30 条，每 10 条为 1 组，共 3 组，放入饲养有 2 尾棘颊雀鲷的烧杯中，使其自然感染棘颊雀鲷。1 d 后，3 组幼蛭均成功感染，开

始营寄生生活, 并逐渐长大。感染 11 d 后, 鱼蛭发育成熟、脱离鱼体, 开始产卵茧。30 条成熟鱼蛭, 平均每条产卵茧 14.1 枚。鱼蛭产茧集中在脱离鱼体后的前 4 d, 之后一般不再产茧。目前, 在实验室内已传代培养阿鲁加姆锡兰蛭 9 代, 新产生的幼蛭仍具有很强的感染力, 可长期、稳定地获得鱼蛭和卵茧。使用孵出的幼蛭感染白条双锯鱼, 也取得了类似的结果。

2.2 阿鲁加姆锡兰蛭的生活史

2.2.1 鱼蛭卵茧的发育

刚刚产出的卵茧呈黄棕色, 最外圈是黏液层, 将卵茧牢牢地附着在细胞培养板底壁或侧壁上。阿鲁加姆锡兰蛭的卵茧为头盔状, 一端稍尖, 另一端钝圆, 直径约为 0.7 mm。卵茧底

部由 1 个椭圆形平板封闭, 其中稍尖端有 1 个小圆栓, 钝圆端有 1 个大圆栓。受精卵位于 2 个圆栓之间, 浮在蛋白营养液里。新生卵茧内部有很多黑色的长丝状结构, 遮住了受精卵和圆栓(图 1a)。2 h 左右长丝状结构消失(图 1b)。卵茧发育的前 36 h 胚胎体积增加较缓慢(图 1c、图 1d)。48 h 时, 胚胎体积急剧增大, 可观察到明显的大幅度收缩和扩张(图 1e), 72 h 时, 胚胎几乎充满整个卵茧(图 1f); 96 h 时, 胚胎最外层出现神经索(图 1g), 120 h 后出现长吻(图 1h)。144 h 时, 继续变长, 接近圆柱形, 眼点等各部分器官逐渐发育完全, 表面体环越来越均匀密集, 体色不断加深, 此时幼蛭非常活跃, 等待脱茧而出(图 1j、图 1k)。幼蛭脱茧时, 先用头部顶开大圆栓, 然后, 前吸盘带着身

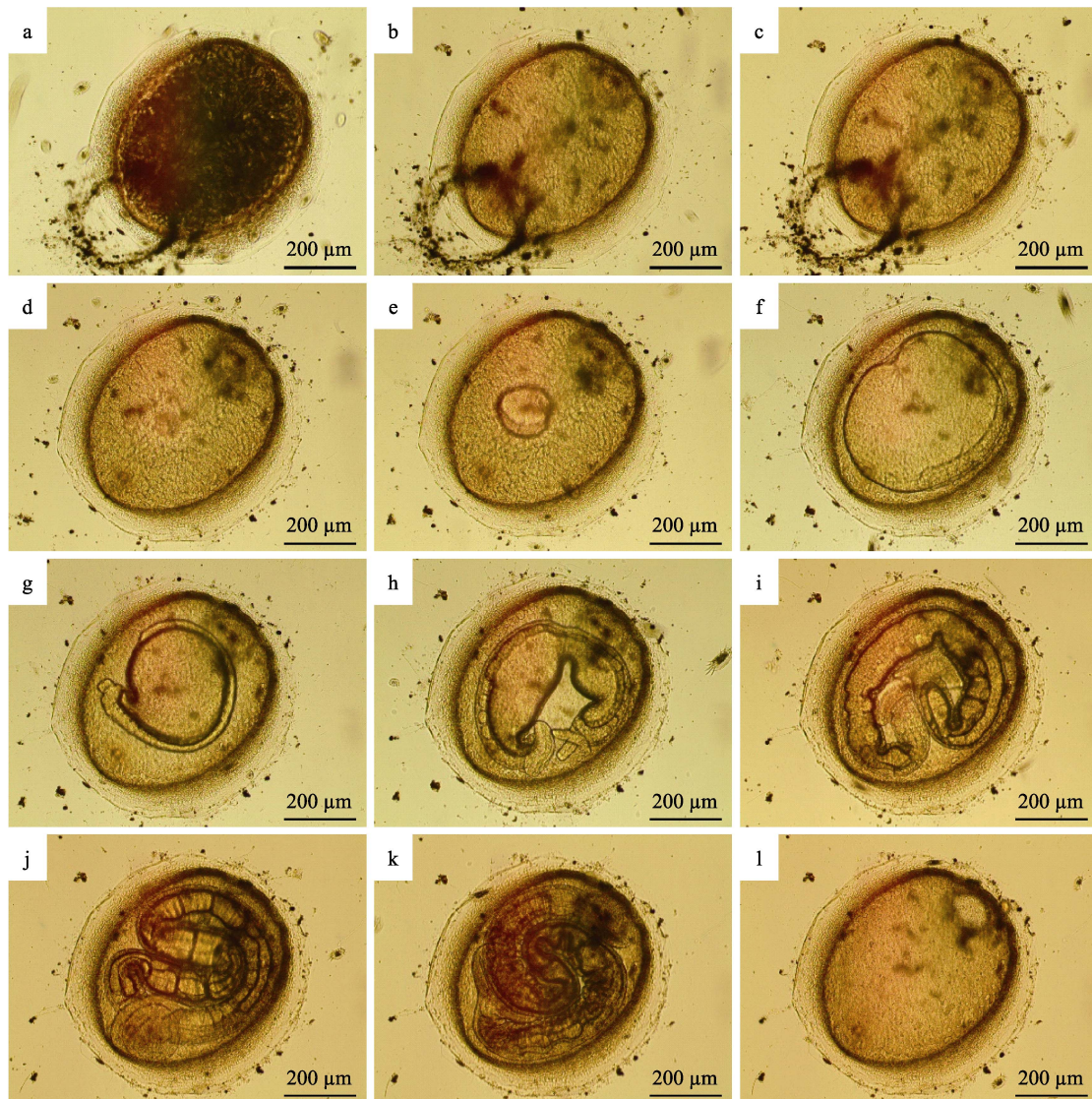


图 1 阿鲁加姆锡兰蛭卵茧的发育

Fig.1 Cocoon development of *Z. arugamensis*

a: 0 h; b: 2 h; c: 12 h; d: 36 h; e: 48 h; f: 72 h; g: 96 h; h: 120 h; i: 144 h; j: 168 h; k: 192 h; l: 216 h

体钻出。由于后吸盘较大，会卡在圆栓开口位置。此时，卵茧仍然附着在细胞培养板壁上，幼蛭用前吸盘吸附在另一处壁上，轻松地将后吸盘拉出。216 h后，幼蛭完全脱离卵茧，只剩下卵茧空壳(图 11)。在海水水温为 26℃、盐度为 30 的条件下，鱼蛭卵茧正常发育为自由游动的幼蛭通常需要 9 d。

新生卵茧如果因各种原因无法固着，便会随水漂流。漂流的卵茧周围水环境条件不稳定，孵化率明显降低。少量的漂流卵茧虽然可孵化成幼蛭，但幼蛭脱茧时后吸盘常常被卡在卵茧中无法出来。此时，可见幼蛭将前吸盘吸附在壁上，用身体后部狂甩卵茧试图脱茧。但由于卵茧不固定，脱茧成功率通常不高。无法成功脱茧的幼蛭，运动和感染能力都受到很大影响，很快便会死亡。

初孵幼蛭身体呈半透明的圆柱状，有前后2个吸盘(图 2a)。前吸盘背面有1对黑色的三角形眼点

(图2b)，颈部有长吻(图2c)。经测量，初孵幼蛭静止时体长为 (1.28 ± 0.08) mm，宽度为 (0.12 ± 0.01) mm ($n=50$)。幼蛭孵出后，如未能感染宿主鱼，则身体不会长大，且在5~8 d后死亡。

2.2.2 幼蛭的发育与成熟 阿鲁加姆锡兰蛭主要寄生在棘颊雀鲷的鳍基部和眼睛等部位。1 d后，幼蛭由于吸食宿主鱼的血液身体变为黑色，体长约为 2.2 mm，身体变粗(图 3a)。幼蛭成熟前以每天 1 mm 以上的速度迅速生长，11 d后，鱼蛭体长达 13 mm 并脱离鱼体开始产卵茧(图 3b)。在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下，初孵幼蛭从感染宿主鱼到自然成熟产茧需要 11 d。鱼蛭体长达 10 mm 为已发育成熟，但如果不脱离鱼体将不会产茧。此时，如果将鱼蛭自鱼体强行分离出来，置于细胞培养板中，在 26℃、盐度 30 的条件下培养，鱼蛭会自然产茧。产过茧的鱼蛭不再感染宿主鱼，而进入衰老期，表现为鱼蛭体表



图 2 阿鲁加姆锡兰蛭初孵幼蛭

Fig.2 The juvenile of *Z. arugamensis*

a: 幼蛭; b 和 c: 前吸盘, 眼点(实线箭头)和长吻(虚线箭头)

a: Juvenile; b and c: Anterior sucker, eyespot (solid arrow) and proboscis (dotted arrow)

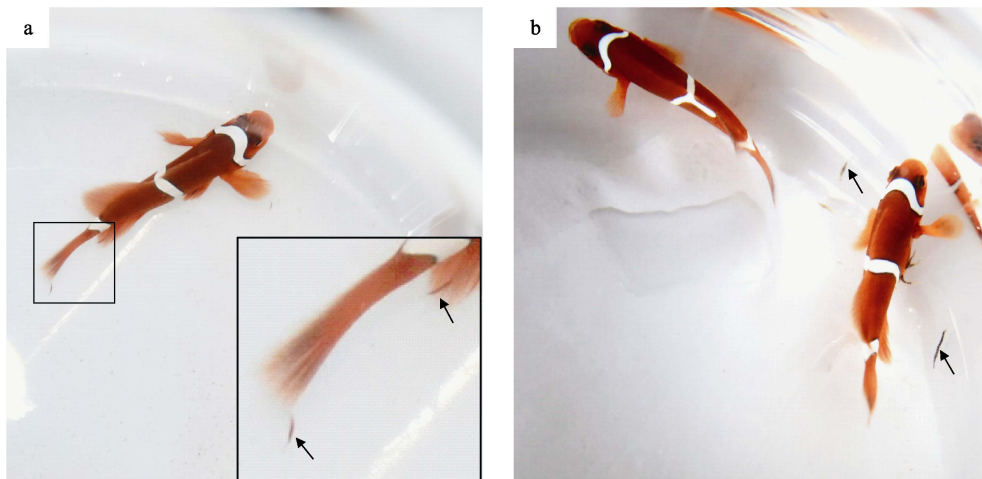


图 3 阿鲁加姆锡兰蛭幼蛭感染棘颊雀鲷

Fig.3 Infestation of *P. biaculeatus* by the juvenile of *Z. arugamensis*

a: 感染 1 d 后; b: 感染 11 d 后。箭头所示为鱼蛭

a: 1 day after infestation; b: 11 days after infestation. Arrows indicate *Z. arugamensis*

花纹变得不清晰, 身体慢慢缩短、膨胀, 活力下降, 运动能力变差。鱼蛭脱离鱼体 9 d 后, 仅为原体长的 1/2, 且后吸盘边缘有缺口, 身体出现坏死部位, 轮廓模糊, 10 d 后死亡。

综上所述, 在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下,

使用棘颊雀鲷或白条双锯鱼在体感染和传代培养阿鲁加姆锡兰蛭, 鱼蛭从卵茧孵化为幼蛭需 9 d, 幼蛭发育为成蛭并产卵茧最短需要 11 d, 即最短 20 d 即可得到新一代鱼蛭。阿鲁加姆锡兰蛭的生活史示意图见图 4。

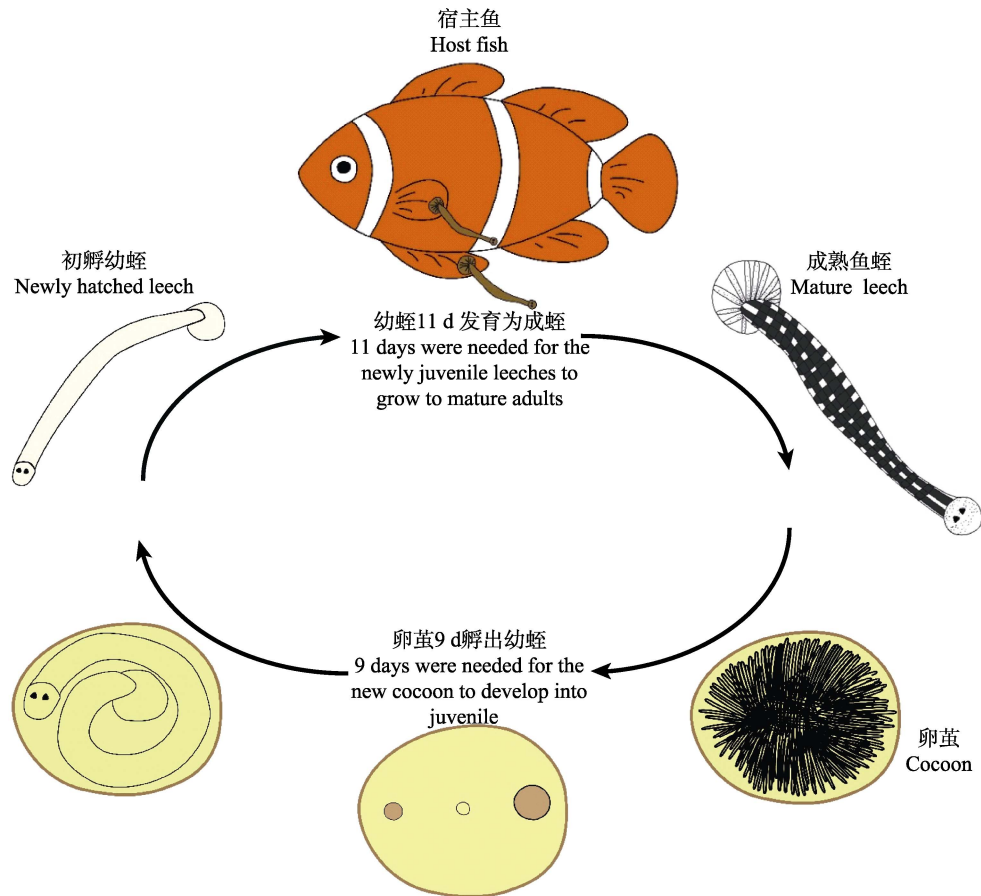


图 4 阿鲁加姆锡兰蛭的生活史
Fig.4 The life cycle of *Z. arugamensis*

3 讨论

阿鲁加姆锡兰蛭尚无正式的中文学名, 不利于该病原的研究和交流。有学者将其种名和属名分别翻译为菲律宾蛭和石斑蛭属(王永波等, 2018), 但其依据不明, 本研究认为不妥。作者分析发现, 该鱼蛭最早由 De Silva(1963)发现并定种为 *Zeylanicobdella arugamensis*。其属名 *Zeylanicobdella* 由 *Zeylanico*-和 *-bdella* 连接而成。其中 *Zeylanico* 是荷兰语词根“锡兰的”; *bdella* 是拉丁语“水蛭”。因此, *Zeylanicobdella* 可以翻译为“锡兰蛭”。该鱼蛭的种加词 *arugamensis* 由 *arugam* 和拉丁语后缀 *-ensis* 组成。其中 *arugam* 是该鱼蛭的发现地点 *Arugam* 泻湖, 其规范的中文名称为“阿鲁加姆”; 拉丁语后缀 *-ensis* 是地名后缀, 即“某

地的(蛭)”。因此, *arugamensis* 可以翻译为“阿鲁加姆(蛭)”。基于上述词源分析, 作者建议将海水鱼蛭 *Zeylanicobdella arugamensis* 的中文属名定为“锡兰蛭属”, 中文种名定为“阿鲁加姆锡兰蛭”(任宁欣, 2020)。

鱼类寄生虫的传代培养对于寄生虫的防治研究具有重要意义(Murwantoko *et al*, 2017; 王永波等, 2011; 刘婷婷等, 2015; 姚嘉赞等, 2019), 目前尚未有阿鲁加姆锡兰蛭传代培养的报道。本研究建立了以棘颊雀鲷和白条双锯鱼为宿主鱼的阿鲁加姆锡兰蛭在体感染和传代培养体系, 传了 9 代后产生的子代鱼蛭仍具有很强的感染力。鉴于棘颊雀鲷和白条双锯鱼易于在实验室内养殖和观察, 本研究建立的阿鲁加姆锡兰蛭传代培养体系可长期、稳定地提供鱼蛭和卵茧供相关研究使用, 具有较强的应用价值。

自然环境下,不同种类鱼蛙喜好的产卵茧地点可能会不同,如鱼蛙 *Notostomum cyclostomum* 将卵茧产在十足目甲壳动物和海蜘蛛的腿或甲壳上,以便传播散布(Khan *et al.*, 1995、1976; Sloan *et al.*, 1984)。调查显示,阿鲁加姆锡兰蛙通常将卵茧产在较硬的基质上面,比如水泥养殖池壁或水管壁上。本研究观察到阿鲁加姆锡兰蛙的卵茧表面有一层粘液层,与 Kua 等(2010)的报道一致。利用这个黏液层,阿鲁加姆锡兰蛙卵茧可牢固地附着在水族箱壁、烧杯壁或者细胞培养板壁上。本研究发现,这种牢固附着对阿鲁加姆锡兰蛙卵茧的孵化和幼蛙的顺利脱茧都十分重要。不能固着的漂流卵茧孵化率低,孵化出的幼蛙脱茧率低、死亡率高。这提示今后可通过深入研究阿鲁加姆锡兰蛙卵茧的附着机制,开发能有效降低卵茧附着率的技术和产品,从而控制虫口密度,防治鱼蛙病。

水温和盐度是影响阿鲁加姆锡兰蛙卵茧孵化和发育的关键因素(Kua *et al.*, 2010, 2014; Murwantoko *et al.*, 2017)。本研究发现,在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下,阿鲁加姆锡兰蛙的卵茧需要 9 d 孵出幼蛙;幼蛙感染棘颊雀鲷或白条双锯鱼后,需要 11 d 才能发育成熟、产下卵茧。即在上述条件下,阿鲁加姆锡兰蛙完成整个生活史需要 20 d。与此前的研究报道均有不同。Kua 等(2010)报道,在 27℃、盐度为 28 的条件下,以尖吻鲈为宿主鱼时,阿鲁加姆锡兰蛙卵茧孵化和幼蛙发育的时间分别为 7 d 和 9~10 d,完成整个生活史需要 16~17 d。Murwantoko 等(2017)在 25℃、盐度为 34 的条件下以杂交石斑鱼(*Epinephelus* sp.)为宿主鱼,卵茧孵化和幼蛙成熟分别需要 12 d 和 9 d,共需要 21 d。作者认为,上述阿鲁加姆锡兰蛙在卵茧孵化和幼蛙发育时长上的差异,主要与水温和盐度条件相关,与宿主鱼种类可能也有一定的关系。文献报道,在水温为 26℃~27℃、盐度为 28 的实验室条件下,阿鲁加姆锡兰蛙的卵茧孵化率介于 46.8%~88.1%之间,平均值为 69.9%。卵茧孵化的最适水温为 25℃~27℃,最适盐度为 28~30。水温、盐度过高或过低,均会显著降低卵茧孵化率,并缩短幼蛙和成蛙的存活时间(Kua *et al.*, 2014)。本研究在水温为 26℃、盐度为 30 的条件下,得到阿鲁加姆锡兰蛙的卵茧孵化率为 83.7%,与上述研究结果基本一致。当然,在鱼蛙卵茧孵化和幼蛙发育的影响因素方面还需要更深入的研究。

致谢: 本研究用于鱼蛙在体感染的棘颊雀鲷和白条双锯鱼由中国水产科学研究院黄海水产研究所马爱军和孙志宾老师惠赠,特此致谢。

参 考 文 献

- Ahne W. *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). *Journal of Fish Diseases*, 1985, 8(2): 241–242
- Cruz-Lacierda ER, Toledo JD, Tan-Fermin JD, *et al.* Marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) infestation in cultured orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 2000, 185(3–4): 191–196
- De Silva PHDH. *Zeylanicobdella arugamensis* gen.nov. and sp.nov. from Arugam Kalapu, Eastern Province, Ceylon. *Spolia Zeylanica*, 1963, 30: 47–53
- Hayes PM, Smit NJ, Seddon AM, *et al.* A new fish haemogregarine from South Africa and its suspected dual transmission with trypanosomes by a marine leech. *Folia Parasitologica*, 2006, 53(4): 241–248
- Khan RA, Meyer MC. Taxonomy and biology of some Newfoundland marine leeches (Rhynchobdellae: Piscicolidae). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1976, 33(8): 1699–1714
- Khan RA, Paul AJ. Life cycle studies on arcto-boreal leeches (Hirudinea). *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 1995, 62(2): 105–110
- Kua BC, Azmi MA, Hamid NKA. Life cycle of the marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from sea bass (*Lates calcarifer*) under laboratory conditions. *Aquaculture*, 2010, 302(3–4): 153–157
- Kua BC, Choong FC, Leaw YY. Effect of salinity and temperature on marine leech, *Zeylanicobdella arugamensis* (De Silva) under laboratory conditions. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(3): 201–207
- Kua BC, Eugene MB, Oo MG. Morphology of haematophagous marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from body of sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings. *Malaysian Fisheries Journal*, 2009, 8(1): 17–21
- Liu TT, Tang XQ, Zhou L. The pesticidal effects of Chinese herbal medicine on the trophonts and the theronts of ciliate *Cryptocaryon irritans* and the influence of temperature and salinity on the cyst rupture. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 113–120 [刘婷婷, 唐小千, 周丽. 15 种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的杀灭效果及包裹破裂的条件. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 113–120]
- Mulcahy D, Klaybor D, Batts WN. Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from a leech (*Piscicola salmositica*) and a copepod (*Salmincola* sp.), ectoparasites of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1990, 8(1): 29–34
- Murwantoko, Negoro SLC, Isnansetyo A, *et al.* Life cycle of marine leech from cultured “Cantik” hybrid grouper (*Epinephelus* sp.) and their susceptibility against chemicals. *Aquacultura Indonesiana*, 2017, 18(2): 72–76
- Nagasawa K, Shimadzu N, Ikeda Y. Four new host records for the fish leech *Zeylanicobdella arugamensis* (Hirudinida: Piscicolidae), with an updated host list (1963–2012). *Biogeography*, 2012, 14: 143–146
- Ravi R, Yahaya ZS. *Zeylanicobdella arugamensis*, the marine leech from cultured crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*), Jerejak Island, Penang, Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(5): 473–477
- Ren NX. Study on biological characteristics and detection method of the marine leech *Zeylanicobdella arugamensis*. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 [任宁欣. 海水鱼蛙阿鲁加姆锡兰蛙(*Zeylanicobdella arugamensis*)的生物学特性与检测技术研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- Sloan NA, Bower SM, Robinson SMC. Cocoon deposition on

- three crab species and fish parasitism by the leech *Notostomum cyclostoma* from deep fjords in northern British Columbia. *Marine Ecology Progress Series*, 1984, 20(1-2): 51-58
- Wang YB, Fu SY, Li BS, *et al.* Prevention and control of the leech from grouper in farm environment. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*, 2011, 2(1): 59-62 [王永波, 符书源, 李丙顺, 等. 池塘养殖石斑鱼鱼蛭病防治实验. *热带生物学报*, 2011, 2(1): 59-62]
- Wang YB, Liu JY, Chen FX, *et al.* Leech *Zeylanicobdella arugamensis* Parasitic of grouper culture in Hainan. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2018, 36(3): 262-270 [王永波, 刘金叶, 陈傅晓, 等. 对海南地区石斑鱼养殖中鱼蛭病的初步研究. *海南大学学报(自然科学版)*, 2018, 36(3): 262-270]
- Williams JI, Bureson EM. Phylogeny of the fish leeches (Oligochaeta, Hirudinida, Piscicolidae) based on nuclear and mitochondrial genes and morphology. *Zoologica Scripta*, 2006, 35(6): 627-639
- Yao JY, Xu Y, Yuan XM, *et al.* Synthesis of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives and its antiparasitic activity against *Ichthyophthirius multifiliis* *in vitro*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 141-146 [姚嘉赞, 徐洋, 袁雪梅, 等. 四氢异喹啉衍生物的合成及体外抗多子小瓜虫活性的研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 141-146]
- Zhang W, Sun ZB, Ma AJ, *et al.* Studies on comparative embryology and discussion of evolutiology in four varieties of amphiprion. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(3): 671-681 [张薇, 孙志宾, 马爱军, 等. 双锯鱼属 (*Amphiprion*)四种鱼种比较胚胎学研究和进化探讨. *海洋与湖沼*, 2018, 49(3): 671-681]

(编辑 马瑾艳)

In vivo* Infestation and Life Cycle Observation of Marine Leech *Zeylanicobdella arugamensis

REN Ningxin^{1,2}, SHI Chengyin¹Ⓐ, WAN Xiaoyuan¹, XIE Guosi¹, WANG Renbao^{1,2}, WANG Haibo¹

(1. 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 Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Zeylanicobdella arugamensis* is an important ectoparasitic leech that can infest more than 30 species of marine fish. Diseases associated with *Z. arugamensis* are prevalent in China and many countries of Southeast Asia, and frequently cause the death of cultured marine fishes. In order to continually and steadily provide sufficient live leeches and cocoons for the research of the prevention and treatment of *Z. arugamensis*, this study established a propagation method for *Z. arugamensis* through *in vivo* infestation experiments, and proved that two ornamental fish species, spinecheek anemonefish (*Premnas biaculeatus*) and tomato anemonefish (*Amphiprion frenatus*), were suitable for use as fish hosts. The parasite descendants generated by the *in vivo* propagation method are still very transmittable after nine generations. This study also used micrography to observe cocoons and the life cycle of propagated fish leeches. The results showed that the average cocoon size of *Z. arugamensis* was (0.66±0.06) mm, and there was only one fertilized egg in each cocoon. The life cycle of *Z. arugamensis* can be divided into two stages: The cocoon hatching stage and the juvenile development stage. Under a seawater temperature of 26°C and salinity of 30, *Z. arugamensis* can complete its life cycle in as short as 20 days. The cocoons of *Z. arugamensis* developed into juvenile leeches in nine days, with a hatching rate as high as 83.8%. The juvenile leeches subsequently infected the host fish, grew to mature adults, and produced new cocoons in 11 days. This article confirmed for the first time that *P. biaculeatus* and *A. frenatus* were both susceptible hosts for *Z. arugamensis*. This study not only established an *in vivo* propagation method for *Z. arugamensis*, but also provided technical support for research on the pathogen, pathology, pathogenic mechanism, detection, and prevention of leech diseases related to *Z. arugamensis*.

Key words Fish leech (*Zeylanicobdella arugamensis*); *In vivo* Infestation; Life cycle; Spinecheek anemonefish (*Premnas biaculeatus*); Tomato anemonefish (*Amphiprion frenatus*)

Ⓐ Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191231001

http://www.yykxjz.cn/

周剑, 赵仲孟, 黄志鹏, 赵瀚, 李强, 张露, 柯红雨, 苏旭涛, 肖宇, 杜军. 池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝脏营养成分比较. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 162-169

Zhou J, Zhao ZM, Huang ZP, Zhao H, Li Q, Zhang L, Ke HY, Su XT, Xiao Y, Du J. Comparison of nutrient components in muscles and hepatopancreas of pond- and paddy field-cultured *Procambarus clarkii*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 162-169

池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和 肝脏营养成分比较*



周 剑 赵仲孟 黄志鹏 赵 瀚 李 强 张 露
柯红雨 苏旭涛 肖 宇 杜 军^①

(四川省农业科学院水产研究所 成都 611730)

摘要 通过对池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的肌肉常规营养成分进行测定,同时,对肌肉和肝胰腺的氨基酸和脂肪酸组成进行测定,从而对其营养品质进行分析评价。结果显示,2 种养殖模式下克氏原螯虾粗蛋白和粗脂肪无显著性差异($P>0.05$),池塘养殖模式下水分显著高于稻田模式($P<0.05$),而粗灰分显著低于稻田模式($P<0.05$)。在 2 种模式下肌肉和肝胰腺中均检测出 17 种氨基酸,包括 7 种必需氨基酸和 4 种鲜味氨基酸。2 种养殖模式下肌肉的必需氨基酸总含量占氨基酸总量(W_{EAA}/W_{TAA})值无显著性差异($P>0.05$),而肝胰腺中池塘养殖模式 W_{EAA}/W_{TAA} 值显著高于稻田模式($P<0.05$)。根据氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS),克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中第一限制氨基酸均为甲硫氨酸+胱氨酸,肌肉中第二限制氨基酸为缬氨酸,肝胰腺中第二限制氨基酸为亮氨酸。另外,在肌肉中检测出 20 种脂肪酸,而在肝胰腺中检测出 24 种脂肪酸,其中,肌肉和肝胰腺中饱和脂肪酸含量最高的是棕榈酸(C16:0);单不饱和脂肪酸含量最高的是油酸(C18:1n9c)。研究表明,池塘和稻田 2 种养殖模式下的克氏原螯虾,肌肉和肝胰腺均具有较高的食用价值和营养价值。

关键词 克氏原螯虾;池塘;稻田;营养价值;比较分析

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0162-08

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)又称淡水小龙虾,隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae)、原螯虾属(*Procambarus*)(王顺昌,2003)。克氏原螯虾因其食性杂、生长速度快、适应能力强等原因,在当地的生态环境中能够迅速成为绝对优势种(舒新亚,2014)。又因其肉质鲜美而广受消费者喜欢,进入

中国市场后,已经成为重要的甲壳经济物种(刘红等,2014)。

克氏原螯虾虽出肉率不高,但是营养丰富,其蛋白质成分高于大多数淡水和海水鱼虾。除肌肉部分可供人食用外,克氏原螯虾的肝胰腺也可食用,其具有蟹黄味,营养物质含量丰富,被称之为“虾黄”。目前,除研究克氏原螯虾饲料中营养素的需求外(Dong

* 四川省农业科学院公益性研究深化工程项目(2016GYSH-020)资助 [This work was supported by the Sichuan Academy of Agricultural Sciences Public Welfare Research Deepening Project (2016GYSH-020)]. 周 剑, E-mail: zhoujian980@126.com

^① 通讯作者: 杜 军, 研究员, E-mail: dujun9100@126.com

收稿日期: 2019-12-31, 收修改稿日期: 2020-03-15

et al, 2013; *Zhu et al*, 2010; 李强等, 2013; 徐维娜等, 2011), 对于克氏原螯虾的营养成分分析也有研究。其中, 丁建英等(2010)采用常规方法对江苏野生克氏原螯虾肌肉进行营养成分分析, 在克氏原螯虾肌肉中测出 17 种氨基酸和 15 种脂肪酸, 其必需氨基酸含量远高于其他淡水虾类。唐黎等(2018)分析测定了贵州稻田养殖的克氏原螯虾的肌肉含肉率及营养成分, 结果发现, 克氏原螯虾含肉率为(18.40±1.60)%, 检测出 17 种氨基酸, 并对其钙、磷和常规营养成分进行测定。此外, 易瑞恺等(2013)对鄱阳湖克氏原螯虾肌肉营养成分进行了分析与评价, 而田娟等(2017)对洞庭湖克氏原螯虾的肌肉也进行了分析。

目前, 克氏原螯虾在四川的产量逐年递增, 据统计, 2018 年克氏原螯虾产量达 1.48 万 t, 其养殖模式主要以稻田和池塘为主。本研究通过对四川省池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾的肌肉和肝胰腺营养成分进行分析测定, 比较分析 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺的营养成分差异, 旨在为克氏原螯虾的人工养殖及饲养条件提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及样品处理

实验虾取自四川省崇州市王场镇, 其中, 池塘面积为 3200 m², 平均水深为 1.7 m, 稻田面积为 4100 m², 平均水深为 1.5 m。在池塘和稻田 2 种养殖模式下, 养殖水源和放养规格均一致(虾苗放养规格为(2.5±0.5) g, 其中池塘放养密度为 10000 尾/亩, 稻田放养密度为 4000 尾/亩。养殖期间, 每天分 2 个时间点(09:00 和 18:00)进行饲料喂食, 实验期间采用蛋白含量为 30%的商业小龙虾配合饲料进行投喂, 每天投喂量占虾苗总体重的 3%的饲料(下午投喂量为总投喂量的 70%)。每次投喂前, 用投料台观察吃食情况, 按需要对投喂量进行调整。实验期间, 定期对养殖塘水质进行检测, 并且每个养殖塘每周定期更换 1/5 的养殖用水。

经过为期 21 d 的养殖实验后, 在不同养殖模式塘中, 随机选取体格健壮、附肢完好、规格均一的克氏原螯虾各 15 尾, 其中, 池塘养殖模式的克氏原螯虾体长为(8.41±0.29) cm, 体重为(14.37±0.89) g; 稻田养殖模式的克氏原螯虾体长为(8.18±0.43) cm, 体重为(15.89±1.56) g。每个组各预留 5 只克氏原螯虾置于-21℃保存, 用于后续的体成分分析。剩余的 10 只虾用常规组织取样法取肌肉和肝胰腺, 并且每只虾所取组织单独保存, 用于后续的氨基酸和脂肪酸成分分析。

1.2 检测方法

分别对各组预留的 5 只克氏原螯虾每个个体单独进行常规营养成分测定: 根据 GB 5009.3-2016, 测定肌肉中水分; 根据 GB 5009.4-2016 测定肌肉粗灰分含量; 根据 GB 5009.5-2016 测定肌肉粗蛋白含量; 根据 GB 5009.6-2016 测定肌肉粗脂肪含量。

分别对各组 10 只克氏原螯虾的肌肉和肝胰腺单独进行氨基酸和脂肪酸含量的测定: 本研究中, 氨基酸采用 GB 5009.124-2016 微波辅助酸水解法进行测定, 脂肪酸采用 GB 5009.168-2016 法进行测定。

1.3 营养品质的评定方法

根据联合国粮食及农业组织(FAO)和世界卫生组织(WHO) 1973 年建议的氨基酸评分标准模式和中国预防医学科学院营养与食品卫生所提出的全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式进行比较, 按下述公式计算氨基酸评分(Amino acid score, AAS)、化学评分(Chemical score, CS)和必需氨基酸指数(Essential amino acid index, EAAI):

$$AAS = \frac{\text{待测蛋白氨基酸含量(mg/gN)}}{\text{FAO/WHO评分模式氨基酸含量(mg/gN)}}$$

$$CS = \frac{\text{待测蛋白氨基酸含量(mg/gN)}}{\text{全鸡蛋蛋白质同种氨基酸含量(mg/gN)}}$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{AE} \times \frac{100B}{BE} \times \frac{100C}{CE} \cdots \times \frac{100J}{JE}}$$

氨基酸含量(mg/g)=鲜样氨基酸含量百分比/鲜样粗蛋白含量百分比×6.25×1000

式中, n 为氨基酸中需要比较的必需氨基酸个数; AE、BE、……、JE 为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(mg/gN); A、B、……、J 为克氏原螯虾肌肉或肝胰腺蛋白质的必需氨基酸含量(mg/gN)。

1.4 数据处理

用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计分析, 稻田和池塘养殖模式下样本间的差异使用独立样本 t 检验, 使用 Levene's test 进行方差齐性检验, 描述性统计值使用平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 常规营养成分

池塘养殖模式下克氏原螯虾肌肉粗蛋白和粗脂肪含量低于稻田养殖模式, 但差异并不显著($P>0.05$), 而粗灰分含量显著低于稻田养殖模式($P<0.05$)。另外, 池塘养殖模式下的克氏原螯虾肌肉的水分含量显著高于稻田模式($P<0.05$)(表 1)。

表 1 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉中
主要营养物质(平均值±标准差) (%湿重)

Tab.1 Nutrient components in muscles of the
P. clarkii in two culture models
(Mean±SD) (% wet weight)

一般营养成分 General nutrient components	池塘 Pond	稻田 Paddy field
水分 Moisture (%)	72.67±1.05 ^a	68.03±0.61 ^b
粗脂肪 Crude fat	1.00±0.22 ^a	1.03±0.69 ^a
粗灰分 Ash	9.60±1.20 ^a	12.43±0.78 ^b
粗蛋白 Crude protein	10.69±0.94 ^a	11.70±0.78 ^a

注：同一行数据具有不同右上标字母表示差异显著 ($P<0.05$)，下同

Note: Different right superscript letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

2.2 氨基酸组成

在池塘和稻田 2 种模式下的克氏原螯虾肌肉中共检测出 17 种氨基酸(表 2)，氨基酸总含量分别为 17.0%和 11.2%。池塘养殖模式下克氏原螯虾肌肉中氨基酸总量、必需氨基酸和鲜味氨基酸高于稻田养殖模式，但均未达到显著差异($P>0.05$)，而鲜味氨基酸总含量占氨基酸总量(W_{DAA}/W_{TAA})的比值显著高于稻田养殖模式($P<0.05$)。除此之外，池塘养殖模式下克氏原螯虾的肌肉中必需氨基酸总含量占氨基酸总量(W_{EAA}/W_{TAA})的比值低于稻田养殖模式，未达到显著差异($P>0.05$)，而必需氨基酸总含量占非必需氨基酸总量(W_{EAA}/W_{NEAA})的比值显著低于稻田养殖模式($P<0.05$)。

表 2 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中氨基酸组成及含量(平均值±标准差) (%湿重)

Tab.2 Amino acids composition in muscles and hepatopancreas of the *P. clarkii*
in two culture models (Mean±SD) (% wet weight) (mg/g)

氨基酸 Amino acids	肌肉 Muscle		肝胰腺 Hepatopancreas	
	池塘 Pond	稻田 Paddy field	池塘 Pond	稻田 Paddy field
天门冬氨酸 [#] Asp	17.87±0.10	11.85±0.12	6.70±0.04	6.40±0.07
苏氨酸* Thr	6.53±0.05	4.80±0.03	3.53±0.02 ^a	3.27±0.02 ^b
丝氨酸 Ser	6.77±0.04 ^A	4.80±0.03 ^B	3.23±0.02 ^a	2.80±0.03 ^b
谷氨酸 [#] Glu	29.17±0.20	18.75±0.08	9.37±0.05	9.77±0.14
甘氨酸 [#] Gly	8.37±0.08 ^A	5.15±0.07 ^B	4.30±0.05 ^a	3.50±0.03 ^b
丙氨酸 [#] Ala	10.93±0.05 ^A	6.70±0.05 ^B	3.63±0.02	3.63±0.01
胱氨酸 Cys	1.03±0.00 ^A	1.25±0.01 ^B	1.60±0.00 ^a	1.07±0.02 ^b
缬氨酸* Val	7.17±0.03	5.20±0.03	3.63±0.02	3.50±0.01
蛋氨酸* Met	4.27±0.02	2.70±0.02	1.43±0.01 ^a	1.33±0.00 ^b
异亮氨酸* Ile	7.67±0.03	4.95±0.05	2.97±0.02 ^a	2.80±0.01 ^b
亮氨酸* Leu	13.57±0.07	8.85±0.09	5.13±0.03 ^a	4.87±0.02 ^b
酪氨酸 Tyr	6.37±0.03 ^A	4.55±0.03 ^B	3.33±0.02 ^a	3.03±0.04 ^b
苯丙氨酸* Phe	7.07±0.04	4.80±0.05	3.20±0.02	3.03±0.02
赖氨酸* Lys	14.37±0.08	8.95±0.09	4.27±0.04 ^a	3.83±0.02 ^b
组氨酸 His	3.77±0.02	2.70±0.01	2.07±0.01 ^a	1.93±0.01 ^b
精氨酸 Arg	19.40±0.04 ^A	12.45±0.10 ^B	5.40±0.05 ^a	4.80±0.03 ^b
脯氨酸 Pro	5.37±0.04	3.65±0.04	2.60±0.01	2.50±0.02
氨基酸总量 W_{TAA}	169.80±0.70	111.90±0.82	66.47±0.40 ^a	62.20±0.27 ^b
必需氨基酸总量 W_{EAA}	63.78±0.32	43.35±0.33	27.66±0.16 ^a	25.40±0.09 ^b
鲜味氨基酸总量 W_{DAA}	66.34±0.23	42.45±0.32	24.00±0.14	23.30±0.14
非必需氨基酸总量 W_{NEAA}	109.03±0.39 ^A	71.85±0.48 ^B	42.23±0.24 ^a	39.44±0.22 ^b
W_{EAA}/W_{TAA} (%)	37.56	38.74	41.61 ^a	40.84 ^b
W_{EAA}/W_{NEAA} (%)	58.50 ^A	60.33 ^B	65.50 ^a	64.40 ^b
W_{DAA}/W_{TAA} (%)	39.07 ^A	37.94 ^B	36.11 ^a	37.46 ^b

注：*代表必需氨基酸；#代表鲜味氨基酸。不同养殖模式下肌肉中氨基酸含量差异用大写字母 A 和 B 表示，不同养殖模式下肝胰腺中氨基酸含量差异用小写字母 a 和 b 表示

Note: *: Essential amino acids; #: Flavor amino acid. The difference of amino acid content in muscle under different culture modes is indicated by capital letters A and B. The difference of amino acid content in hepatopancreas under different culture modes is indicated by lowercase letters a and b

同样地, 池塘养殖模式下克氏原螯虾肝胰腺中氨基酸总量和必需氨基酸总量显著高于稻田养殖模式 ($P<0.05$), 而鲜味氨基酸总量高于稻田养殖模式, 但差异并不显著 ($P>0.05$)。另外, 池塘养殖模式下克氏原螯虾肝胰腺中 W_{EAA}/W_{TAA} 和 W_{EAA}/W_{NEAA} 均显著高于稻田养殖模式 ($P<0.05$), 而 W_{DAA}/W_{TAA} 显著低于稻田养殖模式 ($P<0.05$)。

2.3 肌肉营养品质评价

通过计算得出池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺的 AAS 和 CS 值, 池塘养殖模式下克氏原螯虾肌肉中必需氨基酸的 AAS 在 0.27~2.47,

肝胰腺中必需氨基酸的 AAS 在 0.43~1.01; 稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉中必需氨基酸的 AAS 在 0.30~1.41, 肝胰腺中必需氨基酸的 AAS 在 0.26~0.85 (表 3 和表 4)。根据 AAS 评分, 池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中的第一限制氨基酸均为甲硫氨酸+胱氨酸; 池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉的第二限制氨基酸为缬氨酸; 池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾肝胰腺的第二限制氨基酸为亮氨酸。根据 CS 评分, 池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中的第一限制氨基酸也均为甲硫氨酸+胱氨酸; 而第二限制氨基酸均为缬氨酸。

表 3 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉中氨基酸评分和化学评分

Tab.3 Comparative analysis of AAS and CS in muscles of the *P. clarkii* between two culture models

必需氨基酸种类 EAA	氨基酸含量 Amino acid contents		FAO 评分模 式标准含量 FAO score model	全鸡蛋蛋白 质标准含量 Egg score model	稻田 Paddy field		池塘 Pond	
	稻田 Paddy field	池塘 Pond			氨基酸评分 值 AAS	化学评分 值 CS	氨基酸评分 值 AAS	化学评分 值 CS
亮氨酸 Leu	473	793	440	534	1.08	0.89	1.80	1.49
异亮氨酸 Ile	264	448	250	331	1.06	0.80	1.79	1.35
赖氨酸 Lys	478	840	340	441	1.41	1.08	2.47	1.90
苏氨酸 Thr	256	382	250	292	1.02	0.88	1.53	1.31
缬氨酸 Val	278	419	310	411	0.90	0.68	1.35	1.02
苯丙+酪氨酸 Phe+Tyr	499	785	380	565	1.31	0.88	2.07	1.39
甲硫+胱氨酸 Met+Cys	67	60	220	386	0.30	0.17	0.27	0.16
总计 Total	2315	3727	2190	2960				

表 4 2 种养殖模式下克氏原螯虾肝胰腺中氨基酸评分和化学评分

Tab.4 Comparative analysis of AAS and CS in hepatopancreas of the *P. clarki* between two culture models

必需氨基酸 EAA	氨基酸含量 Amino acid contents		FAO 评分模 式标准含量 FAO score model	全鸡蛋蛋白 质标准含量 Egg score model	稻田 Paddy field		池塘 Pond	
	稻田 Paddy field	池塘 Pond			氨基酸评分 值 AAS	化学评分 值 CS	氨基酸评分 值 AAS	化学评分 值 CS
亮氨酸 Leu	260	300	440	534	0.59	0.49	0.68	0.56
异亮氨酸 Ile	150	174	250	331	0.60	0.45	0.70	0.53
赖氨酸 Lys	205	250	340	441	0.60	0.46	0.74	0.57
苏氨酸 Thr	175	206	250	292	0.70	0.60	0.82	0.71
缬氨酸 Val	187	212	310	411	0.60	0.45	0.68	0.52
苯丙+酪氨酸 Phe+Tyr	324	382	380	565	0.85	0.57	1.01	0.68
甲硫+胱氨酸 Met+Cys	57	94	220	386	0.26	0.15	0.43	0.24
总计 Total	1358	1618	2190	2960				

2.4 脂肪酸组成

在克氏原螯虾的肌肉中共检测出 20 种脂肪酸, 包括饱和脂肪酸(Saturated fatty acid, SFA)9 种, 单不

饱和脂肪酸(Monounsaturated fatty acid, MUFA)3 种, 多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA) 8 种(表 5)。其中, 池塘养殖模式下肌肉 SFA 占肌肉干重的 34.71%, 显著高于稻田养殖模式下的 31.37%;

池塘养殖模式下肌肉 MUFA 占肌肉干重的 23.29%，同样显著高于稻田养殖模式下的 21.93%；而池塘养殖模式下肌肉 PUFA 占肌肉干重的 41.54%，显著低于稻田养殖模式下的 46.23%。此外，在肝胰腺中，除肌肉中检测出的 20 种脂肪酸外，在 SFA 中还检测出葵酸(C10:0)和月桂酸(C12:0)，MUFA 中还检测出十七烷酸(C17:0)，在 PUFA 中还检测出 γ -亚油酸(C18:3n6)。其中，池塘养殖模式下肝胰腺中 SFA 占肝脏干重的 35.11%，显著高于稻田养殖模式下的

31.11%；池塘养殖模式下肝胰腺中 MUFA 占肝脏干重的 36.44%，显著高于稻田养殖模式下的 30.02%；而池塘养殖模式下肝胰腺中 PUFA 占肝脏干重的 26.85%，显著低于稻田养殖模式下的 37.72%。

在 2 种养殖模式下，克氏原螯虾的肌肉和肝胰腺中 SFA 含量最高的是棕榈酸(C16:0)；MUFA 含量最高的是油酸(C18:1n9c)；而 PUFA 在肌肉中含量最高的是顺式-5,8,11,14,17-二十碳烯酸(C20:5n3)，在肝胰腺中含量最高的是亚油酸(C18:2n6c)。

表 5 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中脂肪酸组成及含量(平均值 \pm 标准差)(%湿重)
Tab.5 Fatty acids composition in muscles and hepatopancreas of the *P. clarkii* in two culture models (Mean \pm SD) (% wet weight)

肌肉 Muscles			肝胰腺 Hepatopancreas		
脂肪酸 Fatty acid	池塘 Pond	稻田 Paddy field	脂肪酸 Fatty acid	池塘 Pond	稻田 Paddy field
C14:0	0.73 \pm 0.08 ^A	0.61 \pm 0.01 ^B	C10:0	0.05 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.01 ^b
C15:0	1.13 \pm 0.09 ^A	0.91 \pm 0.01 ^B	C12:0	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
C16:0	19.33 \pm 0.68 ^A	16.80 \pm 0.10 ^B	C14:0	1.13 \pm 0.23	1.11 \pm 0.04
C17:0	1.29 \pm 0.04	1.29 \pm 0.05	C15:0	1.15 \pm 0.11	1.21 \pm 0.03
C18:0	9.51 \pm 0.35	9.37 \pm 0.03	C16:0	25.43 \pm 0.71 ^a	21.13 \pm 0.47 ^b
C20:0	1.13 \pm 0.08 ^A	1.04 \pm 0.01 ^B	C17:0	0.73 \pm 0.02 ^a	0.98 \pm 0.13 ^b
C21:0	0.24 \pm 0.01 ^A	0.27 \pm 0.03 ^B	C18:0	4.75 \pm 0.11 ^a	4.19 \pm 0.26 ^b
C22:0	1.03 \pm 0.06 ^A	0.80 \pm 0.06 ^B	C20:0	0.54 \pm 0.05 ^a	0.61 \pm 0.04 ^b
C23:0	0.32 \pm 0.02	0.30 \pm 0.04	C21:0	0.25 \pm 0.03 ^a	0.38 \pm 0.04 ^b
Σ SFA	34.71 \pm 0.90 ^A	31.37 \pm 0.26 ^B	C22:0	0.53 \pm 0.04 ^a	0.73 \pm 0.02 ^b
C16:1	2.31 \pm 0.61	2.01 \pm 0.16	C23:0	0.51 \pm 0.05 ^a	0.70 \pm 0.03 ^b
C18:1n9c	20.40 \pm 0.71 ^A	19.20 \pm 0.50 ^B	Σ SFA	35.11 \pm 0.03 ^a	31.11 \pm 0.89 ^b
C20:1	0.58 \pm 0.03 ^A	0.72 \pm 0.10 ^B	C16:1	6.60 \pm 0.32 ^a	4.91 \pm 0.10 ^b
Σ MUFA	23.29 \pm 0.67 ^A	21.93 \pm 0.44 ^B	C17:1	0.64 \pm 0.07 ^a	0.75 \pm 0.02 ^b
C18:2n6c	12.13 \pm 0.81	12.60 \pm 0.10	C18:1n9c	28.87 \pm 0.10 ^a	23.83 \pm 0.17 ^b
C18:3n3	2.80 \pm 0.30 ^A	4.08 \pm 0.60 ^B	C20:1	0.34 \pm 0.04 ^a	0.53 \pm 0.04 ^b
C20:2	1.28 \pm 0.25	1.22 \pm 0.08	Σ MUFA	36.44 \pm 0.78 ^a	30.02 \pm 0.28 ^b
C20:3n6	0.73 \pm 0.15	0.66 \pm 0.01	C18:2n6c	19.83 \pm 0.22 ^a	25.23 \pm 0.10 ^b
C20:3n3	0.53 \pm 0.03 ^A	0.55 \pm 0.01 ^B	C18:3n6	0.24 \pm 0.06 ^a	0.49 \pm 0.02 ^b
C20:4n6	7.46 \pm 0.49	7.18 \pm 0.16	C18:3n3	3.22 \pm 0.41 ^a	7.44 \pm 0.68 ^b
C20:5n3(EPA)	12.37 \pm 0.47 ^A	13.70 \pm 0.1 ^B	C20:2	0.39 \pm 0.03 ^a	0.50 \pm 0.08 ^b
C22:6n3(DHA)	4.25 \pm 0.19 ^A	6.25 \pm 0.12 ^B	C20:3n6	0.17 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.04 ^b
Σ PUFA	41.54 \pm 1.25 ^A	46.23 \pm 0.26 ^B	C20:3n3	0.17 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.04 ^b
			C20:4n6	1.28 \pm 0.23 ^a	1.63 \pm 0.29 ^b
			C20:5n3(EPA)	1.16 \pm 0.26	1.28 \pm 0.55
			C22:6n3(DHA)	0.38 \pm 0.09 ^a	0.67 \pm 0.04 ^b
			Σ PUFA	26.85 \pm 1.45 ^a	37.72 \pm 1.69 ^b

注：不同养殖模式下肌肉中脂肪酸含量差异用大写字母 A 和 B 表示，不同养殖模式下肝胰腺中脂肪酸含量差异用小写字母 a 和 b 表示

Note: The difference of fatty acid content in muscle under different culture modes is indicated by capital letters A and B. The difference of fatty acid content in hepatopancreas under different culture modes is indicated by lowercase letters a and b

3 讨论

3.1 克氏原螯虾常规营养成分分析

常规营养成分测定主要包括粗蛋白、水分、粗脂肪和粗灰分的测定。其中,蛋白质是组成动物一切细胞、组织的重要成分,机体所有重要的组成部分都需要蛋白质的参加。食品中蛋白质含量的多少,虽然不能决定一种食品营养价值的高低,但评定一种食品蛋白质营养价值时,应以蛋白质含量为基础(王放等,1996)。本研究中,池塘和稻田 2 种养殖模式下克氏原螯虾的粗蛋白含量无显著性差异,与其他已报导的克氏原螯虾营养成分相比,本研究的克氏原螯虾粗蛋白含量低于易瑞恺等(2013)研究的鄱阳湖克氏原螯虾,同时低于洞庭湖、常熟市和盱眙地区(丁建英等,2010;田娟等,2017;刘平等,2011),这可能是由于各地区温度、水体环境的变化及饲养方式的不同导致。本研究 2 种模式下的克氏原螯虾的水分含量在 70% 左右,低于洞庭湖、鄱阳湖和常熟等地区,同时低于红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和日本对虾(*Penaeus japonicus*) (吴志新等,1995;庄平等,2008;陈晓汉等,2001;姚根媒等,1981;许星鸿等,2011)。脂肪是虾体能量的来源,本研究克氏原螯虾粗脂肪含量低于常熟市,高于洞庭湖,与鄱阳湖的克氏原螯虾接近(丁建英等,2010;田娟等,2017;易瑞恺等,2013)。另外,粗脂肪含量高于红螯螯虾和南美白对虾等其他虾类,这可能是由于克氏原螯虾耐低氧且生存能力强的原因(吴志新等,1995;陈晓汉等,2001)。

3.2 克氏原螯虾营养品质的评价

根据 FAO/WHO 的理想模式,必需氨基酸占氨基酸总量的比值(W_{EAA}/W_{TAA})为 40% 左右,必需氨基酸与非必需氨基酸的比值(W_{EAA}/W_{NEAA})在 60% 以上的为质量较好的蛋白质(Pellet *et al.*, 1980)。本研究中,池塘养殖模式下克氏原螯虾肌肉的 W_{EAA}/W_{TAA} 值低于稻田养殖模式,但差异并不显著($P>0.05$),而 W_{EAA}/W_{NEAA} 值显著低于稻田养殖模式($P<0.05$),说明稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉的蛋白质质量较池塘养殖模式蛋白质质量高,但均符合 FAO/WHO 标准模式对质量较好的蛋白质氨基酸组成的要求。而 2 种养殖模式下克氏原螯虾肝胰腺的 W_{EAA}/W_{TAA} 值和 W_{EAA}/W_{NEAA} 值均分别高于 40% 和 60%,说明 2 种模式下克

氏原螯虾的肝胰腺氨基酸组成符合上述指标要求,属于优质蛋白质。在肌肉中,2 种养殖模式下必需氨基酸含量最高的均为赖氨酸,均超过 FAO/WHO 模式和鸡蛋蛋白质,而赖氨酸是乳液中第一限制性氨基酸,并有“生长氨基酸”之称,食用克氏原螯虾可以弥补以谷物为主的膳食者食物中赖氨酸的不足,从而提高蛋白质的利用率(周均等,2006)。除此之外,赖氨酸含量还高于凡纳滨对虾和南极拟扇虾(*Parribacus antarcticus*),低于安氏白虾(*Exopalaemon annandalei*)和日本沼虾(陈晓汉等,2001;初庆柱等,2012;庄平等,2008)。蛋白质的鲜美程度主要取决于呈鲜味的谷氨酸和天门冬氨酸及呈甘味的甘氨酸和丙氨酸的组成与含量,其中,含量最高的为谷氨酸,谷氨酸是鲜味最强的氨基酸,也是脑组织生化代谢中合成生理活性物质的重要参与物质(张昌颖等,1988;刘峰等,2018)。与凡纳滨对虾、南极拟扇虾、安氏白虾和日本沼虾相比,本研究 2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉中谷氨酸的含量均较高,说明克氏原螯虾味道更加鲜美。

脂肪酸是机体主要能源之一,对虾类的生长和生存起着重要作用。在池塘和稻田 2 种养殖模式下,克氏原螯虾肌肉中均检测出 20 种脂肪酸。克氏原螯虾肌肉中脂肪酸以 PUFA 最高, SFA 次之, MUFA 最低。与易瑞恺等(2013)研究鄱阳湖克氏原螯虾得出 SFA 最高, MUFA 次之的结果不一致,这可能是由于养殖模式及饲养方法的差异引起的。脂肪酸检测结果显示,棕榈酸(C16:0)和油酸(C18:1n9c)在 2 种养殖模式下,克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中含量最高,这一结果与安氏白虾和日本沼虾结果一致(庄平等,2008)。在克氏原螯虾肝胰腺中检测出 24 种脂肪酸,其中,饱和脂肪酸 11 种;单不饱和脂肪酸 4 种;多不饱和脂肪酸 9 种。对于虾类肝胰腺脂肪酸的研究相对较少,肝胰腺作为“虾黄”,亦可供人食用,需后续进行更多的研究。

4 结论

2 种养殖模式下除水分和粗灰分外,其他一般营养物质无显著性差异。同时在 2 种养殖模式下肌肉和肝胰腺中均检测出 17 种氨基酸,其中,必需氨基酸 7 种,鲜味氨基酸 4 种。根据 CS 评分,2 种养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中的第一限制氨基酸均为甲硫氨酸+胱氨酸,而第二限制氨基酸均为缬氨酸,必需氨基酸的满足率较高。此外,20 种脂肪酸在 2 种养殖模式下的克氏原螯虾肌肉中均被检出。而

在肝胰腺中还检测出癸酸(C10:0)、月桂酸(C12:0)、十七烷酸(C17:0)和 γ -亚油酸(C18:3n6)。2种养殖模式下的克氏原螯虾的肌肉和肝胰腺均具有较高的营养价值,适宜食用。

参 考 文 献

- Chen XH, Chen Q, Xie DX. Assessment of meat containing rates and muscle nutrition values in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). Fisheries Science and Technology Information, 2001, 28(4): 165–168 [陈晓汉, 陈琴, 谢达祥. 南美白对虾含肉率及肌肉营养价值的评定. 水产科技情报, 2001, 28(4): 165–168]
- Chu QZ, Liu SC, Fan DW, et al. Analysis on nutritional components of *Parribacus antarcticus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(1): 168–172 [初庆柱, 刘书成, 范德炜, 等. 南极拟扇虾肌肉营养成分分析. 水生生物学报, 2012, 36(1): 168–172]
- Ding JY, Kang J, Xu JR. Nutritional composition of analysis and evaluation of *Procambarus clarkii*. Fisheries Science and Technology Information, 2010, 37(6): 298–301 [丁建英, 康璉, 徐建荣. 克氏原螯虾肌肉营养成分分析与评价. 水产科技情报, 2010, 37(6): 298–301]
- Dong CH, Wang J. Immunostimulatory effects of dietary fructooligosaccharides on red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). Aquaculture Research, 2013, 44(9): 1416–1424
- Li Q, Xie LL, Lin YC, et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Journal of Huazhong Agriculture University, 2013, 32(2): 109–115 [李强, 谢玲玲, 林郁葱, 等. 克氏原螯虾对饲料中磷的需求量. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 109–115]
- Liu F, Lü XK, Liu YY, et al. Effect of starvation on amino acids and fatty acids of juvenile *Larimichthys crocea*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 58–65 [刘峰, 吕小康, 刘阳阳, 等. 饥饿对大黄花鱼幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸组成的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 58–65]
- Liu H, Cui J, Yan J, et al. Cloning and relative quantification analysis of expression of the partial vitellogenin receptor cDNA/mRNA of the crayfish *Procambarus clarkii*. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(6): 83–89 [刘红, 崔俊, 颜婕, 等. 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的克隆及 mRNA 表达量的相对定量. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 83–89]
- Liu P, Zhou YQ, Zang LJ. Investigation of heavy metal contamination in four kinds of fishes from the different farmer markets in Beijing. Environmental Science, 2011, 32(7): 2062–2068 [刘平, 周益奇, 臧利杰. 北京农贸市场 4 种鱼类体内重金属污染调查. 环境科学, 2011, 32(7): 2062–2068]
- Pellet PL, Yong VR. Nutritional evaluation of protein food. Tokyo: United National University Publishing Company, 1980, 26–29
- Shu XY. The industry development and key technology of *Procambarus clarkii* in Hubei Province. Fisheries Advance Magazine, 2014, 5: 93–96 [舒新亚. 湖北省小龙虾产业发展及关键技术. 水产前沿杂志, 2014, 5: 93–96]
- Tang L, Yang JJ, Lin YH, et al. Analysis on flesh nutrient component of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* farmed in ricefield in Guizhou province. Hebei Fisheries, 2018, 297(9): 19–23, 49 [唐黎, 杨家军, 林艳红, 等. 贵州稻田养殖克氏原螯虾肌肉营养成分分析. 河北渔业, 2018, 297(9): 19–23, 49]
- Tian J, Xu QQ, Tian L, et al. The muscle composition analysis and flesh quality of *Procambarus clarkii* in the Dongting Lake. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 870–877 [田娟, 许巧情, 田罗, 等. 洞庭湖克氏原螯虾肌肉成分分析及品质特性分析. 水生生物学报, 2017, 41(4): 870–877]
- Wang F, Wang XL. Principles and techniques of food nutrition and health care. Beijing: China Light Industry Press, 1996, 23–24 [王放, 王显伦. 食品营养保健原理与技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, 23–24]
- Wang SC. The biological and ecological cultivation mode of *Procambarus clarkia*. Freshwater Fisheries, 2003, 33(4): 59–61 [王顺昌. 克氏螯虾的生物学和生态养殖模式. 淡水渔业, 2003, 33(4): 59–61]
- Wu ZX, Chen XX, Xiong CX, et al. Analysis of nutrient compositions for *Cherax quadricarinatus*. Hubei Agricultural Sciences, 1995, 29(4): 59–62 [吴志新, 陈孝煊, 熊传喜, 等. 澳大利亚红螯螯虾营养成分分析. 湖北农业科学, 1995, 29(4): 59–62]
- Xu WN, Liu WB, Shen MF, et al. Effect of different dietary protein and lipid level on growth performance, body composition and digestive enzymes activities of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(4): 521–529 [徐维娜, 刘文斌, 沈美芳, 等. 饲料中不同蛋白质和脂肪水平对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 生长性能、体组成和消化酶活性的影响. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 521–529]
- Xu XH, Liu X, Yan BL, et al. Nutritional component analysis and quality evaluation of *Penaeus japonicus*. Food Science, 2011, 32(13): 297–301 [许星鸿, 刘翔, 阎斌伦, 等. 日本对虾肌肉营养成分分析与品质评价. 食品科学, 2011, 32(13): 297–301]
- Yao GM, Li XZ. Determination of nutritional composition of *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries Science and Technology Information, 1981(4): 23 [姚根媒, 李秀珍. 罗氏沼虾营养成分的测定. 水产科技情报, 1981(4): 23]
- Yi RK, Hu HG, Wang SH, et al. Analysis and estimate on nutritional components in muscle of *Procambarus clarkii* in Poyang Lake. Journal of Nanchang University (Science Edition), 2013, 37(3): 255–258 [易瑞恺, 胡火庚, 王尚洪, 等. 鄱阳湖克氏原螯虾肌肉营养成分分析与评价. 南昌大学学报(理科版), 2013, 37(3): 255–258]
- Zhang CY, Li L, Li CF, et al. Biochemistry. Beijing: People's

- Medical Publishing House, 1988, 305–561 [张昌颖, 李亮, 李昌甫, 等. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 305–561]
- Zhou J, Song DJ. Advance in lysine nutrition. *Feed Research*, 2006, 27(8): 48–50 [周均, 宋代军. 赖氨酸营养研究进展. 饲料研究, 2006, 27(8): 48–50]
- Zhu F, Quan HZ, Du HH, *et al.* Effect of dietary chitosan and chitin supplementation on the survival and immune reactivity of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(s2): 284–290
- Zhuang P, Song C, Zhang LZ. Comparison of nutritive components of *Exopalaemon annandalei* and *Macrobrachium nipponensis* collected from the Yangtze Estuary. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(5): 822–829 [庄平, 宋超, 章龙珍. 长江口安氏白虾与日本沼虾营养成分比较. 动物学报, 2008, 54(5): 822–829]

(编辑 陈 辉)

Comparison of Nutrient Components in Muscles and Hepatopancreas of Pond- and Paddy Field-Cultured *Procambarus clarkii*

ZHOU Jian, ZHAO Zhongmeng, HUANG Zhipeng, ZHAO Han, LI Qiang, ZHANG Lu, KE Hongyu, SU Xutao, XIAO Yu, DU Jun^①

(Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 611730)

Abstract To evaluate the quality characteristics of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, crayfish from pond and paddy field cultures were used to compare the muscle, amino acid, and fatty acid compositions between the two culture models. The results showed that there was no significant difference in crude protein and crude fat between the two culture models ($P>0.05$). The muscle moisture content of crayfish in the pond culture was significantly higher than that in the paddy field culture ($P>0.05$), while the total ash content was significantly lower than that in the paddy field culture ($P<0.05$). Seventeen amino acids, including seven essential amino acids and four flavor amino acids, were detected in the muscle and hepatopancreas of the crayfish in the two culture models. There was no significant difference in the muscle W_{EAA}/W_{TAA} values between the two culture models ($P>0.05$), while the hepatopancreatic W_{EAA}/W_{TAA} values in the pond culture model were significantly higher than those in the paddy field model ($P<0.05$). According to the amino acid and chemistry score, the first limiting amino acids in the muscle and hepatopancreas were sulfur-containing amino acid (methionine and cysteine), while the second limiting amino acid in the muscle was valine and that in the hepatopancreas was leucine. In addition, 20 and 24 fatty acids were detected in the muscle and hepatopancreas of crayfish, respectively. Palmitic acid (C16:0) was the highest saturated fatty acid in the muscle and hepatopancreas, and oleic acid (C18:1n9c) was the highest monounsaturated fatty acid. The muscle and hepatopancreas of crayfish in the pond and paddy field models have higher edible and nutritional values.

Key words *Procambarus clarkii*; Pond; Paddy-field; Nutritive value; Comparative analysis

① Corresponding author: DU Jun, E-mail: dujun9100@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200109001

http://www.yykxjz.cn/

房景辉, 何为, 毛玉泽, 方建光, 蒋增杰, 高亚平, 蔺凡, 杜美荣, 梁博. 桑沟湾标准化与传统养殖模式海带的营养成分比较. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 170-175

Fang JG, He W, Mao YZ, Fang JG, Jiang ZJ, Gao YP, Lin F, Du MR, Liang B. A comparison of nutrients in kelp cultured in standardized and traditional long-line modes in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 170-175

桑沟湾标准化与传统养殖模式 海带的营养成分比较*



房景辉¹ 何 为^{1,2} 毛玉泽¹ 方建光¹ 蒋增杰^{1①}
高亚平¹ 蔺 凡¹ 杜美荣¹ 梁 博^{1,2}

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

摘要 采用常规分析方法,对桑沟湾同一海域标准化养殖模式和传统养殖模式下海带(*Saccharina japonica*)产品的主要营养成分进行了分析比较。结果显示,2种养殖模式下海带的水分含量均高于88%,差异不显著;蛋白质含量差异不显著,而可溶性蛋白含量差异显著;脂肪含量均较低且二者差异不显著。标准化养殖模式下海带的必需氨基酸含量(除赖氨酸外)和呈味氨基酸含量均高于传统养殖模式,其中,谷氨酸含量最高,分别为1.75%和1.27%。2种养殖模式下的海带各种脂肪酸含量较低,均低于1%。标准化养殖模式下海带的Zn、Mg、Na和K4种矿物质元素的平均含量都略高于传统养殖模式。标准化养殖模式下海带的可溶性糖含量显著高于传统养殖模式,褐藻胶含量分别为22.66%和21.27%,标准化养殖模式略高。研究表明,与传统养殖模式相比,标准化养殖模式海带产品的蛋白质、氨基酸、脂肪酸、矿物质元素、可溶性糖及褐藻胶等含量较高,显著提高了海带产品的营养和品质,同时,也提高了其作为食品和工业原料的价值,桑沟湾标准化海带养殖模式表现出显著优势。

关键词 标准化养殖;传统养殖;海带;营养成分

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0170-06

海带(*Saccharina japonica*)是我国水产养殖的主要种类之一,在我国水产养殖产业中占有重要地位。

2018年,我国海带产量为152.25万t,占藻类总产量的64.96%(农业农村部渔业渔政管理局,2019)。海带

* 十三五“蓝色粮仓科技创新”国家重点研发计划项目(2019YFD0900803)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T13)、国家自然科学基金面上项目(41876185)、山东省“泰山学者青年专家计划”项目(tsqn201909166)和国家贝类产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900803), Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018-MFS-T13), the National Natural Science Foundation of China (41876185), the Young Taishan Scholars Program of Shandong Province (tsqn201909166), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 房景辉, E-mail: hui861@163.com

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

收稿日期: 2020-01-09, 收修改稿日期: 2020-02-13

营养丰富,是百姓家中常见食品,具有增加食物鲜味、高效补碘、预防和治疗甲状腺疾病的作用,其中的某些成分还具有抵抗辐射、抑制脂肪消化吸收、保养皮肤及头发和降低血压、血脂和血糖等保健功效。同时,海带也是碘和褐藻胶提取的常用原料,工业价值颇高,具有广阔的开发前景(苏丽,2018;王文亮等,2008)。

目前,筏式养殖是我国海带的主要养殖方式,由于不同海域环境条件不同,海带筏式养殖密度和筏架间距等具体养殖方法有所差异(段德麟等,2015),常常依据养殖从业者经验确定。桑沟湾是我国海带的重要养殖海域,海带传统养殖方法已沿用多年,随着养殖规模不断扩大,已经超出了海带养殖容量(方建光等,1996;史洁,2009)。在超容量养殖条件下,海带收获规格减小,干海带成色不佳。已有研究表明,海带的营养成分受到温度、品种、生长阶段、养殖海域和加工方式等因素的影响(Hwang *et al*, 2014; Boakye *et al*, 2018),而在同一海域采取不同养殖方式能否对海带的营养成分产生影响尚不清楚。作者在科学评估桑沟湾海带养殖容量的基础上,建立了海带筏式养殖的标准化模式与技术,取得了显著的效果(房景辉等,2019)。本研究在海带传统养殖模式和标准化养殖模式下,分析不同养殖模式海带营养物质含量差异,旨在进一步探究桑沟湾标准化海带养殖模式的优势,为海带养殖方法改进提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验海带来源

实验海带采自标准化养殖海区 and 传统养殖海区,2个海区均位于桑沟湾南侧的东楮岛养殖海域,相距约 50 m。标准化养殖模式与传统养殖模式相比,增大了筏架间距、浮漂大小和海带绳间距,减少了每条筏架上海带绳数量及每根海带绳上的海带棵数,这些参数的改变将标准化养殖模式海带的密度降低为传统养殖方式的 62.9%(房景辉等,2019)。2个海区海带夹苗时间均为 2017 年 12 月,于 2018 年 5 月收获,养殖过程的管理方式相同。本研究随机在收获的海带中各取 10 棵,每棵海带从假根部往上,分下、中、上 3 段等重取样合计 500~600 g 作为样品进行分析。其中,标准化养殖模式海带的规格为(1791±481) g,传统养殖模式海带的规格为(1511±405) g。

1.2 样品处理与营养成分测定

在 70℃ 条件下,使用电热鼓风干燥箱(DHG-9240A,上海)将海带样品烘干至恒重,使用电子天平

称量干重,计算含水率,再研磨用于其他成分测定。其中,可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法测定,粗脂肪按 GB/T5009.6-2003 中的方法测定;氨基酸按 GB/T5009.124-2016 中的方法使用氨基酸自动分析仪(L8900, HITACHI, 日本)测定;脂肪酸使用脂肪酸分析仪(QP2010plus, SHIMADZU, 日本)按 GB/5009.168-2016 中的方法测定;矿物质元素使用原子吸收光谱仪(AA80, Perkin-Elmer, 美国)测定;褐藻胶含量采用醋酸钙法测定;可溶性糖采用市售植物可溶性糖含量测试盒(蒽酮比色法)测定。

1.3 数据处理

所得数据采用 SPSS 22.0 统计分析软件分析处理,采用独立样本 *t* 检验比较 2 种养殖模式下海带的一般营养成分、氨基酸组成、脂肪酸组成、矿物质元素含量、可溶性糖含量和褐藻胶含量,以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 一般营养成分

2 种养殖模式下海带的一般营养成分见表 1。标准化养殖模式海带的水分、蛋白质和灰分含量略高于传统养殖模式海带,但无显著性差异;脂肪含量略低于传统养殖模式海带,但无显著性差异($P>0.05$)。标准化养殖模式海带的可溶性蛋白含量显著高于传统养殖模式($P<0.05$)。

表 1 2 种养殖模式下海带的一般营养成分

Tab.1 Nutrient compositions of kelp under standardized and traditional long-line aquaculture mode

营养成分 Nutrient	标准化养殖 Standardized	传统养殖 Traditional
水分 Moisture (%)	88.32±2.10	88.06±1.58
蛋白质 Protein (%)	6.88±0.33	6.88±0.33
可溶性蛋白 Soluble protein (g/L)	0.74±0.20 ^a	0.41±0.14 ^b
脂肪 Lipid (%)	0.88±0.25	1.00±0.12
灰分 Ash (%)	48.15±1.19	45.30±1.56

注:表中同一行带有不同字母的数据表示相互之间差异显著($P<0.05$),下表同

Note: Data in the same row with different superscript letters are significantly different from each other ($P<0.05$), the same as below

2.2 氨基酸组成

从表 2 可以看出,除赖氨酸以外,标准化养殖模

式海带的必需氨基酸的平均含量均高于传统养殖模式的海带,其中,丙氨酸、丝氨酸和天冬酰胺等 8 种氨基酸含量显著高于传统养殖模式($P<0.05$)。所测的氨基酸中,谷氨酸含量最高,标准化养殖模式与传统养殖模式海带的谷氨酸含量分别为 1.75%和 1.27%。标准化养殖模式下,海带的各呈味氨基酸平均含量均高于传统模式。

表 2 2 种养殖模式下海带的氨基酸组成

Tab.2 Composition of amino acids in kelp under standardized and traditional long-line aquaculture modes (%)

氨基酸 Amino acids	标准化养殖 Standardized	传统养殖 Traditional
丙氨酸 Ala*	0.63±0.10 ^a	0.51±0.06 ^b
丝氨酸 Ser	0.28±0.05 ^a	0.24±0.04 ^b
亮氨酸 Leu	0.39±0.06	0.34±0.06
天冬酰胺 Asn*	0.97±0.24 ^a	0.75±0.16 ^b
异亮氨酸 Ile	0.22±0.04 ^a	0.18±0.04 ^b
甘氨酸 Gly*	0.34±0.05 ^a	0.28±0.05 ^b
精氨酸 Arg	0.22±0.04 ^a	0.18±0.04 ^b
组氨酸 His	0.11±0.02	0.09±0.02
缬氨酸 Val	0.36±0.04	0.34±0.04
苏氨酸 Thr	0.37±0.05 ^a	0.30±0.04 ^b
苯丙氨酸 Phe*	0.27±0.03	0.24±0.03
甲硫氨酸 Met	0.15±0.02	0.14±0.02
谷氨酸 Glu*	1.75±0.61	1.27±0.43
赖氨酸 Lys	0.27±0.04	0.34±0.35
脯氨酸 Pro	0.26±0.08 ^a	0.13±0.05 ^b
酪氨酸 Tyr*	0.22±0.02	0.20±0.02

注: *表示呈味氨基酸

Note: *: Flavor amino acid

2.3 脂肪酸组成

2 种养殖模式下海带的各种脂肪酸含量均较小,除 C18:3 外,海带的其他脂肪酸指标均无显著差异($P>0.05$)。标准化养殖模式下海带的饱和脂肪酸平均含量略高于传统养殖模式,不饱和脂肪酸平均含量略低于传统养殖模式,但无显著性差异($P>0.05$)(表 3)。

2.4 矿物质元素

2 种养殖模式下海带的矿物质含量均无显著差异($P>0.05$)。除 Fe、Ca 和 P 之外,标准化养殖模式海带的 Zn、Mg、Na 和 K 4 种矿物质元素的平均含量都略高于传统养殖模式,但无显著性差异($P>0.05$)(表 4)。

表 3 2 种养殖模式下海带的脂肪酸组成
Tab.3 Contents of fatty acids in kelp under standardized and traditional long-line aquaculture modes (%)

脂肪酸 Fatty acids	标准化养殖 Standardized	传统养殖 Traditional
C14:0	0.100±0.010	0.090±0.010
C15:0	0.002±0.000	0.002±0.000
C16:0	0.170±0.020	0.170±0.020
C18:0	0.020±0.010	0.030±0.010
C20:0	0.003±0.000	0.003±0.000
饱和脂肪酸 Saturated fatty acids	0.370±0.036	0.330±0.120
C16:1	0.020±0.010	0.020±0.000
C18:1	0.160±0.020	0.160±0.020
C18:2	0.060±0.020	0.06±0.010
C18:3	0.030±0.040 ^a	0.020±0.010 ^b
C18:1n9	0.150±0.020	0.160±0.020
C20:3	0.003±0.002	0.005±0.003
EPA	0.030±0.010	0.030±0.010
C22:1	0.020±0.000	0.020±0.000
C23:0	0.070±0.010	0.080±0.010
不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acids	0.310±0.038	0.330±0.048

表 4 2 种养殖模式下海带的矿物质元素含量
Tab.4 Contents of mineral element in kelp under standardized and traditional long-line aquaculture modes (%)

元素 Elements	标准化养殖 Standardized	传统养殖 Traditional
锌 Zn	0.0008±0.0003	0.0007±0.0001
镁 Mg	0.56±0.13	0.54±0.04
铁 Fe	0.03±0.02	0.03±0.01
钠 Na	2.62±0.33	2.47±0.24
钾 K	13.73±2.87	11.96±2.13
钙 Ca	0.66±0.08	0.66±0.05
磷 P	0.13±0.01	0.15±0.05

注:表中 2 种模式相同指标的数据没有显著性差异($P>0.05$)

Note: There is no significant difference in the same parameter of the two long-line aquaculture modes ($P>0.05$)

2.5 可溶性糖及褐藻胶的含量

标准化养殖模式下海带的可溶性糖含量为 0.89%,比传统养殖模式的 0.59%高 50.85%,且差异显著($P<0.05$)。褐藻胶含量比传统养殖模式高 6.54%,但 2 种模式无显著差异($P>0.05$)(表 5)。

表 5 2 种养殖模式下海带可溶性糖和褐藻胶的含量
Tab.5 Contents of soluble sugar and sodium alginate
in kelp under standardized and traditional long-line
aquaculture modes (%)

指标 Parameters	标准化养殖 Standardized	传统养殖 Traditional
可溶性糖 Soluble sugar	0.89±0.33 ^a	0.59±0.16 ^b
褐藻胶 Sodium alginate	22.66±3.89	21.27±4.15

3 讨论

我国的海带产量居世界首位, 海带对我国社会和经济具有重要意义, 它不仅是重要的食品, 也是海带多糖、褐藻胶和甘露醇等的主要生产原料。目前, 关于海带的营养成分研究报道较多, 盛晓凤等(2011)对海带不同生长时期的营养成分进行了研究, 发现不同月份海带的甘露醇、褐藻胶和碘等含量有所差异; 李涛等(2012)以“黄官 1 号”海带为研究对象, 对其在不同海域的营养成分进行了研究, 发现同一品种在不同海域的营养成分会产生较大差异; 刘红英等(2005)对山东青岛和浙江宁波两地的海带营养成分进行了研究, 发现宁波海带中粗蛋白、碘和褐藻胶的含量大于青岛海带, 而岩藻聚糖硫酸酯和甘露醇的含量则远远小于青岛海带。除此之外, 还有学者研究发现, 季节(Black, 1948; Adams *et al.*, 2011)、品种(王培功等, 1998)、品系(刘建新等, 2001), 甚至个体(崔铁军等, 1993)差异都是影响海带营养成分的重要因素, 特别是在不同海域, 由于生长环境(温度、光照和营养盐等)不同会导致海带成分产生差异。因此, 生长海域差异对海带主要成分的含量有重要影响已成为共识。

但在环境条件一致的另一海域, 采用不同的养殖模式也会对海带产品的营养成分产生影响, 这在以前的研究中鲜见报道。本研究发现, 标准化养殖模式可以提高海带蛋白质、可溶性蛋白、氨基酸、饱和脂肪酸、微量元素和可溶性糖等营养成分含量, 尤其是可以提高氨基酸和脂肪酸的含量。这表明标准化养殖模式的海带产品营养价值和品质均优于传统养殖模式。对比 2 种养殖模式重要环境指标发现, 标准化养殖模式下的海带比传统养殖模式有更充足的光照和更高的海水交换速度。光照强度不足是传统养殖模式尤其显著的问题, 其海带所处水层的光照强度很少超过 8000 lx; 传统养殖模式海流流速较慢, 限制了营养盐的更新速度, 这 2 个重要因素限制了传统养殖模式海带的生长(房景辉等, 2019), 从而导致营养积累不佳。因此, 除养殖海区的大环境差异可以影响海带生长

和营养成分外, 海区局部环境甚至微环境也是影响海带生长和营养成分的重要因素。

本研究表明, 标准化养殖的海带营养成分含量总体上高于传统养殖模式的海带产品。我国是多糖、褐藻胶和甘露醇等的主要生产国(宋武林, 2016; 刘树立等, 2007), 作为褐藻胶的主要原料, 海带中褐藻胶含量对工业生产的意义重大。本研究结果显示, 标准化养殖模式下, 成品海带的平均褐藻胶含量比传统养殖模式高 6.54%, 如果以我国万吨级的褐藻胶产业规模进行计算(尚德荣等, 2011), 褐藻胶含量的提升可以产生可观的经济价值。此外, 标准化养殖模式下海带的可溶性糖(包括单糖、寡糖和多糖)含量比传统养殖模式高 50.85%, 其藻体碳含量也得以提高(房景辉等, 2019), 提升了海带作为多糖提取原料的利用价值。对养殖企业来说, 标准化养殖模式可以提高海带产品品质, 从而提高经济效益(房景辉等, 2019); 对加工企业来说, 获得质量较高的加工原料, 在同样的加工工艺条件下, 可以获得品质较高的加工产品, 同时保证产量和效益(何敏元, 1986; 尚德荣等, 2011); 对消费者来说, 可以从优质的海带产品中获得较好的外观、口感和营养等各方面体验, 消费意愿得以提高。因此, 标准化养殖模式的优势显著, 不仅可以提高产品品质, 同时, 可以增加经济效益和生态效益(王丽, 2010; 唐启升等, 2013)。优化养殖结构, 改进养殖方式是推动海带养殖技术升级的重要发展方向。

4 结论

本研究表明, 在同一海域, 不同养殖模式下的海带营养成分会有所差异。标准化养殖模式下海带的营养丰富, 褐藻胶含量更高。在桑沟湾海域采用标准化养殖模式养殖海带, 能提高海带的食用价值和工业价值, 对生产有积极意义。

参 考 文 献

- Adams JMM, Toop TA, Donnison IS, *et al.* Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21): 9976–9984
- Black WAP. The seasonal variation in chemical constitution of some of the sub-littoral seaweeds common to Scotland. Part III: *Laminaria saccharina* and *Saccorhiza bulbosa*. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 1948, 67(7): 172–176
- Boakye P, Sewu DD, Woo SH. Effect of thermal pretreatment on the extraction of potassium salt from alga *Saccharina*

- japonica*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2018, 133: 68–75
- Cui TJ, Deng HS, Zhang ZY, *et al.* The common chemical components and catalase activity in five species of *Laminaria* descended from Japanese ones. Journal of Dalian Fisheries College, 1993, 8(4): 62–66 [崔铁军, 邓会山, 张泽宇, 等. 长海带等 5 种日本产海带基本化学成分的研究. 大连水产学院学报, 1993, 8(4): 62–66]
- Duan DL, Liao GR, Wang XL. Aquacultural biology of *Saccharina japonica*. Beijing: Science Press, 2015 [段德麟, 缪国荣, 王秀良. 海带养殖生物学. 北京: 科学出版社, 2015]
- 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 JH, Jiang ZJ, Lin F, *et al.* Analysis on the advantages of standard kelp long line culture in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 134–140 [房景辉, 蒋增杰, 蔺凡, 等. 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]
- Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Terminal, Chinese Society of Fisheries. 2019 China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agricultural Publishing, 2019 [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. 2019 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- He MY. Study on the relationship between the change of nutritive composition and processing method of *Laminaria japonica*. Fishery Modernization, 1986(3): 26–30, 37 [何敏元. 关于海带营养成分的变化与加工方法关系的研究. 渔业现代化, 1986(3): 26–30, 37]
- Hwang JH, Kim NG, Woo HC, *et al.* Variation in the chemical composition of *Saccharina japonica* with harvest area and culture period. Journal of Aquaculture Research and Development, 2014, 5(7): 286
- Li T, Wang FJ, Sun XT, *et al.* Nutrition assessment on *Saccharina Huangguan* No.1 cultivated in different sea area. Food Science and Technology, 2012, 37(11): 70–75 [李涛, 王飞久, 孙修涛, 等. 黄官 1 号海带在不同海域的营养成分分析与评价. 食品科技, 2012, 37(11): 70–75]
- Liu HY, Xue CH, Zhang H, *et al.* A comparison of differences between Qingdao *Laminaria japonica* and Ningbo *Laminaria japonica*. Journal of Agricultural University of Hebei, 2005, 28(2): 61–63 [刘红英, 薛长湖, 张辉, 等. 青岛海带和宁波海带成分差异比较. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 61–63]
- Liu JX, Cao WD, Wu CY, *et al.* Iodine content analysis of three new varieties of *Laminaria japonica*. Marine Sciences, 2001, 25(6): 8–10 [刘建新, 曹文达, 吴超元, 等. 3 种海带新品系含碘量的分析. 海洋科学, 2001, 25(6): 8–10]
- Liu SL, Wang CY, Wang H. Utilization and development of *Laminaria japonica* in China. Food and Drug, 2007, 9(5): 34–36 [刘树立, 王春艳, 王华. 我国海带的加工利用和开发. 食品与药品, 2007, 9(5): 34–36]
- Shang DR, Ning JS, Zhao YF, *et al.* Establishment of the determination on kelp alginate. Food Science and Technology, 2011, 36(8): 252–254 [尚德荣, 宁劲松, 赵艳芳, 等. 海带中褐藻胶含量测定方法的建立. 食品科技, 2011, 36(8): 252–254]
- Sheng XF, Zhao YF, Shang DR, *et al.* Differences in the major nutrition constituents and major elements in the kelp of different growing stages. Food Science and Technology, 2011, 36(12): 66–68 [盛晓风, 赵艳芳, 尚德荣, 等. 海带不同生长期营养成分和主要元素差异比较. 食品科技, 2011, 36(12): 66–68]
- Shi J. Numerical study on the influences of physical processes on the aquaculture carrying capacity in a semi-enclosed bay. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 [史洁. 物理过程对半封闭海湾养殖容量影响的数值研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009]
- Song WL. Research on the primary functions and utilization of *Laminaria japonica*. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(1): 81–86 [宋武林. 海带的主要功能及加工利用研究现状. 渔业研究, 2016, 38(1): 81–86]
- Su L. The study on reproduction and cultivation problems related to variety breeding of the economic seaweed *Saccharina japonica*. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences), 2018 [苏丽. 与海带品种培育相关的繁殖与栽培问题的研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2018]
- Tang QS, Fang JG, Zhang JH, *et al.* Impacts of multiple stressors on coastal ocean ecosystems and integrated multi-trophic aquaculture. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 1–11 [唐启升, 方建光, 张继红, 等. 多重压力胁迫下近海生态系统与多营养层次综合养殖. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 1–11]
- Wang L. Effects of the different maricultural models on Sanggou Bay ecosystem services. Master's Thesis of the First Institute of Oceanography, MNR, 2010 [王丽. 不同海水养殖模式对桑沟湾生态系统服务的影响. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2010]
- Wang PG, Xu JM, Yang LJ, *et al.* A comparative study on economic properties and basic composition between distantly hybridized kelp 2 and common kelp. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(2): 31–34 [王培功, 徐家敏, 杨林江, 等. 远杂 2 号海带与普通海带经济性状及基本成分比较. 中国水产科学, 1998, 5(2): 31–34]
- Wang WL, Wang SJ, Song K, *et al.* Study on the function and exploitation of kelp. Food and Nutrition in China, 2008(8): 26–27 [王文亮, 王守经, 宋康, 等. 海带的功能及其开发利用研究. 中国食物与营养, 2008(8): 26–27]

A Comparison of Nutrients in Kelp Cultured in Standardized and Traditional Long-Line Modes in Sanggou Bay

FANG Jinghui¹, HE Wei^{1,2}, MAO Yuze¹, FANG Jianguang¹, JIANG Zengjie^{1①},
GAO Yaping¹, LIN Fan¹, DU Meirong¹, LIANG Bo^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The primary nutrients in kelp (*Saccharina japonica*) products cultivated under standardized and traditional long-line modes in the waters of Sanggou Bay, Shandong Province, were analyzed and compared. The results showed there was no significant difference in the moisture content of the kelp produced by the two methods, and in both cases, the moisture content was higher than 88%. The cultivation method did not significantly affect the total protein content of the kelp, but the soluble protein level was significantly different between the two methods. The fat content was low in all the kelp samples, and the difference between the products of the two cultivation methods was not significant. The essential amino acid content (except lysine) of kelp from the standardized cultivation method was higher than that from the traditional method. The amino acids responsible for flavor were higher in kelp produced by the standardized method than in kelp produced by traditional cultivation. Glutamic acid content in kelp from standardized production was high (1.75%) in comparison to other amino acids (1.27%). The fatty acid content of kelp from both cultivation modes was lower than 1%. The average levels of zinc, magnesium, sodium, and potassium in kelp from standardized cultivation were higher than traditionally produced kelp. Additionally, the soluble sugar content of kelp from standardized cultivation was significantly higher than that from traditional cultivation. The alginate content was 22.66% and 21.27% in the standardized cultivation and traditional cultivation modes, respectively. The results showed that the protein, amino acid, fatty acid, mineral elements, soluble sugar, and alginate contents in kelp produced by standardized cultivation were all higher than in kelp grown the traditional way. Therefore, the nutrient value and quality of kelp products were significantly better, when produced by standardized cultivation. The value of kelp products for food and industrial raw materials was also higher. Therefore, the standardized kelp cultivation method in Sanggou Bay has significant advantages.

Key words Standardized cultivation; Traditional cultivation; *Saccharina japonica*; Nutrients

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200108001

http://www.yykxjz.cn/

李政, 李文涛, 杨晓龙, 张彦浩, 张沛东. 威海双岛湾海域海草分布及其生态特征. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 176–183
Li Z, Li WT, Yang XL, Zhang YH, Zhang PD. Distribution and ecological characteristics of seagrass in Shuangdao Bay, Weihai. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 176–183

威海双岛湾海域海草分布及其生态特征*

李 政 李文涛 杨晓龙 张彦浩 张沛东^①

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 2016 年 8 月, 现场调查并分析了山东省威海市双岛湾海域的海草资源及其生态特征, 发现分布面积为 442.19 hm² 的海草床, 种类为鳗草(*Zostera marina*)和红纤维虾形草(*Phyllospadix iwatensis*) 2 种。鳗草的分布面积约为 434.46 hm², 占总面积的 98.3%, 主要分布在双岛湾中部东侧及海参池, 其平均植株密度和生物量分别为(174.2±9.2) shoots/m²和(337.7±17.5) g DW/m²。红纤维虾形草的分布面积约为 7.73 hm², 占总面积的 1.7%, 主要分布在双岛湾湾口东侧及向东约 3 km 的近岸礁石浅水区, 呈明显的带状分布, 其平均植株密度和生物量分别为(889.1±17.1) shoots/m²和(605.9±18.1) g DW/m²。双岛湾海草床平均水深约为 1.6 m, 鳗草草床底质坚硬, 平均底质粒径约为(4.3±0.2) mm。本调查表明, 双岛湾海草床受到陆源污染物排放、围海养殖和捕捞作业等人类活动的严重威胁, 提出了保护双岛湾海草床的建议和对策, 为我国海草床现有资源提供数据补充。

关键词 海草床; 海草种类; 分布面积; 生态特征; 双岛湾

中图分类号 Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0176-08

海草是一类分布于极圈以外海洋或河口的高等水生植物(Duarte, 1991), 种类多样性较低, 目前, 全球范围内共发现 74 种(黄小平等, 2018), 由单种或多种海草构筑的海草床是地球生物圈最高产的生态系统之一(Duarte *et al.*, 1999), 也是多种水生动物重要的产卵场、育幼场和栖息地(Costanza *et al.*, 1997; Short *et al.*, 2011a)。然而, 在自然环境和人类活动的双重影响下, 世界范围内超过 1/3 的海草床已经消失(Waycott *et al.*, 2009; Short *et al.*, 2011b), 山东省威海海域完全退化或消失的海草床已超过 90% (郑凤英等, 2013)。随着海草床生态及经济价值不断被发掘, 各海洋强国相继实施了全球性或区域性海草研究计划, 海草床的保护和修复等相关研究正成为生态修复工作的热点(van Katwijk *et al.*, 2009、2016; Statton *et al.*, 2013)。而

与北美、澳大利亚和欧洲相比, 我国对海草床的研究仍有欠缺, 山东半岛部分海域的海草床分布及其生境状况缺少基础数据, 严重影响了对海草现有资源量的认识与保护工作的顺利开展。为此, 作者于 2016 年 8 月对山东省威海双岛湾进行海草资源及其环境特征的调查研究, 以期对海草床生态系统的修复和管理提供数据补充。

1 调查方法

1.1 断面布设与调查方法

双岛湾(37°27'N、121°58'E)位于山东半岛东北部, 濒临北黄海, 湾内开阔, 面积约为 18.70 km²。由于受到海水和河口的常年冲积, 双岛湾形成了独特

* 国家科技基础性工作专项(2015FY110600)、国家自然科学基金项目(41576112)和中央高校基本科研业务费专项(201861031; 201822021)共同资助 [This work was supported by National Science and Technology Basic Work Program (2015FY110600), National Natural Science Foundation of China (41576112), and Fundamental Research Funds for the Central Universities (201861031; 201822021)]. 李 政, E-mail: 13256952979@163.com

^① 通讯作者: 张沛东, 教授, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-01-08, 收修改稿日期: 2020-02-13

的水下三角洲和大量滩涂地貌, 滩涂上布有大量养殖池塘, 湾中有菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)增殖区(王军等, 2012)。

2016 年 5 月, 通过现场观测和渔民走访, 确定双岛湾海域存在较大面积的海草床。同年 8 月, 通过调查断面布设, 结合双岛湾海域各岸段的地形和水文等具体环境特征及海草的生长习性, 对可能有海草床分布的岸段进行分段调查。总调查面积为 31.60 km², 共设置 32 个调查断面, 覆盖双岛湾全湾、湾口及湾

口东侧海域, 每个调查断面平行间距为 30 m (图 1)。在大潮低潮段时进行调查, 在确保安全的情况下由潜水员手持水下摄像机进行潜水拍照与录像, 以便更加准确地识别海草种类、分布状况及海草床附近的地貌特征。在海草覆盖度>5%的区域边界、拐点及中心位置设置多个 GPS 定位点, 用相机和记录本记录大致区域及标志性建筑位置。在实验室进一步对拍摄录像和记录本的记录内容进行分析整合, 对定点坐标进行图像空间计算, 明确海草种类, 估算海草床具体分布面积。

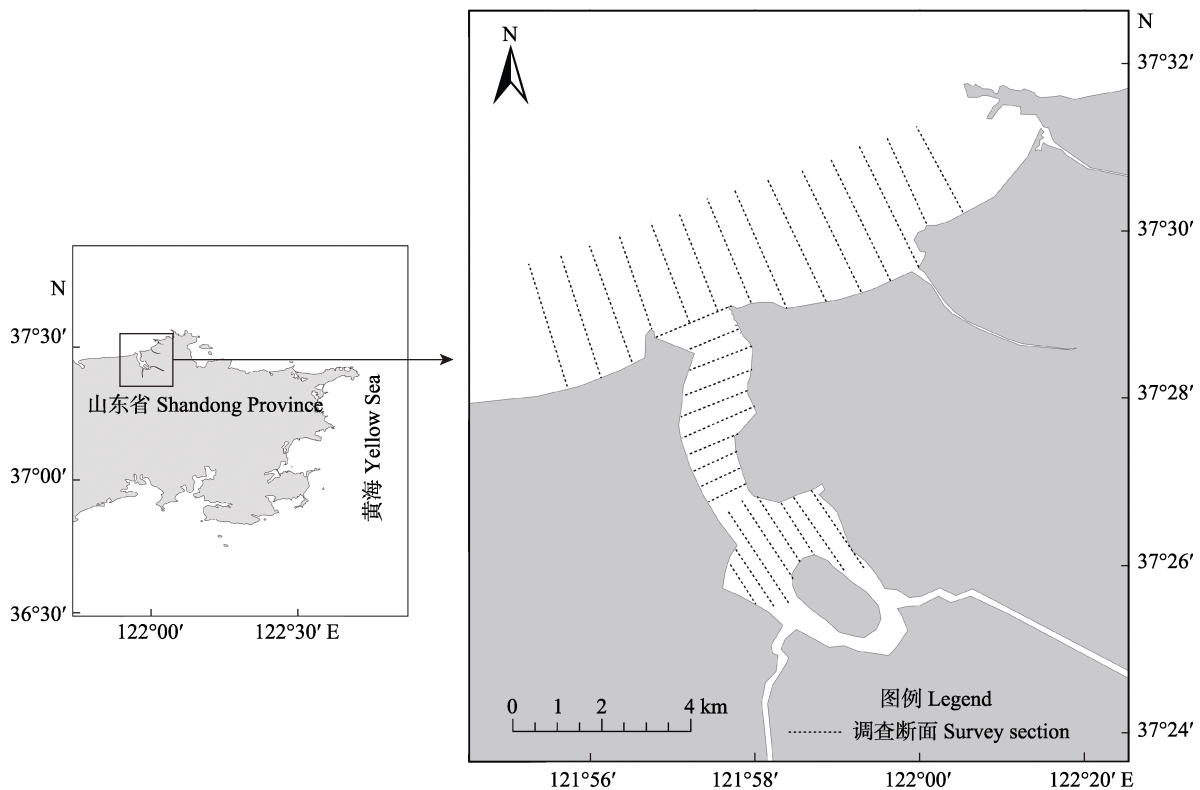


图 1 双岛湾调查区域断面布设位置

Fig.1 Section layout map of Shuangdao Bay survey area

1.2 海草植株密度、形态学特征与生物量调查

在发现的海草床内随机设置 3~5 个采样站位, 利用 25 cm × 25 cm 的取样框进行采样, 每个站位采集 3 个重复样方, 将取样框内所有海草地上和地下部分完整取出, 适当清洗后置于样品袋, 将样品袋封口、编号记录(包括日期、经纬度和种类等信息)后低温保存带回实验室。结合视频资料和实验样品, 于实验室进一步通过外部形态、叶脉数量和组织切片的方式分析海草种类。统计植株数量, 计算单位面积植株密度。在关键调查区域获得的样品中随机选取 30 株完整海草植株, 将其表面附着物与根部泥沙冲洗干净后进行形态学测量。将测量后的海草植株在 65℃ 恒温条件下烘干至恒重, 对单位面积海草的生物量进行计算。

1.3 海草床区域关键环境因子调查

在各采样站位, 运用 SM-5A 测深仪(Speedtech, 美国)测量水深, 参考当地当日潮汐表校正实际水深。使用 YSI 650 多参数水质监测仪(美国)监测调查海域的水温、溶解氧、盐度和酸碱度。使用 SD20 透明度塞氏盘(北京普力特仪器有限公司)测量水体透明度。采集沉积物, 采用实验室筛析法结合马尔文激光粒度仪(Malvern Instruments Ltd., 英国)法测定沉积物的平均粒径、砂含量、粉砂和粘土含量。

1.4 数据处理与分析

运用 ArcGIS10.2 软件估算双岛湾海域海草分布面积、绘制海草分布图。运用 SPSS18.0 软件对海草床关

键环境因子和海草形态学指标进行 T 检验、描述性统计和单因素方差分析(One-way ANOVA)。实验数据采用平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SE)表示,显著性水平为 $P=0.05$ 。

2 结果

2.1 海草种类

本调查通过植株形态学观察和组织切片法对调查区域的海草进行种类鉴定。结果显示,双岛湾海域共分布有2种海草,分别为鳗草科(Zosteraceae)、鳗草属(*Zostera*)的鳗草(*Z. marina*)(图2)和鳗草科虾形草属(*Phyllospadix*)的红纤维虾形草(*P. iwatensis*)(图3)。

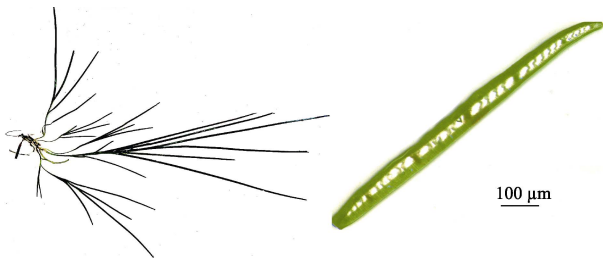


图2 鳗草外部形态特征及其叶片横断面
Fig.2 External morphological characters of *Z. marina* and its transection of leaf



图3 红纤维虾形草外部形态特征及其叶片横断面
Fig.3 External morphological characters of *P. iwatensis* and its transection of leaf

2.2 分布面积

海草床分布总面积为 442.19 hm^2 (图4)。鳗草是双岛湾的海草优势种,分布面积为 434.46 hm^2 , 占总面积的 98.3%, 主要分布于双岛湾中部东侧及海参池中。海参池中的鳗草分布面积为 34.26 hm^2 , 双岛湾中部东侧的鳗草分布面积为 400.20 hm^2 , 湾口 1~3 m 的浅水区成片连续分布, 内湾鳗草呈斑块状或零星分布, 双岛湾西侧因受水动力作用淤积大面积的浅滩, 未发现鳗草分布。红纤维虾形草主要分布于双岛湾湾口东侧及向东约 3 km 的近岸礁石浅水区, 分布面积仅为 7.73 hm^2 , 占总面积的 1.7%。其中, 湾口东侧红纤维虾形草的分布面积约为 3.65 hm^2 , 于礁石底质呈小斑块状分布; 而在近岸礁石浅水区的分布面积约为 4.08 hm^2 , 呈线性连续零星分布。

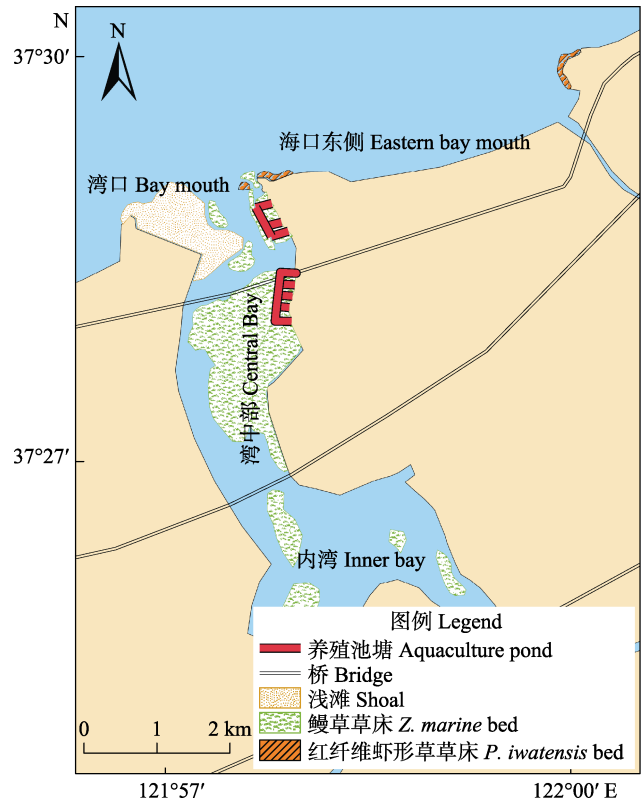


图4 双岛湾海草床的地理分布
Fig.4 Geographical distribution of seagrass beds in Shuangdao Bay

2.3 海草的密度、生物量与形态学特征

2.3.1 鳗草 双岛湾海域鳗草的平均植株密度为 (174.2 ± 9.2) shoots/ m^2 , 其中, 靠近湾口的鳗草密度最大 (218.7) shoots/ m^2 、湾中部最小 (138.7) shoots/ m^2 。鳗草的平均生物量为 (337.7 ± 17.5) g DW/ m^2 , 其中, 靠近湾口的平均生物量最大 (472.4) g DW/ m^2 、内湾最低 (132.2) g DW/ m^2 。

从双岛湾中部、湾口和内湾采集的样品中各随机抽取 30 株鳗草进行形态学统计分析。调查表明, 双岛湾中部鳗草地上形态学指标显著高于湾口和内湾 ($P<0.05$)。中部鳗草平均株高最高, 比湾口处鳗草高约 10 cm, 比湾内鳗草高约 20 cm, 平均单株叶片数、叶长和叶鞘长等指标均具有相似规律(表 1)。地下部分, 全湾鳗草平均节间长约为 1.7 cm, 平均节间直径约为 0.6 cm, 平均根长约为 16.7 cm。

2.3.2 红纤维虾形草 双岛湾海域靠近湾口的红纤维虾形草的植株密度 (969.8) shoots/ m^2 大于湾口东侧 (738.7) shoots/ m^2 , 平均密度为 (889.1 ± 17.1) shoots/ m^2 。红纤维虾形草平均生物量为 (605.9 ± 18.1) g DW/ m^2 , 靠近湾口的平均生物量为 (727.7 ± 21.3) g DW/ m^2 , 显著大于湾口东侧 $[(525.3\pm 15.8)$ g DW/ $\text{m}^2]$ ($P<0.05$)。

从双岛湾湾口和内湾采集的红纤维虾形草样品

中各随机抽取 30 株进行形态学统计分析。从表 2 可知, 双岛湾湾口及其东侧的红纤维虾形草除株高、叶鞘长与根长有显著差异外($P<0.05$), 其他形态学指标

差异不显著($P>0.05$)。总体来看, 虾形草平均单株叶片数为 3.4 leaves/shoot, 平均株高为 71.2 cm, 平均叶宽为 0.2 cm, 平均节间直径为 0.4 cm, 根长为 1.0 cm。

表 1 双岛湾不同区域鳗草形态学指标
Tab.1 Morphological indices of *Z. marina* in different areas of Shuangdao Bay

形态学指标 Morphological index	湾口 Bay mouth	湾中部 Central bay	内湾 Inner bay	样本数 Number of samples
叶片数 Number of leaves (leaves/shoot)	6.0±0.3 ^a	6.7±0.3 ^b	5.8±0.3 ^c	30
株高 Shoot height (cm)	152.7±7.4 ^a	166.7±3.7 ^b	154.4±3.6 ^a	30
叶鞘长 Leaf sheath length(cm)	37.9±1.6 ^a	40.5±0.9 ^b	38.8±1.3 ^a	30
叶鞘宽 Leaf sheath width(cm)	1.1±0.0 ^a	1.2±0.1 ^a	1.1±0.0 ^a	30
最大叶长 Maximum leaf length(cm)	114.8±6.1 ^a	126.2±3.5 ^b	115.6±4.2 ^a	30
最大叶宽 Maximum leaf width(cm)	1.0±0.0 ^a	1.1±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	30
节间长 Internode length(cm)	2.1±0.1 ^a	1.7±0.1 ^b	1.2±0.1 ^c	30
节间直径 Internode diameter(cm)	0.6±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.6±0.0 ^a	30
最大根长 Maximum root length(cm)	17.1±0.4 ^a	17.1±0.9 ^a	15.7±0.5 ^b	30

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Different letters indicated significant differences ($P<0.05$). The same as below

表 2 双岛湾不同区域红纤维虾形草植株形态学指标
Tab.2 Morphological indices of *P. iwatensis* in different areas of Shuangdao Bay

形态学指标 Morphological index	湾口 Bay mouth	湾口东侧 Eastern bay mouth	样本数 Number of samples
叶片数 Number of leaves (leaves/shoot)	3.4±0.3 ^a	3.3±0.3 ^a	30
株高 Shoot height (cm)	67.4±2.8 ^a	75.0±2.3 ^b	30
叶宽 Leaf width (cm)	0.2±0.0 ^a	0.2±0.0 ^a	30
叶鞘长 Leaf sheath length (cm)	10.3±0.5 ^a	9.8±0.4 ^b	30
叶鞘宽 Leaf sheath width (cm)	0.2±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	30
节间直径 Internode diameter (cm)	0.4±0.1 ^a	0.4±0.1 ^a	30
根长 Root length (cm)	0.9±0.0 ^a	1.1±0.0 ^b	30
根直径 Root diameter (cm)	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	30

2.4 双岛湾海草床区域关键环境因子

从双岛湾湾口、湾中部、内湾和湾口东侧调查数据中, 各随机抽取 15 组关键环境因子进行数据分析,

调查结果见表 3。从表 3 可以看出, 部分区域的水深、透明度和溶解氧含量存在显著差异($P<0.05$)。水温、盐度和 pH 差异不大, 平均值分别为 28.7℃、31.9 和 7.4。调查发现, 鳗草草床底质坚硬, 平均底质粒径

表 3 双岛湾海草床区域的关键环境因子
Tab.3 Key environmental factors in the seagrass bed area of Shuangdao Bay

环境因子 Environmental factors	湾口 Bay mouth	湾中部 Central bay	内湾 Inner bay	湾口东侧 Eastern bay mouth	样本数 Number of samples
水深 Water depth (m)	1.8±0.3 ^a	2.0±0.2 ^a	1.2±0.1 ^b	1.5±0.1 ^c	15
透明度 Transparency (m)	0.9±0.1 ^a	1.4±0.2 ^b	0.9±0.1 ^a	1.2±0.1 ^b	15
水温 Temperature (°C)	29.0±0.4 ^a	29.0±0.3 ^a	28.0±0.3 ^b	28.9±0.6 ^a	15
盐度 Salinity	31.6±0.2 ^a	32.1±0.1 ^a	32.1±0.1 ^a	31.9±0.1 ^a	15
溶解氧含量 Dissolved oxygen (mg/L)	7.9±0.0 ^a	7.7±0.0 ^a	7.5±0.0 ^b	7.4±0.0 ^b	15
酸碱度 pH	7.4±0.1 ^a	7.5±0.1 ^a	7.4±0.1 ^a	7.5±0.1 ^a	15
底质类型 Bottom sediment types	中细砂 Medium-fine sand	中细砂 Medium-fine sand	细中砂 Fine to medium sand	礁石 Reef	15

为(4.3±0.2) mm, 红纤维虾形草则附生于礁石上。

3 讨论

3.1 环境因子与海草分布、形态学特征的互作关系

基因和环境因子是导致物种差异性的主要原因, 同一物种在不同环境下也可能呈现出一定的表现差异(Palacio-López *et al*, 2015)。本调查中, 双岛湾湾口、湾中部、内湾及湾口东侧的水深、透明度和底质粒径呈显著差异, 是影响双岛湾海草分布及形态学差异的重要环境变量。

水深和水质透明度通过影响光照进而影响海草的形态学特征(Karydis, 2009)。一般情况下, 同一水域中, 光照随水深增加而递减; 此外, 水质透明度越高, 海草的可利用光也会随之增加。本研究中, 双岛湾中部和湾口东侧的水深、透明度显著高于湾口和内湾, 可能是导致湾中部鳗草和红纤维虾形草地上形态学指标显著高于湾口和内湾($P<0.05$)的重要原因。

沉积物粒径是影响海草分布及生物学特征的又一重要因素(Schanz *et al*, 2003)。一般情况下, 海底沉积物粒径和水流强度呈正相关关系, 沉积物颗粒直径越小, 表明该区域的水动力较小(Andral *et al*, 1999)。海草能通过适应水动力不同的环境来减少种间或种内竞争, 提升自身生存能力和资源利用率(Schanz *et al*, 2003), 进而影响形态学特征。本研究中, 双岛湾湾口和中部底质类型为中细砂, 内湾为细中砂, 湾口东侧为礁石底质, 导致了海草种类分布及形态学的差异。

3.2 双岛湾海草密度及生物量

双岛湾海域鳗草的平均植株密度为174.2 shoots/m², 显著低于同季节镆镎岛(364.0 shoots/m²)(李洪辰等, 2019)、荣成俚岛湾海域(1209.0 shoots/m²)、荣成马山里海域(688.0 shoots/m²)和荣成天鹅湖(416.0 shoots/m²)(Zhang *et al*, 2016)的鳗草床植株密度。据报道, 20世纪80年代以前, 山东省威海、青岛和烟台等沿海海域广泛分布鳗草, 威海海域鳗草床平均生物量达到1500.0 g DW/m²(李恒等, 2006), 而本调查获得的双岛湾鳗草床生物量仅为337.7 g DW/m²。红纤维虾形草于2011年被列为易危种(Short *et al*, 2011b), 对环境变化较敏感, 难以在恶劣的生态环境中生存(Shelton, 2010)。本调查中, 双岛湾红纤维虾形草仅零星分布于礁石上, 平均密度为889.1 shoots/m², 显著低于同季节镆镎岛红纤维虾形草的平均植株密度(3087.0 shoots/m²)(李洪辰等, 2019), 应予以高度重视。

本研究表明, 双岛湾海域鳗草和红纤维虾形草的

植株密度和生物量均处于较低水平, 但由于缺乏双岛湾海域海草床的历史数据, 故无法对双岛湾海草床的衰退状况进行全面且准确的评价。通过对现场调查、群众走访, 初步认为双岛湾海草床处于较为严重的衰退状况。此外, 双岛湾底质坚硬, 海草种子定栖和植株扎根的难度极大, 一旦海草床被破坏, 通过自然或人工进行恢复将异常困难。

3.3 双岛湾海草床生境面临的威胁

根据本调查与渔民走访发现, 双岛湾海域海草床生境正受到围海养殖、捕捞和工业废水的严重威胁。

3.3.1 围海养殖、捕捞 双岛湾是威海著名的海参增养殖区(李乐乐, 2015), 潮间带大面积的海草床直接被改造成了养殖池塘, 导致这些海草床短时间内直接被毁灭; 养殖活动中, 践踏海草或刨挖贝类, 亦会对海草的生长与繁殖造成巨大威胁(黄小平等, 2006)。此外, 近岸渔业用船螺旋桨的机械运作(Sargent *et al*, 1995; Dawes *et al*, 1997)、渔业拖网和船锚(Burdick *et al*, 1999; Neckles *et al*, 2005)的大量使用会在短时间内严重切割连续海草床, 导致海草床的斑块化和生境破碎化。

3.3.2 工业废水的排放 据报道, 双岛湾沿岸有工厂数10家, 其中, 包括电镀厂、造纸厂、眼镜厂、电化铝厂等, 排出的工业废水经排污口流入初村河和羊亭河, 两河交汇后又流入双岛湾。对数个人海排污口的监测结果显示, 双岛湾海水处于富营养化水平。对有机污染进行评价, 结果显示, 双岛湾海域水体处于严重污染状态(周艳荣等, 2008)。长期的水污染导致海草一系列的退化问题。首先, 光照是决定海草生长发育的关键环境因子(Adams *et al*, 2017), 水体长期富营养化和较高的悬浮物浓度会抑制叶绿体的磷酸化进程, 对海草或其他浮游植物产生直接毒性作用, 甚至直接导致其死亡(Touchette, 2000; 李风雪等, 2020)。成熟植物对高浓度的无机氮营养盐耐受性较差, 如红纤维虾形草一般生活在中低水平营养盐环境中, 而在富营养化水体中, 特别是铵态氮的过量富集会直接引起红纤维虾形草中毒, 走向衰亡(Ramírez-García *et al*, 2002)。其次, 水体富营养化会促进大型藻类的爆发性生长, 大量藻类的遮挡会进一步减少海草对光的吸收, 导致其死亡(Han *et al*, 2016; Ruesink, 2016)。另外, 据报道双岛湾海水存在中高等级重金属生物毒性效应(张学超等, 2014), 高浓度的重金属会破坏海草叶片类囊体膜和叶绿体膜的超微结构, 降低海草的光合效率, 进而导致其退化(Ralph *et al*, 1998)。

3.4 保护建议

针对双岛湾海草床所受威胁的类型和强度, 提出

以下建议, 以实现有效保护和科学管理:

(1) 严格控制双岛湾周边企业的污水排量, 同时严格监管排放污水的处理, 以改善水质。

(2) 对双岛湾海域划分不同功能区, 加强对功能区的管理。结合本调查结果和当地实际情况, 可将双岛湾划分出 3 个主要功能区(图 5): 增殖捕捞区、核心保护区和海水养殖区。其中, 增殖捕捞区主要用于贝类的增殖放流和采集, 该区域大部分水深较浅, 退潮后露出大片滩涂, 适于贝类生长和捕捞, 总面积为 117.32 hm²。核心保护区是海草床密集区, 总面积为 105.21 hm², 该区域海草连续分布, 水深较深且生物多样性较高, 但受人类活动影响较大, 保护不当会造成海草床衰退。因此, 该区域应严格限制渔业捕捞和开挖航道等行为。海水养殖区受陆源径流影响, 营养盐含量丰富, 初级生产力高, 适于海带、牡蛎等的养殖, 该功能区总面积约为 163.93 hm²。

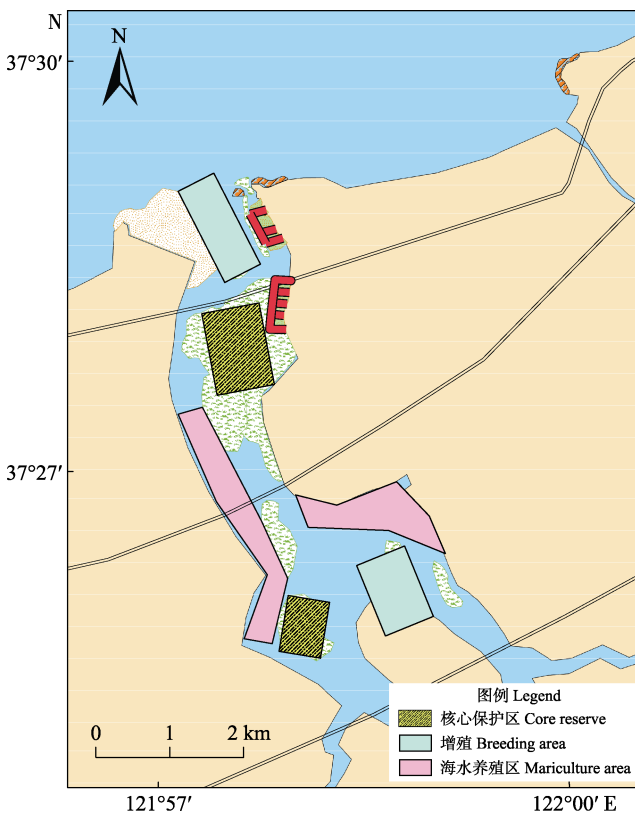


图 5 双岛湾海域不同功能区划分示意图

Fig.5 Schematic diagram of the distribution of different functional areas in Shuangdao Bay

(3) 考虑到双岛湾长远发展的持久利益, 同双岛湾当地的环保、渔业、水产等相关部门进行协商, 避免短期行为, 合理规划渔业捕捞、船舶运行及挖掘航道等行为, 尽量减少对海草床的破坏。

(4) 随着国内外学者对海草床的不断深入研究,

对海草床的管理、保护和修复也逐渐趋于正规化和科学化, 特别是近几年已在海草床修复方面取得重大突破(Verduin *et al.*, 2012; 郭栋等, 2012; 刘燕山等, 2015)。重视海草床的生境保护, 结合成熟有效的海草床修复方法, 如海草植株枚钉移植法(刘燕山等, 2015)和种子保护袋播种法(Zhao *et al.*, 2016)等, 应用海草植株的扩繁与定植理论(张沛东等, 2020), 结合双岛湾鳗草的生殖期及生殖策略确定适宜的海草床修复时间和修复地点(李乐乐等, 2015; 张飞, 2017), 进而加快双岛湾生态系统的恢复与重建。

综上所述, 本调查初步摸清了双岛湾海域海草的种类、分布面积、生物学特征及其生存环境特征, 分析了海草床退化的可能原因并提出了相应的建议和对策, 以期海草床资源及滨海生境修复提供参考。

参 考 文 献

- Adams MP, Collier CJ, Uthicke S, *et al.* Model fit versus biological relevance: Evaluating photosynthesis-temperature models for three tropical seagrass species. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 39930
- Andral MC, Roger S, Montréjaud-Vignoles M, *et al.* Particle size distribution and hydrodynamic characteristics of solid matter carried by runoff from motorways. *Water Environment Research*, 1999, 71(4): 398-407
- Burdick DM, Short FT. The effects of boat docks on eelgrass beds in coastal waters of Massachusetts. *Environmental Management*, 1999, 23(2): 231-240
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R, *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 1997, 387(6630): 253-260
- Dawes CJ, Andorfer J, Rose C, *et al.* Regrowth of the seagrass *Thalassia testudinum* into propeller scars. *Aquatic Botany*, 1997, 59(1-2): 139-155
- Duarte CM, Chiscano CL. Seagrass biomass and production: A reassessment. *Aquatic Botany*, 1999, 65(1-4): 159-174
- Duarte CM. Seagrass depth limits. *Aquatic Botany*, 1991, 40(4): 363-377
- Guo D, Zhang PD, Zhang XM, *et al.* Study on transplant methods of eelgrass (*Zostera marina*). *Marine Sciences*, 2012, 36(3): 42-48 [郭栋, 张沛东, 张秀梅, 等. 大叶藻移植方法的研究. *海洋科学*, 2012, 36(3): 42-48]
- Han QY, Soissons LM, Bouma TJ, *et al.* Combined nutrient and macroalgae loads lead to response in seagrass indicator properties. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 106(1-2): 174-182
- Huang XP, Huang LM, Li YH, *et al.* The major seagrass beds and its habitat threats along the coast of South China. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51: 114-119 [黄小平, 黄良民, 李颖虹, 等. 华南沿海主要海草床及其生境威胁.

- 科学通报, 2006, 51: 114–119]
- Huang XP, Jiang ZJ, Zhang JP, *et al.* The Chinese nomenclature of the global seagrasses. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(4): 127–133 [黄小平, 江志坚, 张景平, 等. 全球海草的中文命名. *海洋学报*, 2018, 40(4): 127–133]
- Karydis M. Eutrophication assessment of coastal waters based on indicators: A literature review. *Global NEST Journal*, 2009, 11(4): 373–390
- Li FX, Jiang ZJ, Gao YP, *et al.* Distribution of size-fractionated phytoplankton and its relationship with environmental variables in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 31–40 [李凤雪, 蒋增杰, 高亚平, 等. 桑沟湾浮游植物粒径结构及其与环境因子的关系. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 31–40]
- Li H, Li MZ. The ecological function of algal field and the present situation of artificial algal field construction. *China Fisheries*, 2006(11): 77–80 [李恒, 李美真. 藻场的生态作用及人工藻场建设的现状. *中国水产*, 2006(11): 77–80]
- Li HC, Zhang PD, Li WT, *et al.* Quantitative distribution and ecological characteristics of seagrass beds in the coastal area of Moye Island, Yellow Sea. *Marine Sciences*, 2019, 43(4): 46–51 [李洪辰, 张沛东, 李文涛, 等. 黄海镆镆岛海域海草床数量分布及其生态特征. *海洋科学*, 2019, 43(4): 46–51]
- Li LL, Zheng FY, Liu XQ, *et al.* Sexual reproductive characteristics of *Zostera marina* L. in Shuangdao Bay. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(10): 2866–2872 [李乐乐, 郑凤英, 刘雪芹, 等. 双岛湾大叶藻的有性生殖特征. *生态学杂志*, 2015, 34(10): 2866–2872]
- Li LL. Studies on population ecology of *Zostera marina* in Shuangdao Bay, China. Master's Thesis of Shandong University (Weihai), 2015 [李乐乐. 双岛湾大叶藻种群生态学的初步研究. 山东大学(威海)硕士研究生学位论文, 2015]
- Liu YS, Guo D, Zhang PD, *et al.* Assessing establishment success and suitability analysis of *Zostera marina* transplants using staple method in northern lagoons. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2015, 39(2): 176–183 [刘燕山, 郭栋, 张沛东, 等. 北方潟湖大叶藻植株枚订移植法的效果评估与适宜性分析. *植物生态学报*, 2015, 39(2): 176–183]
- Neckles HA, Short FT, Barker S, *et al.* Disturbance of eelgrass *Zostera marina* by commercial mussel *Mytilus edulis* harvesting in marine: Dragging impacts and habitat recovery. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 285(1): 57–73
- Palacio-López K, Beckage B, Scheiner S, *et al.* The ubiquity of phenotypic plasticity in plants: A synthesis. *Ecology and Evolution*, 2015, 5(16): 3389–3400
- Ralph PJ, Burchett MD. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 1998, 103(1): 91–101
- Ramírez-García P, Terrados J, Ramos F, *et al.* Distribution and nutrient limitation of surfgrass, *Phyllospadix scouleri* and *Phyllospadix torreyi*, along the Pacific coast of Baja California (México). *Aquatic Botany*, 2002, 74(2): 121–131
- Ruesink JL. Epiphyte load and seagrass performance are decoupled in an estuary with low eutrophication risk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, 481: 1–8
- Sargent FJ, Leary TJ, Crewz DW, *et al.* Scarring of Florida's seagrasses: Assessment and management options. Florida Department of Environmental Protection, 1995, 66
- Schanz A, Asmus H. Impact of hydrodynamics on development and morphology of intertidal seagrasses in the Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 261: 123–134
- Shelton AO. Temperature and community consequences of the loss of foundation species: Surfgrass (*Phyllospadix* spp., Hooker) in tidepools. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 391(1–2): 35–42
- Short FT, Jones GE, Burdick DM. Seagrass decline: Problems and solutions. *Coastal Wetlands*, 2011a: 439–453
- Short FT, Polidoro B, Livingstone SR, *et al.* Extinction risk assessment of the world's seagrass species. *Biological Conservation*, 2011b, 144(7): 1961–1971
- Statton J, Cambridge ML, Dixon KW, *et al.* Aquaculture of *Posidonia australis* seedlings for seagrass restoration programs: Effect of sediment type and organic enrichment on growth. *Restoration Ecology*, 2013, 21(2): 250–259
- Touchette BW. Physiological and developmental responses of eelgrass (*Zostera marina* L.) to increases in water-column nitrate and temperature. Doctoral Dissertation of North Carolina State University, 2000
- van Katwijk MM, Bos AR, de Jonge VN, *et al.* Guidelines for seagrass restoration: Importance of habitat selection and donor population, spreading of risks, and ecosystem engineering effects. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58(2): 179–188
- van Katwijk MM, Thorhaug A, Marbà N, *et al.* Global analysis of seagrass restoration: The importance of large-scale planting. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 53(2): 567–578
- Verduin JJ, Paling EI, van Keulen M, *et al.* Recovery of donor meadows of *Posidonia sinuosa* and *Posidonia australis* contributes to sustainable seagrass transplantation. *International Journal of Ecology*, 2012, 837317
- Wang J, Zhang Y, Yuan XZ, *et al.* Water quality condition and its seasonal variation of the artificial reef waters in Shuangdao Bay. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(6): 90–95 [王军, 张艳, 苑旭洲, 等. 双岛湾海域人工鱼礁区水质状况及其季节变化特征. *水生态学杂志*, 2012, 33(6): 90–95]
- Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJB, *et al.* Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(30): 12377–12381
- Zhang F. Reproductive strategy of *Zostera marina* population in Shuangdao Bay, China. Master's Thesis of Shandong University (Weihai), 2017 [张飞. 双岛湾鳗草种群生殖策略的研究. 山东大学(威海)硕士研究生学位论文, 2017]

- Zhang PD, Liu YS, Guo D, *et al.* Seasonal variation in growth, morphology, and reproduction of eelgrass *Zostera marina* on the eastern coast of the Shandong Peninsula, China. *Journal of Coastal Research*, 2016, 32(2): 315–322
- Zhang PD, Zhang YH, Zhang HY, *et al.* Research advances in shoot propagation theory and planting technique of seagrasses. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 181–189 [张沛东, 张彦浩, 张宏瑜, 等. 海草植株扩繁理论及其定植效应的研究进展. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 181–189]
- Zhang XC, Liu Y, Song JD, *et al.* Distributions and ecological risk assessment of heavy metals in Shuangdao Bay of Weihai. *Journal of Marine Sciences*, 2014, 32(2): 85–90 [张学超, 刘莹, 宋吉德, 等. 威海双岛湾海域重金属的分布特征及生态风险评价. *海洋学研究*, 2014, 32(2): 85–90]
- Zhao JS, Liu YS, Zhang PD, *et al.* Assessment of the establishment success of eelgrass *Zostera marina* (Alismatales: Zosteraceae) from seeds in a cost-effective seed protection method: Implications for large-scale restoration. *Botanica Marina*, 2016, 59(4): 259–266
- Zheng FY, Qiu GL, Fan HQ, *et al.* Diversity, distribution and conservation of Chinese seagrass species. *Biodiversity Science*, 2013, 21(5): 517–526 [郑凤英, 邱广龙, 范航清, 等. 中国海草的多样性、分布及保护. *生物多样性*, 2013, 21(5): 517–526]
- Zhou YR, Tang W, Zhao B, *et al.* Analysis of nutrients and organic pollution in the Shuangdao Bay. *Marine Science Bulletin*, 2008, 27(3): 115–120 [周艳荣, 唐伟, 赵蓓, 等. 山东威海双岛湾海域营养状态及有机污染状况分析. *海洋通报*, 2008, 27(3): 115–120]

(编辑 马瑾艳)

Distribution and Ecological Characteristics of Seagrass in Shuangdao Bay, Weihai

LI Zheng, LI Wentao, YANG Xiaolong, ZHANG Yanhao, ZHANG Peidong^①

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

Abstract The seagrass bed ecosystem is one of the most productive ecosystems on earth with important ecological functions and ecological service values. In August 2016, the seagrass resources and ecological characteristics were investigated and analyzed in Shuangdao Bay sea area of Weihai city, Shandong Province. Seagrass beds of *Zostera marina* and *Phyllospadix iwatensis* covering approximately 442.19 hm² were discovered. *Z. marina* was distributed over 434.46 hm², which is approximately 98.3% of the total seagrass area. These *Z. marina* plants mostly grow in the eastern part of Shuangdao Bay and in the farming ponds of *Stichopus japonicus*. The average shoot density and biomass of *Z. marina* were (174.2±9.2) shoots/m² and (337.7±17.5) g DW/m², respectively. The distribution area of *P. iwatensis* was 7.73 hm² and was approximately equivalent to 1.7% of the total seagrass area. These *P. iwatensis* plants mostly grow on rocky coasts and displayed an obvious band-like distribution. The average shoot density and biomass of *P. iwatensis* were (889.1±17.1) shoots/m² and (605.9±18.1) g DW/m², respectively. The average water depth of seagrass beds was about 1.6 m and the farming ponds growing *Z. marina* had a hard substrate with an average particle size of (4.3±0.2) mm. The investigation showed that the seagrass habitats are being seriously threatened by human activities, such as pollution discharge from the land, culling, and fishing. Suggestions for the protection of the seagrass beds in Shuangdao Bay have been proposed to provide supplementary data on China's seagrass resources and their conservation.

Key words Seagrass bed; Seagrass species; Distribution area; Ecological characteristics; Shuangdao Bay

① Corresponding author: ZHANG Peidong, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200509002

http://www.yykxjz.cn/

胡清静, 崔正国, 孟赫, 白莹, 宋若晗, 陆长坤, 王宏胜, 曲克明. 海洋环境中有机胺的迁移转化研究进展. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 184-191

Hu QJ, Cui ZG, Meng H, Bai Y, Song RH, Lu CK, Wang HS, Qu KM. Advancements in the transport and transformation of amines in the marine environment. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 184-191

海洋环境中有机胺的迁移转化研究进展*

胡清静^{1,2} 崔正国^{1,2} 孟赫³ 白莹^{1,2} 宋若晗^{1,4}
陆长坤^{1,4} 王宏胜¹ 曲克明^{1,2①}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 山东省青岛生态环境监测中心 青岛 266003; 4. 天津农学院水产学院 天津 300384

摘要 大气中的有机胺具有潜在的气候效应,这是当今国际的研究热点之一。海洋是大气中有机胺的重要来源,但由于海水中有机胺检测难度较大,导致海洋环境中有机胺的产生机制尚不清楚。本文概述了海洋生物体内有机胺前体物的浓度特征及其对环境中有有机胺的影响,阐述了沉积物、海水及大气中有有机胺的浓度特征,分析了海洋大气气溶胶中有有机胺的形成途径,并指出海水中有机胺检测的难点及现阶段亟待解决的科学问题。为深入认识海洋环境中有机胺的迁移转化规律及其潜在气候效应提供科学依据。

关键词 有机胺; 海洋生物; 盐度; 形成途径; 检测方法

中图分类号 P76 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0184-08

大气中的有机胺可促进新粒子生成及颗粒物增长,进而增加云凝结核数浓度,通过改变辐射强迫对气候变化产生潜在重要的影响(Almeida *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016; Sellegri *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2018)。大气中有150余种有机胺,其中,三甲胺(TMA)、二甲胺(DMA)和一甲胺(MMA)是最常见且含量最高的有机胺(Ge *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014)。海洋是这3种有机胺的重要来源,每年向大气中释放80 Gg N (Ge *et al.*, 2011)。有机胺还是海洋生物很重要的氮源和能量源,例如, TMA可被约占海洋水体中总细菌20%的玫瑰杆菌(*Roseobacter*)降解为 NH_4^+ ,同时释放三磷酸腺苷(ATP), ATP可为该细菌提供能量, NH_4^+ 则可被其

他生物利用(Lidbury, 2015);在海洋沉积物中, TMA是温室气体甲烷(CH_4)的重要前体物之一,在含盐环境中, 35%~90%的 CH_4 是由TMA降解而来的(Oremland *et al.*, 1982; King *et al.*, 1983)。但当有机胺浓度过高时,也会对生物造成危害,如在海水养殖环境中, TMA和DMA是鱼类和藻类腐烂所释放气体(鱼腥味)的重要组成部分(Chung *et al.*, 2009),也是致癌物-亚硝基胺的前体物质。高浓度的TMA和DMA会抑制大分子物质(如DNA、RNA和蛋白质)的合成,对动物晶胚有致畸作用(Guest *et al.*, 1992)。因此,认识海洋环境中有机胺的形成机制、浓度变化特征等对海洋生物的健康、海洋氮循环乃至全球气候变化具有重要的意义。

* 国家自然科学基金青年基金(41606097)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022020006; 2020TD12)和国家重点研发计划项目(2019YFD0900500; 2019YFD0901401)共同资助 [This work was supported by Youth Program of National Natural Science Foundation of China (41606097), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020006; 2020TD12), and National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900500; 2019YFD0901400)]. 胡清静, E-mail: huqj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-05-09, 收修改稿日期: 2020-07-03

1 海洋环境中有机胺的源与汇

有机胺主要来源于细菌或酶对甜菜碱(GBT)、氧化三甲胺(TMAO)、胆碱(CHO)等季铵化合物的降解(图1)(Welsh, 2000; Carpenter *et al*, 2012; Lidbury *et al*, 2014; Lidbury, 2015; Lidbury *et al*, 2015a、2015b; Cree, 2015)。在海洋环境中,为了应对高盐度(NaCl)的压力,海洋植物、动物和微生物需要合成或吸收GBT、TMAO来调节细胞渗透压(Carpenter *et al*, 2012; Oren, 2015; Cree, 2015; Sun *et al*, 2019)。所以,季铵化合物在海洋生物中的含量远远大于淡水生物。季铵化合物被玫瑰杆菌等细菌降解后会释放出有机胺(图1)(Carpenter *et al*, 2012; Lidbury, 2015; Lidbury *et al*, 2017)。以上大部分有机胺的形成过程主要发生在碎屑颗粒、浮游动物肠道及沉积物等厌氧环境中(Carpenter *et al*, 2012; Cree, 2015)。因此,有机胺在海洋沉积物和水体中广泛存在。海洋沉积物或水体中有机胺的汇主要有以下3种方式:一部分通过海气交换从海水释放到大气中;一部分被硅藻和鞭毛藻等浮游植物直接吸收(Cree, 2015);剩余部分被降解后最终转化为 NH_4^+ 、 CH_4 和 CO_2 。因此,季铵化合物及有机胺是海洋环境中很重要的碳源、氮源、能量源(Chen, 2012; Lidbury, 2015; Lidbury *et al*, 2015a; Cree, 2015; Taubert *et al*, 2017; Mausz *et al*, 2019; Sun *et al*, 2019)。

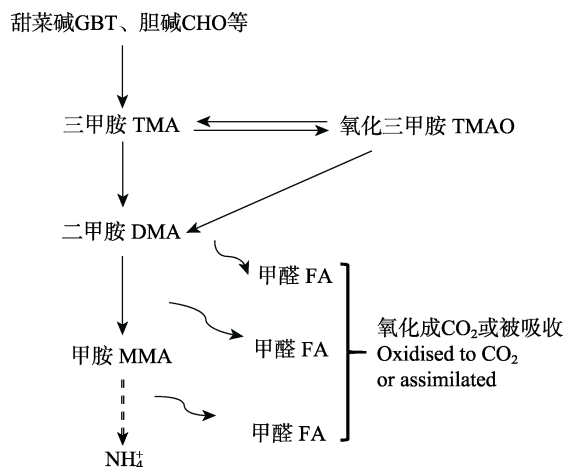


图1 海洋环境中有机胺的产生与降解过程

Fig.1 Production and degradation processes of amines in marine environment (Carpenter *et al*, 2012; Mausz *et al*, 2019)

2 海洋生物体内有机胺前体的浓度分布特征

国内外很多研究发现,海洋植物生物量的增加会

显著促进水体或大气中有机胺浓度的增加(Gibb *et al*, 1999a; Facchini *et al*, 2008; Müller *et al*, 2009; Hu *et al*, 2015、2018; Yu *et al*, 2016; Dall'Osto *et al*, 2017),这主要是因为GBT和TMAO等季铵化合物广泛存在于海洋大型植物和浮游植物等体内,GBT可占藻类干重的2%(Blunden *et al*, 1992)。这些GBT通过细胞破裂和摄食等方式释放到环境中,在含螺旋藻(*Spirulina* sp.)的沉积物中,GBT浓度可达 $100 \mu\text{mol/gdw}$ (King, 1988)。另外,de Vooy等(2002)研究发现,贝类体内也含有大量的GBT,在地中海贝类体内GBT的浓度高达 30.0 g/kg 。

20世纪30年代,Beatty(1938)在腐烂的鱼中第1次发现了TMA,因为在鱼类及软体动物中广泛存在有机胺的另一种重要前体物TMAO(Seibel *et al*, 2002; Summers *et al*, 2017)。TMAO占海洋生物(鱼类和甲壳类等)组织干重的7%(de Vooy, 2002)。在海洋鱼类体内,TMAO可应对盐度、温度和浮力的变化,还可增加蛋白质的稳定性(Summers *et al*, 2017)。例如,广盐性鲨鱼从淡水转入海水中,体内TMAO浓度显著增加(Pillans *et al*, 2005)。广盐性软骨鱼随着盐度的减小,TMAO的浓度显著降低(Sulikowski *et al*, 2003)。Chung等(2009)通过对香港89种(共266条)海水鱼、海水和淡水两栖鱼类、淡水鱼体内的TMAO分析发现,9种淡水鱼中只有3种可检测出TMAO,8种海水和淡水两栖鱼类中有6种可检测出TMAO,而72种海水鱼均可检测出TMAO,海水鱼体内TMAO的浓度范围为 $(0.12\sim 3.5) \text{ g/kg}$,平均浓度为 $(1.4\pm 0.75) \text{ g/kg}$ 。在山东青岛阿根廷鱿鱼(*Illex argentinus*)的TMAO含量为 8.8 g/kg ,硬骨鱼TMAO的含量范围为 $(0.35\sim 2.3) \text{ g/kg}$,甲壳类TMAO的含量 $>1.7 \text{ g/kg}$,贝类的TMAO含量低于 0.5 g/kg 。因此,在不同种类动物体内TMAO的含量存在差异,例如,头足类 $>$ 甲壳类 $>$ 硬骨鱼类 $>$ 贝类(姜城子等, 2014)。海洋动物会通过分泌、排泄或被降解向环境中释放TMAO(Sun *et al*, 2019)。通过宏基因组研究发现,海洋环境中含有TMAO还原酶(把TMAO降解为TMA),这说明TMAO降解产生的TMA也可能是海洋环境中TMA等有机胺的一个重要来源(Sun *et al*, 2019)。因此,海洋动物越多,海洋环境中有机胺的浓度就会越高(Sørensen *et al*, 1987)。虽然,海洋环境中有大量鱼类等动物(陆尧等, 2019; 戴芳群等, 2020),但现阶段关于海洋动物对海水中有有机胺影响的报道较少,特别是关于海洋动物种类、数量与海水或大气中有有机胺浓度的定性或定量关系鲜有报道。

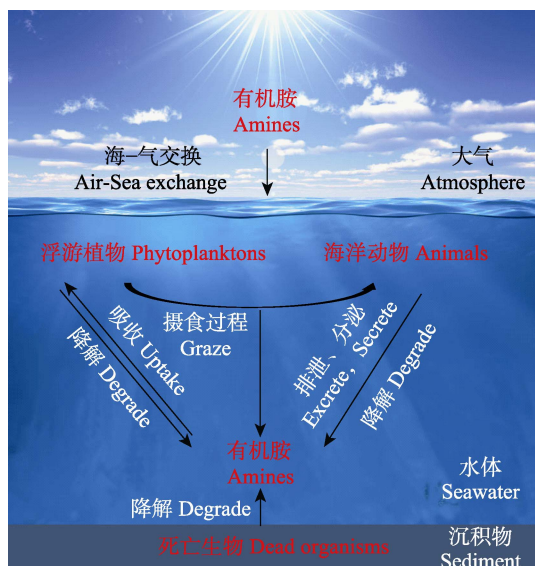


图2 海洋植物和动物对环境中有有机胺的影响示意图
Fig.2 Effects of marine plants and animals on amines in the environment

3 海洋环境中有机胺的浓度特征

海洋生物体内的 TMAO、GBT 和 CHO 等被降解后会环境影响环境中有机胺的浓度(图 2)。Mausz 等(2019)和 Sun 等(2019)对海水及沉积物空隙水中有机胺的浓度做了详细总结,一般情况下,1 L 海水中有机胺的浓度为纳摩尔级,其浓度较低,所以检测难度较大,1 L 沉积物的孔隙水中有机胺的浓度较 1 L 海水中高 1~3 个数量级(微摩尔级)。例如,在英国默尔塞河口沉积物的孔隙水中 MMA、DMA 和 TMA 的最高浓度分别是 319、9 和 50 $\mu\text{mol/L}$ (Mausz *et al.*, 2019)。由于沉积物中的有机质可吸附有机胺,所以,沉积物中有机胺的浓度也较高(Wang *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994)。例如,在泰晤士河口沉积物中 3 种有机胺的浓度之和可达 26 $\mu\text{mol/g}$ (Fitzsimons *et al.*, 2006)。

一般情况下,海洋大气中颗粒态有机胺盐的浓度是皮克至纳克级(Cree, 2015; van Pinxteren *et al.*, 2019)。例如,阿拉伯海大气 $\text{PM}_{1.0}$ (空气动力学直径 $\leq 1.0 \mu\text{m}$ 的颗粒物)中 TMA^+ 和 DMA^+ 的浓度范围为(0.02~0.9)和(1.0~17.1) ng/m^3 (Gibb *et al.*, 1999b); van Pinxteren等(2019) 2011~2013年在热带大西洋的佛得角岛进行观测,发现 $\text{PM}_{1.0}$ 中 MMA^+ 和 DMA^+ 的浓度范围为(0~0.6)和(2.2~13.0) ng/m^3 ; 地中海东部克里特岛大气 $\text{PM}_{1.0}$ 中 DMA^+ 的平均浓度为(9.0 \pm 36.1) ng/m^3 ,但是 TMA^+ 浓度低于检测限(Violaki *et al.*, 2010); 北大西洋(爱尔兰西海岸)大气 $\text{PM}_{8.0}$ 中 DMA^+ 的浓度<(1.0~24.0) ng/m^3 (Facchini *et al.*, 2008); 我国近海大气 PM_{10}

(或 $\text{PM}_{0.056-10}$)中 DMA^+ 和 TMA^+ 的平均浓度范围为(0~49.5)和(6.5~44.9) ng/m^3 (Yu *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019), 而 $\text{PM}_{0.1}$ 中 DMA^+ 和 TMA^+ 的浓度范围分别是(0.0~5.4)和(2.7~19.5) ng/m^3 (Yu *et al.*, 2016)。这说明我国近海大气中有机胺盐的浓度比世界上大部分其他海域高,特别是2012年5月 PM_{11} 中有机胺盐浓度甚至比世界其他海域高1~3个数量级(Hu *et al.*, 2015), 如此高浓度有机胺可能具有很重要的气候效应,但其形成原因有待进一步确认。

4 海洋大气气溶胶中有有机胺盐的形成途径

目前,国际上对海洋大气气溶胶中有有机胺盐的形成途径存在争议。国际主流观点认为,海水中有有机胺通过海气交换进入大气中,一部分以气态形式存在,另一部分气体再通过大气化学反应形成二次有机胺盐(即来自二次源)(Gibb *et al.*, 1999b; Facchini *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009; Myriokefalitakis *et al.*, 2010; Köllner *et al.*, 2017; Willis *et al.*, 2017)。例如, Müller等(2009)研究发现,海洋大气气溶胶中高浓度的有机胺盐主要分布在(0.14~0.42) μm 粒径段上, Facchini等(2008)研究发现,海洋大气气溶胶中高浓度的有机胺盐主要分布在(0.25~0.50) μm 粒径段上,并且与二次生成的 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 和甲基磺酸盐(MSA $^-$)的粒径分布相似,认为该大气气溶胶中有有机胺盐是二次生成的。通过对2012~2016年从我国近海到西北太平洋10多个航次分析发现,大气气溶胶中的 DMA^+ 和 TMA^+ 主要分布在(0.20 \pm 0.10)、(0.40 \pm 0.10)和(0.80 \pm 0.20) μm 等的粒径段上,推测这些有机胺盐也是来自二次源(Hu *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2018)。

但是, Frossard 等(2014)在开阔大洋的一次源有机气溶胶中检测出了有机胺官能团; Gorzelska 等(1990)推测,在大风浪天气条件下,富含有机胺的海洋表层物质可能会随着海盐气溶胶被传输到大气中,从而导致大气气溶胶中有有机胺盐浓度升高; Hu 等(2018)在2014年春季对西北太平洋大气气溶胶中有有机胺盐进行分析发现,该区域有机胺盐的平均浓度比近海高1个数量级, TMA^+ 浓度最高(4.4 nmol/m^3)的样品是在风速最高时(14 m/s)被检测到,并且绝大部分样品中 TMA^+ 的粒径分布与最高浓度样品的相似,即:大气气溶胶中 TMA^+ 的浓度随粒径的减小逐渐升高(Hu *et al.*, 2018)。Hu 等(2017)研究发现,当风速 $>5.4 \text{ m/s}$ 时,西北太平洋水体中的有机质和细菌可能会通过海洋飞沫气溶胶被传输到大气中,并且海洋飞

沫气溶胶中有机质的丰度会随粒径的减少而增加(Gantt *et al*, 2013; Quinn *et al*, 2014、2015)。另外,国际上很多专家通过室内海洋飞沫气溶胶模拟实验,也发现海水中的有机质主要富集在亚微米大气气溶胶上(Quinn *et al*, 2015; Hultin *et al*, 2010; Rastelli *et al*, 2017)。因此, Hu 等(2018)推测, 在高风速条件下, 海水中的 TMA⁺随海洋飞沫被直接传输到大气中(即来自一次源)。Dall'Osto 等(2019)研究显示, 大气气溶胶中一次源有机胺盐占总有机胺盐的 11%~25%。总体来说, 现阶段关于一次源有机胺盐对总有机胺盐占比的报道仍然较少。

5 海水中有机胺的检测方法

现阶段, 国际上关于海洋生物体内有机胺前体物浓度、大气中有机胺浓度的报道相对较多, 但由于海水中有机胺浓度较低(nmol/L级), 且 MMA、DMA 和 TMA 具有易溶于水、极性强度和易挥发等特点, 一直以来海水中有机胺的检测具有较大的挑战(Carpenter *et al*, 2012; Cree, 2015; Sun *et al*, 2019), 从而也限制了对海洋环境中有机胺迁移转化规律的认识。目前, 海水中有机胺的检测主要分为3个关键的阶段: 预浓缩阶段、分离阶段和检测阶段。预浓缩所用的前处理装置主要有: 固相微萃取(SPME)、顶空固相微萃取(HS-SPME)和吹扫捕集装置(P&T)等。分离和检测阶段主要是由离子色谱(IC)或气相色谱仪(GC)等组合不同检测器完成(Cree, 2015)。

采用 IC 可检测大气中有机胺的浓度(Hu *et al*, 2015、2018; Yu *et al*, 2016; Xie *et al*, 2018), 但由于有机胺分析柱承载不了海水中高浓度的 Na⁺, 导致海水中有机胺不能直接在 IC 上测试(Ferreira *et al*, 2017)。Ferreira 等(2017)通过向 P&T 装置中加入 NaOH, 把含盐水体中有机胺挥发出来, 再进行浓缩, 最后进入 IC 测试。但 P&T-IC 方法对有机胺检测的灵敏度较低, 且在吹扫捕集的捕集阱内会存在严重残留, 且捕集阱内装填的吸附剂种类不同其吸附性能差异也较大(中华人民共和国国家标准 HJ 1042-2019), 也不适合对海水中低浓度有机胺的浓缩。Gibb 等(1995)采用流动注入气体扩散(FIGD)装置与 IC 结合可很好地测试海水中的有机胺。但由于 FIGD 比较复杂, 近 20 年来该方法未得到广泛地应用(Cree, 2015)。

GC 对有机胺检测的灵敏度较高(Huang *et al*, 2014)。国内外很多专家采用 GC 结合不同检测器来测定大气、水体、孔隙水和沉积物中的有机胺, 如气相色谱仪-质谱仪(GC-MS)、气相色谱仪-火焰检测器

(GC-FID)和气相色谱仪-氮磷检测器(GC-NPD)(Cree, 2015)。采用该仪器检测大气中有机胺的方法与水体的大体相似。基本原理是把大气采样膜或沉积物中的有机胺萃取到水体中, 然后, 通过衍生或把有机胺挥发、再浓缩后进行测试。但 GC-MS 只能测 DMA⁺或 TMA⁺中的 1 种(Liu *et al*, 2017; Zhuang *et al*, 2017、2018), 很难实现 DMA⁺和 TMA⁺的同步检测(Cree *et al*, 2018)。GC-FID 和 GC-NPD 可同步检测以上 2 种有机胺。与 GC-FID 相比, GC-NPD 对海水中有机胺的灵敏度会更高(Cree, 2015)。Cree 等(2018)研究显示, 可采用 SPME-GC-NPD 检测海水中的 TMA⁺、DMA⁺和 MMA⁺, 检测限可达(0.4~2.9) nmol/L。虽然, 该方法也存在一些不足之处, 如该前处理方法耗时较长、分析较低浓度样品时可能会存在实验误差等(Sun *et al*, 2019), 但相比较而言, 目前, 该方法是国际上检测海水中有机胺比较有效的方法之一。

6 存在问题及展望

综上所述, 虽然目前国内外对海洋生物体内有机胺前体物的浓度、降解这些前体物的优势细菌及大气中有机胺的潜在气候效应等方面开展了一定的研究, 但海洋环境中有机胺的迁移转化规律还不清楚, 还有许多问题需要解决, 具体体现在以下几点:

(1)海洋生物对环境中有有机胺的贡献。系统分析不同种类浮游植物、动物体内有机胺前体物的浓度分布特征; 阐明这些前体物在食物链上的传递规律; 鉴定天然海域中把这些前体物降解为有机胺的优势细菌; 通过计算海洋生物量与环境中有有机胺浓度的比值, 估算海洋生物对环境中有有机胺的贡献。

(2)海水中有机胺向大气中传输的影响机制。通过利用在线离子色谱获取高时空分辨率的气态和颗粒态有机胺数据, 解析温度、相对湿度和风速等气象因子对它们从海水向大气中传输的影响。

(3)我国近海高浓度有机胺的来源解析。我国近海不仅藻华和绿潮等灾害频发, 同时, 还进行着大规模的海水养殖。通过现场观测, 进一步解析我国近海大量的浮游植物和养殖动物对我国近海大气中高浓度有机胺的贡献。

(4)海水中有机胺检测方法的建立。目前, GC-NPD 是一种有效分离 3 种有机胺的检测方法, 但采用 SPME 浓缩海水中有机胺的方法还存在一定的不足, 未来通过研发更好的海水中有机胺的提取方法, 再结合 GC-NPD 实现海水中有机胺的检测。从而进一步阐明有机胺在海洋生物、水体和大气中的迁

移转化规律, 以提升对海洋大气中有机胺潜在气候效应的认识。

参 考 文 献

- Almeida J, Schobesberger S, Kürten A, *et al.* Molecular understanding of sulphuric acid-amine particle nucleation in the atmosphere. *Nature*, 2013, 502(7471): 359–363
- Beatty SA. Studies of fish spoilage: II. The origin of trimethylamine produced during the spoilage of cod muscle press juice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1938, 4a(2): 63–68
- Blunden G, Smith BE, Irons MW, *et al.* Betaines and tertiary sulphonium compounds from 62 species of marine algae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1992, 20(4): 373–388
- Carpenter LJ, Archer SD, Beale R. Ocean-atmosphere trace gas exchange. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(19): 6473–6506
- Chen HH, Varner ME, Gerber RB, *et al.* Reactions of methanesulfonic acid with amines and ammonia as a source of new particles in air. *Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120(8): 1526–1536
- Chen Y. Comparative genomics of methylated amine utilization by marine *Roseobacter* clade bacteria and development of functional gene markers (*tmm*, *gmaS*). *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2308–2322
- Chung SWC, Chan BTP. Trimethylamine oxide, dimethylamine, trimethylamine and formaldehyde levels in main traded fish species in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants Part B Surveillance*, 2009, 2(1): 44–51
- Cree C. Distributions of glycine betaine and the methylamines in coastal waters: Analytical developments and a seasonal study. *Doctoral Dissertation of Plymouth University*, 2015
- Cree CHL, Airs R, Archer SD, *et al.* Measurement of methylamines in seawater using solid phase microextraction and gas chromatography. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2018, 16(7): 411–420
- Dai FQ, Zhu L, Chen YL. Variations of fishery resource structure in the Yellow Sea and East China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 1–10 [戴芳群, 朱玲, 陈云龙. 黄、东海渔业资源群落结构变化研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 1–10]
- Dall'Osto M, Airs RL, Beale R, *et al.* Simultaneous detection of alkylamines in the surface ocean and atmosphere of the Antarctic sympagic environment. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2019, 3(5): 854–862
- Dall'Osto M, Ovadnevaite J, Paglione M, *et al.* Antarctic sea ice region as a source of biogenic organic nitrogen in aerosols. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6047
- de Vooy CGN, Genevasen JAJ. Biosynthesis and role in osmoregulation of glycine-betaine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 132(2): 409–414
- de Vooy CGN. Occurrence and role of a Quaternary base, trimethylamine oxide, in two cockle species, *Cerastoderma edule* and *Cerastoderma lamarcki*. *Journal of Sea Research*, 2002, 47(1): 69–73
- Facchini MC, Decesari S, Rinaldi M, *et al.* Important source of marine secondary organic aerosol from biogenic amines. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(24): 9116–9121
- Ferreira FN, Afonso JC, Pontes FVM, *et al.* Ultrasound-assisted purge-and-trap extraction for simultaneous determination of low-molecular weight amines and ammonium in high salinity waters by ion chromatography. *Microchemical Journal*, 2017, 133: 658–662
- Fitzsimons MF, Millward GE, Revitt DM, *et al.* Desorption kinetics of ammonium and methylamines from estuarine sediments: Consequences for the cycling of nitrogen. *Marine Chemistry*, 2006, 101(1–2): 12–26
- Frossard AA, Russell LM, Burrows SM, *et al.* Sources and composition of submicron organic mass in marine aerosol particles. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2014, 119(22): 12977–13003
- Gantt B, Meskhidze N. The physical and chemical characteristics of marine primary organic aerosol: A review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2013, 13(8): 3979–3996
- Ge X, Wexler AS, Clegg SL. Atmospheric amines-Part I. A review. *Atmospheric Environment*, 2011, 45(3): 524–546
- Gibb SW, Mantoura RFC, Liss PS, *et al.* Distributions and biogeochemistries of methylamines and ammonium in the Arabian Sea. *Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography*, 1999a, 46(3–4): 593–615
- Gibb SW, Mantoura RFC, Liss PS. Analysis of ammonia and methylamines in natural waters by flow injection gas diffusion coupled to ion chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 316(3): 291–304
- Gibb SW, Mantoura RFC, Liss PS. Ocean-atmosphere exchange and atmospheric speciation of ammonia and methylamines in the region of the NW Arabian Sea. *Global Biogeochemical Cycles*, 1999b, 13(1): 161–178
- Gorzelska K, Galloway JN. Amine nitrogen in the atmospheric environment over the North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 1990, 4(3): 309–333
- Guest I, Varma DR. Teratogenic and macromolecular synthesis inhibitory effects of trimethylamine on mouse embryos in culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1992, 36(1): 27–41
- Hu QJ, Qu KM, Gao HW, *et al.* Large increases in primary trimethylaminium and secondary dimethylaminium in atmospheric particles associated with cyclonic eddies in the Northwest Pacific Ocean. *Journal of Geophysical Research:*

- Atmospheres, 2018, 123(21): 12133–12146
- Hu QJ, Yu PR, Zhu YJ, *et al.* Concentration, size distribution and formation of trimethylaminium and dimethylaminium ions in atmospheric particles over marginal seas of China. *Journal of the Atmospheric Sciences*, 2015, 72: 3487–3498
- Hu W, Murata K, Fukuyama S, *et al.* Concentration and viability of airborne bacteria over the Kuroshio extension region in the northwestern Pacific Ocean: Data from three cruises. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2017, 122(23): 12892–12905
- Huang RJ, Li WB, Wang YR, *et al.* Determination of alkylamines in atmospheric aerosol particles: A comparison of gas chromatography-mass spectrometry and ion chromatography approaches. *Atmospheric Measurement Techniques*, 2014, 7(7): 2027–2035.
- Hultin KAH, Nilsson ED, Krejci R, *et al.* In situ laboratory sea spray production during the marine aerosol production 2006 cruise on the northeastern Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2010, 115, D06201
- Jiang CZ, Cui J, Zhou MM, *et al.* Determination of trimethylamine-N-oxide content in common aquatic products in Qingdao. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014(1): 41–46 [姜城子, 崔洁, 周苗苗, 等. 青岛地区部分水产品中氧化三甲胺含量的测定. *食品安全质量检测学报*. 2014(1): 41–46]
- King GM, Klug MJ, Lovley DR. Metabolism of acetate, methanol, and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(6): 1848–1853
- King GM. Methanogenesis from methylated amines in a hypersaline algal mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(1): 130–136
- Köllner F, Schneider J, Willis MD, *et al.* Particulate trimethylamine in the summertime Canadian high Arctic lower troposphere. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2017, 17(22): 13747–13766
- Lidbury I, Kimberley G, Scanlan DJ, *et al.* Comparative genomics and mutagenesis analyses of choline metabolism in the marine *Roseobacter clade*. *Environmental Microbiology*, 2015a, 17(12): 5048–5062
- Lidbury I, Mausz MA, Scanlan DJ, *et al.* Identification of dimethylamine monooxygenase in marine bacteria reveals a metabolic bottleneck in the methylated amine degradation pathway. *ISME Journal*, 2017, 11(7): 1592–1601
- Lidbury I, Murrell JC, Chen Y. Trimethylamine N-oxide metabolism by abundant marine heterotrophic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(7): 2710–2715
- Lidbury I. Microbial methylated amine metabolism in marine surface waters. Doctoral Dissertation of University of Warwick, 2015
- Lidbury I, Murrell JC, Chen Y. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide are supplementary energy sources for a marine heterotrophic bacterium: Implications for marine carbon and nitrogen cycling. *ISME Journal*, 2015b, 9(3): 760–769
- Liu FX, Bi XH, Zhang GH, *et al.* Concentration, size distribution and dry deposition of amines in atmospheric particles of urban Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, 2017, 171: 279–288
- Lu Y, Chen XJ, Wang JT, *et al.* Dynamics of suitable habitat of *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 19–25 [陆尧, 陈新军, 汪金涛, 等. 西北太平洋柔鱼适宜栖息地动态变化研究. *渔业科学进展*. 2019, 40(5): 19–25]
- Mausz MA, Chen Y. Microbiology and ecology of methylated amine metabolism in marine ecosystems. *Current Issues in Molecular Biology*, 2019, 33: 133–148
- Müller C, Iinuma Y, Karstensen J, *et al.* Seasonal variation of aliphatic amines in marine sub-micrometer particles at the Cape Verde islands. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2009, 9(4): 9587–9597
- Myriokefalitakis S, Vignati E, Tsigaridis K, *et al.* Global modeling of the oceanic source of organic aerosols. *Advances in Meteorology*, 2010(4): 1–16
- Oremland RS, Marsh LM, Polcin S. Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature*, 1982, 296(5853): 143–145
- Oren A. Cyanobacteria in hypersaline environments: Biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 2015, 24(4): 781–798
- Pillans RD, Good JP, Anderson WG, *et al.* Freshwater to seawater acclimation of juvenile bull sharks (*Carcharhinus leucas*): Plasma osmolytes and Na⁺/K⁺-ATPase activity in gill, rectal gland, kidney and intestine. *Journal of Comparative Physiology B*, 2005, 175(1): 37–44
- van Pinxteren M, Fomba KW, van Pinxteren D, *et al.* Aliphatic amines at the Cape Verde Atmospheric Observatory: Abundance, origins and sea-air fluxes. *Atmospheric Environment*, 2019, 203: 183–195
- Quinn PK, Bates TS, Schulz KS. Contribution of sea surface carbon pool to organic matter enrichment in sea spray aerosol. *Nature Geoscience*, 2014, 7(3): 228–232
- Quinn PK, Collins DB, Grassian VH, *et al.* Chemistry and related properties of freshly emitted sea spray aerosol. *Chemical Reviews*, 2015, 115(10): 4383–4399
- Rastelli E, Corinaldesi C, Dell'Anno A, *et al.* Transfer of labile organic matter and microbes from the ocean surface to the marine aerosol: An experimental approach. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11475
- Seibel BA, Walsh PJ. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: Relationship to acylglycerol storage. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(3): 297–306
- Sellegrì K, Pey J, Rose C, *et al.* Evidence of atmospheric

- nanoparticle formation from emissions of marine microorganisms. *Geophysical Research Letters*, 2016, 43(12): 6596–6603
- Sørensen J, Glob E. Influence of benthic fauna on trimethylamine concentrations in coastal marine sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 1987, 39: 15–21
- Sulikowski JA, Treberg JR, Howell WH. Fluid regulation and physiological adjustments in the winter skate, *Leucoraja ocellata*, following exposure to reduced environmental salinities. *Environmental Biology of Fishes*, 2003, 66(4): 339–348
- Summers G, Wibisono RD, Hedderley DI, *et al.* Trimethylamine oxide content and spoilage potential of New Zealand commercial fish species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2017, 51(3): 393–405
- Sun J, Mausz MA, Chen Y, *et al.* Microbial trimethylamine metabolism in marine environments. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(2): 513–520
- Taubert M, Grob C, Howat AM, *et al.* Methylamine as a nitrogen source for microorganisms from a coastal marine environment. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(6): 2246–2257
- Violaki K, Mihalopoulos N. Water-soluble organic nitrogen (WSON) in size-segregated atmospheric particles over the Eastern Mediterranean. *Atmospheric Environment*, 2010, 44(35): 4339–4345
- Wang XC, Lee C. Sources and distribution of aliphatic amines in salt marsh sediment. *Organic Geochemistry*, 1994, 22(6): 1005–1021
- Wang XC, Lee C. The distribution and adsorption behavior of aliphatic amines in marine and lacustrine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1990, 54(10): 2759–2774
- Welsh DT. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(3): 263–290
- Willis MD, Köllner F, Burkart J, *et al.* Evidence for marine biogenic influence on summertime Arctic aerosol. *Geophysical Research Letters*, 2017, 44(12): 6460–6470
- Xie H, Feng LM, Hu QJ, *et al.* Concentration and size distribution of water-extracted dimethylammonium and trimethylammonium in atmospheric particles during nine campaigns—Implications for sources, phase states and formation pathways. *Science of the Total Environment*, 2018, 631–632: 130–141
- Yao L, Garmash O, Bianchi F, *et al.* Atmospheric new particle formation from sulfuric acid and amines in a Chinese megacity. *Science*, 2018, 361(6399): 278–281
- Yu F, Luo G. Modeling of gaseous methylamines in the global atmosphere: Impacts of oxidation and aerosol uptake. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2014, 14(22): 12455–12464
- Yu PR, Hu QJ, Kai L, *et al.* Characteristics of dimethylammonium and trimethylammonium in atmospheric particles ranging from supermicron to nanometer sizes over eutrophic marginal seas of China and oligotrophic open oceans. *Science of the Total Environment*, 2016, 572: 813–824
- Zhou SQ, Li HW, Yang TJ, *et al.* Characteristics and sources of aerosol ammoniums over the eastern coast of China: Insights from the integrated observations in a coastal city, adjacent island and surrounding marginal seas. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2019, 19(16): 10447–10467
- Zhuang GC, Heuer VB, Lazar CS, *et al.* Relative importance of methylophilic methanogenesis in sediments of the Western Mediterranean Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 224: 171–186
- Zhuang GC, Lin YS, Bowles MW, *et al.* Distribution and isotopic composition of trimethylamine, dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in marine sediments. *Marine Chemistry*, 2017, 196: 35–46

(编辑 马璀璨)

Advancements in the Transport and Transformation of Amines in the Marine Environment

HU Qingjing^{1,2}, CUI Zhengguo^{1,2}, MENG He³, BAI Ying^{1,2}, SONG Ruohan^{1,4},
LU Changkun^{1,4}, WANG Hongsheng¹, QU Keming^{1,2}^①

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

3. Qingdao Eco-Environment Monitoring Center of Shandong Province, Qingdao 266003;

4. Department of Fishery Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract In the atmosphere, amines play potentially important roles in climate change, which is a hot spot of the current international research. The ocean is an important source of amines in the atmosphere; however, the mechanism of the formation of amines in the environment has not been elucidated due to the difficulty of detecting amines in seawater. This article outlines the concentration characteristics of amine precursors in marine organisms and their impact on amines in the marine environment; summarizes the concentration characteristics of amines in sediments, seawater, and the atmosphere; analyzes the formation pathway of amines in marine atmospheric particles; and identifies the difficulties in the detection of amines in seawater and the related problems that need urgent attention. This study provides insights into the transport and transformation of amines in the marine environment and the resulting climatic effects on the marine atmosphere.

Key words Amines; Marine organisms; Salinity; Formation pathways; Detection methods

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》投稿须知

《渔业科学进展》主要刊载水产领域各学科的基础理论和应用研究成果，设研究论文、研究简报，也刊载反映水产学科发展方向的优秀综述文章，但不接收第一作者为硕士生的综述。对于创新性高的论文，本刊承诺在最短时间内予以优先发表。经本刊审定录用的稿件均可在知网网络版优先发表，并视同正式发表。

期刊使用在线稿件处理系统 <http://www.yykxjz.cn>。请至本刊主页“作者登录”注册、登录，根据提示提交 Word 稿件。投稿前，请进行以下确认：

1. 该论文为作者原创，享有自主知识产权，无抄袭问题，无学术伪造，不涉及泄密。
2. 该论文的相关内容无一稿多投，也未在其他任何刊物上发表。
3. 该论文作者的署名及顺序经每位作者确认，属实且准确，作者之间无署名及排序纠纷。
4. 该论文的研究符合道德准则及学术伦理，并遵守国家相应的法律法规；该论文用做实验的动物享受了其应有的福利及人道处理。

审稿及发表事项

1. 本刊实行同行专家双盲审，您可推荐相关专家若干名，并列明专家姓名、单位、研究方向及邮箱等。
2. 论文经 2 位以上专家审阅、编委会审定，编辑部在 2 个月内将审稿意见反馈给作者，期间作者不得将该论文投往他刊。
3. 论文出版后将收取版面费，300 元/版(≤ 10 版)，450 元/版(> 10 版)，如印刷彩图，费用另计。稿件刊登后酌付稿酬，并赠送 2~3 本当期期刊。

论文写作要求

1. 在摘要里需明确该论文的创新点 1~2 个。需提供详细的英文摘要，可以比中文摘要更详细、更丰富，其内容“拥有与论文同等量的主要信息”，字数在 300 个单词以上。
2. 作者单位的中英文需对应，需写明系或学院全称，请写明各层次的重点实验室名称(如有)，并核实其准确性。
3. 在文稿首页的脚注处注明资助项目及编号(请同时提供中文和英文)，并注明第一作者的 E-mail 和通讯作者的职称、E-mail。
4. 文章各部分的格式，请参考网站最新发表的文章，无需考虑文章的格式排版。
5. 物种在文中首次出现，应同时写出其拉丁文名。
6. 注意区分蛋白和基因的大小写、正斜体，蛋白用大写、正体，基因用小写、斜体。

7. 图的要求

- (1) 图中不同图例之间要易于区分，如较难区分，可制作彩图。
- (2) 图中所有内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中、英文双语。
- (3) 横、纵坐标需符合规范，包括中英文标目、单位(如有)。如：磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
- (4) 图中的数据、方程等要与文中的描述一致。
- (5) 图件请插入论文 Word 文档的相应位置，供审稿专家审阅。
- (6) 投稿时，请将所有图的原始图打包，作为附件上传，方便排版时调整图中文字的字体和字号。线条图、柱状图等可提供原始软件制作的矢量图，如 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件。照片图可提供 ppt 文件，每张照片单独成张，图中的线、点、箭头、文字等可编辑。

8. 表格的要求

- (1) 请制作成三线表(顶线、表头线、底线)。
- (2) 表题、表注等需用中、英文双语标注。
- (3) 表格中的数据精确度(小数点后的位数)保持一致，一般情况下，小数点后的数字不超过 3 位。

9. 参考文献的要求

- (1) 对国内外发表的相关论文，特别是近期的研究成果应充分引用。所有文献按字母顺序排列。
- (2) 中文参考文献需列出对应英文信息，请从数据库查阅其英文题目、期刊名称等。
- (3) 文中提及的文献需和文后列出的文献相对应，请仔细核对：正文中引用的文献，是否在正文后的参考文献部分中列出；参考文献部分中列出的，是否已在正文中引用。
- (4) 参考文献的卷、期(如有)、页码均需详细列出。参考文献的作者需列出前 3 位。英文参考文献，请注意区分外国作者的 Last name 和 First name，姓在前，名在后，名用缩写。英文刊名请使用全称。

《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
张士璀 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42卷 第2期 2021年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.42 No.2 Apr. 2021

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕

印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press

Address: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences

Address: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发刊

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986217