

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4期 NO.4



中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

主办



科学出版社
Science Press

出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 42 卷 第 4 期

2021 年 8 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)核心来源期刊
中国科技论文统计源核心期刊
RCCSE 中国权威学术期刊
中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、
中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊
中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊
英国《动物学记录》(ZR)收录期刊
《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊
《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊
《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊
《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

研究论文

- 基于灰色系统的北太平洋柔鱼渔汛特征分析及旺汛期预测解明阳 陈新军 (1)
- 象山湾常见海洋生物体内微塑料的丰度、形态和成分组成研究于翔 许莉莉 (9)
- 吕泗渔场主要渔获物春夏秋三季脂肪酸组成及食性分析刘强 黄伟 曹亮 窦硕增 (9)
- 不同管理方式对参池颗粒物沉降作用及沉积物的影响陈仕煊 于雯雯 张虎 张硕 (19)
- 基于 AFLP 分析的乌江四川裂腹鱼种群遗传结构及多样性研究李乐洲 王祖峰 张东升 雷兆霖 (29)
- 塔里木河流域 5 个地理种群的叶尔羌高原鳅遗传多样性分析张津源 杨耿介 王玉龙 周玮 (29)
- 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安丹丹 代应贵 邹习俊 (39)
- 基于 K-means 动态聚类的鸢乌贼角质颚模式识别王锦秀 任道全 王新月 陈生熬 宋勇 (46)
- 溶解氧对团头鲂耐低氧新品系 F₅ 代的鳃组织形态及各组织酶活性的影响闫允君 卢霞 孟宪红 栾生 陈宝龙 孔杰 (55)
- 中华鲟幼鱼渗透调节器官组织结构在海水条件下的适应性调整郑芯瑜 刘必林 孔祥洪 王雪辉 (64)
- 吉富罗非鱼成鱼脏器系数的研究钱辰颖 郑国栋 陈杰 邹曙明 (73)
- 长吻鮠形态性状对体质量的影响秦少宗 冷小茜 罗江 杜浩 (82)
- 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化酶活性的影响刘志刚 乔新美 熊伟 危起伟 (82)
- 饲料蛋白能量比对红鳍东方鲀幼鱼的生长性能、饲料利用和体组成的影响徐娟娟 王卓群 舒秀君 (90)
- 饲料维生素 C 对急性降温后花鲈免疫、抗氧化及抗应激的影响程波 任源远 张欣 王赛赛 韩刚 穆迎春 宋恽 (90)
- 一株河鲈源致病性虫草菌 *Cordyceps confragosa* CHL02 菌株的全基因组测序及比较基因组分析李哲 敬庭森 李雨 陆安帅 周剑 罗辉 叶华 (98)
- 辽宁大连裙带菜虫害生物调查及其系统发育分析王盼 史文军 万夕和 沈辉 沙士兵 黎慧 王李宝 孙瑞健 蒋葛 吴旭干 (106)
- 多氯联苯(PCB₁₅₃)对湛江叉鞭金藻生理生态和超微结构的影响王建学 卫育良 徐后国 孙曙光 梁萌青 (116)
- 不同营养盐条件对琼枝生长的影响孙敬诚 李潇 鲁康乐 王玲 宋凯 张春晓 (126)
- 一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断张艳珍 付龙威 隋智海 王咏星 刘云国 (134)
- DNA 条形码技术鉴定青岛市售三文鱼水产品李晓东 曾宥维 冷晓飞 张明付 李新正 逢少军 (145)
- 不同等级中华绒螯蟹滋味物质的比较分析孙小雨 王祎哲 李旻 徐旭 (158)
- 条斑紫菜烤制前后特征风味变化研究周文礼 邵蓬 高金伟 窦勇 贾旭颖 (158)
- 海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的制备及性能曾俊 童立豪 吴翔宇 黄敏 唐贤明 (168)
-何礼娟 杨慧超 李杰 唐磊 刘聪 莫照兰 (177)
-赵新宁 牟铭 李昂 柳淑芳 庄志猛 (184)
-杨方 高沛 许艳顺 姜启兴 夏文水 (192)
-赵玲 曹荣 王联珠 刘淇 刘胜男 (199)
-邓小雪 程腾 赵芸 许加超 李昭勇 付晓婷 (208)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.42 No.4 August 2021

Analysis of the Fishing Seasons Characteristics of <i>Ommastrephes bartramii</i> and Prediction of the Main Fishing Seasons Based on the Grey System Theory	XIE Mingyang, CHEN Xinjun	(1)
Abundance, Shape, and Chemical Composition of Microplastics within Ten Common Marine Species in Xiangshan Bay	YU Xiang, XU Lili, LIU Qiang, HUANG Wei, CAO Liang, DOU Shuozeng	(9)
Fatty Acid Composition and Feeding Habits Analysis of the Main Catches from Lüsi Fishing Ground during Spring, Summer and Autumn	CHEN Shixuan, YU Wenwen, ZHANG Hu, ZHANG Shuo	(19)
Influence of Different Management Methods on the Sedimentation of Particulate Matter and Sediment in Sea Cucumber Ponds	LI Lezhou, WANG Zufeng, ZHANG Dongsheng, LEI Zhaolin, ZHANG Jinyuan, YANG Gengjie, WANG Yulong, ZHOU Wei	(29)
AFLP Analysis of Genetic Structure and Diversity in Population of <i>Schizothorax kolzovi</i> from the Wujiang River	AN Dandan, DAI Yinggui, ZOU Xijun	(39)
The Analysis of Genetic Diversity of <i>Triplophysa yarkandensis</i> (Day) from Five Geographic Populations in the Tarim River Basin	WANG Jinxiu, REN Daoquan, WANG Xinyue, CHEN Sheng'ao, SONG Yong	(46)
Screening of Genes Related to Muscle Growth under the <i>Myostatin</i> Regulation by RNA-Seq in <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	YAN Yunjun, LU Xia, MENG Xianhong, LUAN Sheng, CHEN Baolong, KONG Jie	(55)
Pattern of Recognition Beaks in <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i> Based on K-Means Dynamic Clustering	ZHENG Xinyu, LIU Bilin, KONG Xianghong, WANG Xuehui	(64)
Effects of Oxygen on the Gill Tissue and Enzyme Activities of Each Tissue in a Hypoxia-Tolerant New Strain F5 of <i>Megalobrama amblycephala</i>	QIAN Chenying, ZHENG Guodong, CHEN Jie, ZOU Shumin	(73)
Adaptive Adjustment of Osmotic Organ Structure of Juvenile Chinese Sturgeon in Seawater Conditions	QIN Shaozong, LENG Xiaoqian, LUO Jiang, DU Hao, LIU Zhigang, QIAO Xinmei, XIONG Wei, WEI Qiwei	(82)
Investigation of the Organ Coefficients of Adult GIFT Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	XU Juanjuan, WANG Zhuoqun, SHU Xiujun, CHENG Bo, REN Yuanyuan, ZHANG Xin, WANG Saisai, HAN Gang, MUYingchun, SONG Yi	(90)
Effects of Morphological Traits on the Body Mass of <i>Leiocassis longirostris</i>	LI Zhe, JING Tingsen, LI Yu, LU Anshuai, ZHOU Jian, LUO Hui, YE Hua	(98)
Effects of Hypoxia and Reoxygenation on Respiratory Metabolism Enzyme and Antioxidant Enzyme Activities in <i>Exopalaemon carinicauda</i>	WANG Pan, SHI Wenjun, WAN Xihe, SHEN Hui, SHA Shibing, LI Hui, WANG Libao, SUN Ruijian, JIANG Ge, WU Xugan	(106)
Effects of Dietary Protein to Energy Ratios on Growth Performance, Feed Utilization and Body Composition of Juvenile Tiger Puffer (<i>Takifugu rubripes</i>)	WANG Jianxue, WEI Yuliang, XU Houguo, SUN Shuguang, LIANG Mengqing	(116)
Effects of Dietary Vitamin C on the Immune, Antioxidant Capacity, and Stress Tolerance of Spotted Seabass (<i>Lateolabrax maculatus</i>) after Acute Cooling	SUN Jingcheng, LI Xiao, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao	(126)
Whole-Genome Sequencing and Comparative Genome Analysis of a Pathogenic <i>Cordyceps confragosa</i> CHL02 Strain Isolated from <i>Perca fluviavilis</i>	ZHANG Yanzen, FU Longwei, SUI Zhihai, WANG Yongxing, LIU Yunguo	(134)
Phylogenetic Analysis of Algal Pests of the Economic Alga <i>Undaria pinnatifida</i> in the Farming Region of Dalian	LI Xiaodong, ZENG Youwei, LENG Xiaofei, ZHANG Mingfu, LI Xinzheng, PANG Shaojun	(145)
Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCB153) on the Physiological Ecology and Ultrastructure of <i>Dicrateria zhanjiangensis</i>	SUN Xiaoyu, WANG Yizhe, LI Yang, XU Xu, ZHOU Wenli, SHAO Peng, GAO Jinwei, DOU Yong, JIA Xuying	(158)
Effects of Different Nutrient Conditions on the Growth of <i>Betaphycus gelatinae</i>	ZENG Jun, TONG Lihao, WU Xiangyu, HUANG Min, TANG Xianming	(168)
Diagnosis of Oplidiopsis Disease in <i>Pyropia yezoensis</i>	HE Lijuan, YANG Huichao, LI Jie, TANG Lei, LIU Cong, MO Zhaolan	(177)
Identification of Salmon Aquatic Products Sold in Qingdao Using DNA Barcoding Technology	ZHAO Xinning, MU Ming, LI Ang, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng	(184)
Comparison of the Taste Compounds in Different Grades of Chinese Mitten Crab (<i>Eriocheir sinensis</i>)	SHAO Yang, YU Dawei, YANG Fang, GAO Pei, XU Yanshun, JIANG Qixing, XIA Wenshui	(192)
Study on the Characteristic Flavor Change of <i>Porphyra yezoensis</i> before and after Roasting	ZHAO Ling, CAO Rong, WANG Lianzhu, LIU Qi, LIU Shengnan	(199)
Preparation and Properties of Sodium Alginate/Enteromorpha Polysaccharide Composite Film	DENG Xiaoxue, CHENG Teng, ZHAO Yun, XU Jiachao, LI Zhaoyong, FU Xiaoting	(208)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200202002

http://www.yykxjz.cn/

解明阳, 陈新军. 基于灰色系统的北太平洋柔鱼渔汛特征分析及旺汛期预测. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 01-08

XIE M Y, CHEN X J. Analysis of the fishing seasons characteristics of *Ommastrephes bartramii* and prediction of the main fishing seasons based on the grey system theory. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 01-08

基于灰色系统的北太平洋柔鱼渔汛 特征分析及旺汛期预测*



解明阳¹ 陈新军^{1,2,3}①

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 上海海洋大学大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 国家远洋渔业工程技术研究中心 农业农村部大洋渔业开发重点实验室 上海 201306)

摘要 柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)是大洋性经济头足类,是我国远洋鱿钓渔船重要的捕捞对象。分析柔鱼渔汛特征并预测旺汛期,有助于柔鱼资源的合理开发与利用。本研究根据 2013—2017 年北太平洋柔鱼渔业生产统计数据,以每日平均渔获量(CPUE_{day})作为资源丰度,利用分位数的方法划分旺汛期;结合灰色波形预测方法,对旺汛期日期序列建立灰色波形预测模型群[GM(1,1)模型],对旺汛期出现的时间进行预测。结果显示,北太平洋柔鱼渔汛时间最早为 5 月 12 日,一直持续到年终;旺汛期为每年的 8—11 月,第 1 旺汛期基本在 8 月出现。GM(1,1)模型的平均相对误差为 6.83%,旺汛期日期序列预测的平均相对误差为 8.19%,验证数据的平均相对误差为 15.82%,表明此模型可预测北太平洋柔鱼的旺汛期。研究结果可为远洋渔业企业的高效率、合理化的科学生产提供技术支撑。

关键词 柔鱼; 渔汛; 旺汛期; 灰色波形预测

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0001-08

柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)为北太平洋海域重要的经济头足类之一(王尧耕等, 2005; 陈新军, 2019a、b),我国自 1993 年开发和利用柔鱼资源以来,年产量稳定在 6~10 万 t 之间,是我国远洋渔业的重要捕捞对象(Chen *et al.*, 2008; 陈新军等, 2019 a、b)。了解北太平洋柔鱼渔汛特征并预测其旺汛期是开展其渔情预报工作的重要部分,有助于远洋渔业企业进行科学生产,节约成本,提高捕捞效率(陈新军等, 2013)。目前,有关学者已在资源量时空分布(唐峰华

等, 2014; 易倩等, 2017)、资源量预测(汪金涛等, 2014; 高雪等, 2017)、资源评估管理(曹杰等, 2010; 刘金立等, 2019)等方面进行了较为全面的研究,但对于渔汛特征的分析、总结及旺汛期预测方面的研究甚少。

灰色系统理论是一门不确定系统理论的学科,其优点在于允许样本数量较少且服从任意分布,这对于缺乏数据的渔业科学来说,有很大的应用与发展前景(陈新军, 2003)。目前,此方法已在渔场时空分布(侯庆联等, 2019)、资源丰度预测(解明阳等, 2018)等

* 国家重点研发计划(2019YFD0901404)、国家自然科学基金面上项目(NSFC41876141)和上海市科技创新行动计划(19DZ1207502)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Plan (2019YFD0901404), NSFC General Program (NSFC41876141), and Science and Technology Innovation Action Plan of Shanghai (19DZ1207502)].
解明阳, E-mail: 772966694@qq.com

① 通讯作者: 陈新军, 教授, E-mail: xjchen@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-02-02, 收修改稿日期: 2020-03-23

方面取得较好的效果。在灰色系统中,灰色波形预测是针对周期性波动序列的一种预测方法,它以GM(1,1)模型群为基础,可对波动幅度大且数据量少的时序进行中长期预测(陈彦晖等,2017)。北太平洋柔鱼为“一年生”的种类(曹杰等,2010),其渔汛以年为周期,年间变化剧烈,运用传统的统计分析方法很难对其渔汛变化进行较好的分析与预测。为此,本研究拟采用2013—2017年渔业生产统计数据,重点分析北太平洋柔鱼渔汛特征,建立渔汛日期序列,利用灰色波形预测模型对柔鱼旺汛期进行预测,为北太平洋渔业生产企业的科学生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 数据来源

渔业生产统计数据来自上海海洋大学鱿钓技术组,时间为2013—2017年,空间范围为 $35^{\circ}\sim 45^{\circ}\text{N}$ 、 $140^{\circ}\sim 179^{\circ}\text{E}$,统计内容包括日期、经度、纬度、日产量和作业渔船数量,空间分辨率为 $1^{\circ}\times 1^{\circ}$ 。以单位捕捞努力量渔获量(catch per unit effort, CPUE)来表征每日的柔鱼资源丰度,公式为:

$$\text{CPUE}_{\text{day}} = \frac{\text{catch}}{\text{effort}}$$

式中,catch为每日的总渔获量,effort为每日捕捞的作业船数,单位为 $t/(\text{船}\cdot\text{d})$ 。

1.2 渔汛时间确定及旺汛期的划分

根据每年统计的 CPUE_{day} ,若连续3d的 CPUE_{day} 均大于0,则定义为渔汛开始(刘凯等,2012)。由于柔鱼为短生命周期种类,每年的产量受海洋气候环境影响且波动较大(余为等,2013),所以,根据每一年当年的 CPUE_{day} 序列情况,计算 CPUE_{day} 序列的四分位数($Q_1\sim Q_3$),取序列的第3分位数 Q_3 (大于75%的 CPUE_{day} 值)定义为高产 CPUE_{day} 值,若高产 CPUE_{day} 值连续出现3d以上,则第1天为旺汛期开始;若之后未连续出现3d以上高产 CPUE_{day} 值,则这3d中的第1天为旺汛期结束(陈芄等,2016)。

1.3 旺汛期预测模型

利用灰色波形预测模型对柔鱼旺汛期进行预测(陈彦晖等,2016)。具体方法如下:

数据的选取:根据旺汛期的划分结果,从渔汛时间中找出旺汛期开始的序号组成旺汛期日期序列。设旺汛期日期序列 $X=(x(1),x(2),\dots,x(n))$,则称序列 X 的 n 段折线图形为 $x_n=x(n)+(t-n)[x(n+1)-x(n)]$,即序列 $X=\{x_n=x(n)+(t-n)[x(n+1)-x(n)]|n=1,2,\dots,m-1\}$ 。

等高线的选取:设 $\sigma_{\max} = \max_{1\leq n\leq m}\{x(n)\}$, $\sigma_{\min} = \min_{1\leq n\leq m}\{x(n)\}$,在 σ_{\max} 与 σ_{\min} 之间选取 $s+1$ 个阈值: $\xi_0, \xi_1, \dots, \xi_s$,使其满足 $\forall \xi \in [\sigma_{\min}, \sigma_{\max}]$,且: $\xi_0 = \sigma_{\min}, \dots, \xi_i = \frac{i}{s}(\sigma_{\max} - \sigma_{\min}) + \sigma_{\min}, \dots, \xi_s = \sigma_{\max}$;则 $X = \xi_i (i=1,2,\dots,s)$ 为折线图 X 的 $s+1$ 条等间隔的等高线。

等高时刻序列的选取:等高线 $X = \xi_i$ 与渔汛旺汛期日期序列的折线图相交,若 X 的第 k 段折线上有等高点,则坐标为 $\left(k + \frac{\xi - x(k)}{x(k+1) - x(k)}, \xi\right)$,设 $q(k) = k + \frac{\xi - x(k)}{x(k+1) - x(k)} (k=1,2,\dots,m)$,则称 $Q_i=(q(1),q(2),\dots,q(m))(k=0,1,\dots,s)$ 为等高时刻序列。

对等高时刻序列建立灰色波形预测模型[Grey Model(1,1),简称GM(1,1)]:对每条等高线上的等高时刻序列 $Q_i=[q(1),q(2),\dots,q(m)] (k=0,1,\dots,s)$ 分别建立GM(1,1)模型,得到预测值。GM(1,1)模型中数字1表示模型为一阶模型, $N=i+1 (i$ 为因子的个数),计算方法见刘思峰等(2014)。

1.4 模型的检验

检验模型的好坏主要包括模型拟合精度与预测精度。GM(1,1)模型中精度检验主要有残差检验、后验差检验和发展系数 a (李燕,2012)。后验差检验按照残差的概率分布进行检验,记原始序列标准差 S_1 :

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n [x^{(0)}(k) - \bar{x}^{(0)}]^2}{n-1}}$$

绝对误差序列标准差 S_2 :

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n [\varepsilon(k) - \bar{\varepsilon}]^2}{n-1}}$$

方差比 C :

$$C = \frac{S_2}{S_1}$$

小误差概率 P :

$$P = p\{|\varepsilon(k) - \bar{\varepsilon}| < 0.6745S_1\}, k=1,2,\dots,n$$

残差和方差比越小,模型的精度越好。发展系数 a 反映主因素与各子因素间的协调程度。 $-a \leq 0.3$ 时,模型用于中长期预测; $0.3 < -a \leq 0.5$ 时,用于短期预测(刘思峰等,2000)。模型精度检验等级见表1(李燕,2012)。

2 结果

2.1 渔汛特征分析

2013—2017 年, 北太平洋柔鱼渔汛最早为 5 月 12 日(2017 年), 最晚为 12 月 31 日(2014—2016 年), 主汛期为 6—11 月(图 1)。单船全汛作业天数范围为 194~224 d, 平均值为 213 d; CPUE_{day} 范围为 0.13~8.05 t/(船·d), 平均值为 1.82 t/(船·d)。各月的 CPUE_{day} 平均值变化趋势总体上一致; 6 月和 7 月 CPUE_{day} 平均值相对较低, 而 8—10 月 CPUE_{day} 平均值则相对较高, 11 月 CPUE_{day} 平均值各个年份有所不同(图 2)。对年间和月间的 CPUE_{day} 平均值进行方差分析, 结果显

示, 年间 CPUE_{day} 值均无显著差异($F=2.540$, $df_1=4$, $df_2=25$, $P>0.05$), 月间 CPUE_{day} 值差异明显($F=3.613$, $df_1=4$, $df_2=25$, $P<0.01$)。

表 1 灰色系统理论模型精度检验
Tab.1 Precision test accuracy of grey model

精度等级 Accuracy level	方差比 C Variance ratio C	小误差概率 P Small error probability P
I 级(好) Class I (Good)	0.35	0.95
II 级(合格) Class II (Passed)	0.50	0.80
III 级(勉强) Class III (Barely)	0.65	0.70
IV 级(不合格) Class IV (Not passed)	0.80	0.60

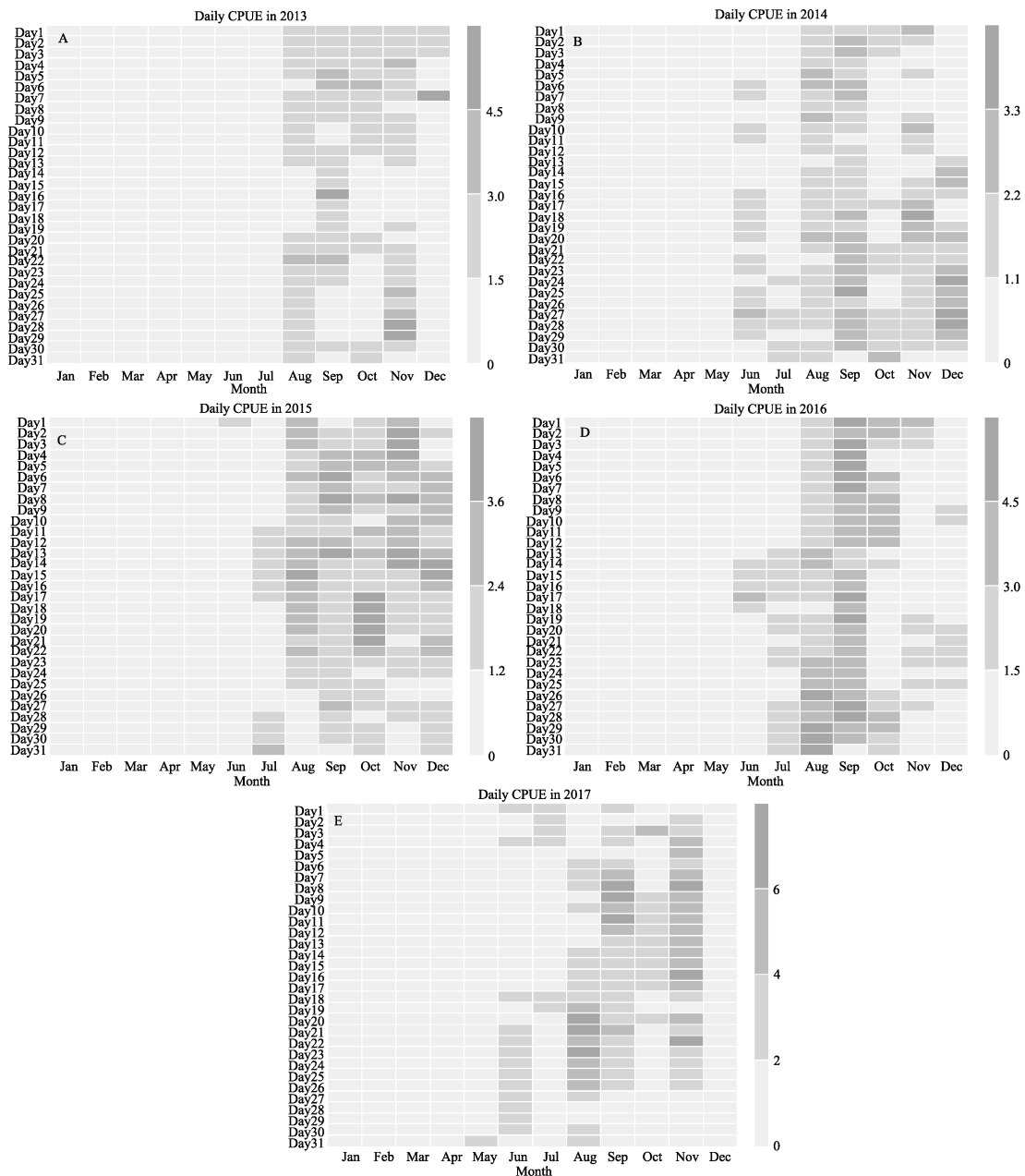


图 1 2013—2017 年北太平洋柔鱼每日单位捕捞努力量渔获量分布状况
Fig.1 CPUE_{day} distribution of *O. bartramii* from 2013 to 2017

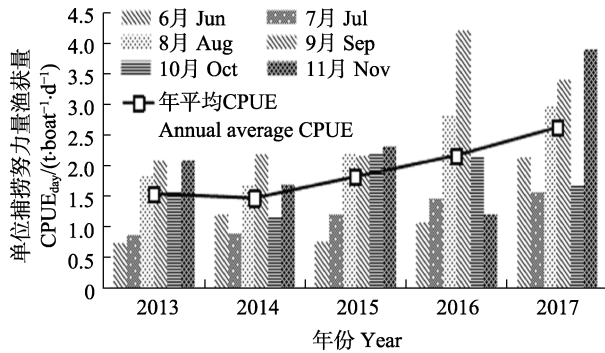


图2 2013—2017年北太平洋柔鱼主汛期各月
CPUE_{day} 平均值分布状况

Fig.2 Monthly average CPUE_{day} distribution of *O. bartramii* in main fishing season from 2013 to 2017

2.2 旺汛期分析

为方便旺汛期划分与预测, 将主汛期按照数字1~183从小到大排列, 组成日期序列, 即数字1(6月1日)、数字2(6月2日)、...、数字183(11月31日)。

根据每年 CPUE_{day} 序列, 2013—2017 年的高产 CPUE_{day} 值分别为 2.07、1.91、2.51、2.86、3.20 t/(船·d)。从各年旺汛期特征来看(表 2), 第 1 汛期均在 8 月出现, 且基本上为 8 月的下旬, 9、10、11 月均有旺汛期出现。各年出现的旺汛期数量除了 2016 年出现 1 个旺汛期(周期持续 51 d)以外, 其他年份均出现至少 4 个旺汛期, 2013 年最多, 出现 7 个旺汛期。各个旺汛期的天数不同, 最少为 3 d (2013 年、2015 年第 1 汛), 最多为 51 d (2016 年第 1 汛), 平均天数为 10 d。各个旺汛期的平均 CPUE_{day} 均在 1.99 t/(船·d) 以上, 最高 CPUE_{day} 为 8.05 t/(船·d) (2017 年第 4 汛)。总体上(除 2017 年), 每年各个旺汛期随着时间的增加, 平均 CPUE_{day} 呈增加的趋势。

2.3 预测模型的建立与检验

根据 2013—2015 年旺汛期的日期序列, 划分了 10 条等高线 $X(X_0 \sim X_9)$ 。由于 GM(1,1) 建模需要至少 4 个数据, 即等高线与折线图的交点至少 4 个, 因此,

表 2 2013—2017 年北太平洋柔鱼旺汛期特征

Tab.2 Features of main fishing season for *O. bartramii* from 2013 to 2017

年份 Year	旺汛期[月-日范围(日期序列)] Main fishing season [month-day range (date sequence)]	天数 Days	平均 CPUE _{day} Average CPUE _{day}	最高 CPUE _{day} Highest CPUE _{day}
2013	第 1 汛 08-22—08-24 (83~85)	3	2.57	3.04
	第 2 汛 09-03—09-08 (95~100)	6	2.58	3.13
	第 3 汛 09-12—09-17 (104~109)	6	2.76	4.61
	第 4 汛 09-21—09-24 (113~116)	4	2.69	3.57
	第 5 汛 10-04—10-12 (126~134)	9	2.60	3.41
	第 6 汛 11-03—11-06 (156~159)	4	2.61	3.21
	第 7 汛 11-25—11-30 (178~183)	6	3.65	5.07
2014	第 1 汛 08-04—08-10 (65~71)	7	1.99	2.31
	第 2 汛 08-17—08-20 (78~81)	4	2.14	2.63
	第 3 汛 09-01—09-08 (93~100)	8	2.23	2.49
	第 4 汛 09-16—10-02 (108~124)	17	2.43	3.54
	第 5 汛 11-17—11-21 (170~174)	5	2.78	3.75
2015	第 1 汛 08-01—08-03 (62~64)	3	2.89	3.46
	第 2 汛 08-12—08-20 (73~81)	9	3.11	3.71
	第 3 汛 09-04—09-13 (96~105)	10	3.11	4.29
	第 4 汛 10-17—10-22 (139~145)	6	3.59	3.92
	第 5 汛 11-01—11-14 (154~168)	14	3.21	4.06
2016	第 1 汛 08-23—10-12 (84~134)	51	4.01	5.84
2017	第 1 汛 08-19—08-26 (80~87)	8	5.23	6.65
	第 2 汛 09-06—09-15 (98~107)	10	5.17	6.34
	第 3 汛 09-19—09-22 (111~114)	4	3.87	4.66
	第 4 汛 11-02—11-25 (155~178)	24	4.56	8.05

表 3 不同等高线 GM(1,1)模型拟合结果及相关参数
Tab.3 GM (1,1) model fitting results and related parameters of different contour lines

等高线 X Contour lines X	GM(1,1)模型拟合等高序列结果 Fitting contour sequence results by GM(1,1) model				平均相对误差 Average relative error	方差比 C Variance ratio C	发展系数 a Development coefficient a	小误差概率 P Small error probability P	
X ₂ =87.78	等高时刻序列	1.40	7.80	9.65	12.76	1.74	0.04	-0.25	1.00
	GM(1,1)模型	1.40	7.62	9.78	12.57				
X ₃ =100.67	等高时刻序列	2.63	7.68	10.51	12.64	2.72	0.08	-0.24	1.00
	GM(1,1)模型	2.63	7.91	10.03	12.72				
X ₄ =113.56	等高时刻序列	4.04	7.57	11.09	12.52	5.77	0.19	-0.23	1.00
	GM(1,1)模型	4.04	8.09	10.17	12.80				
X ₅ =126.44	等高时刻序列	5.01	7.46	11.30	12.40	7.21	0.26	-0.23	1.00
	GM(1,1)模型	5.01	8.11	10.18	12.77				
X ₆ =139.33	等高时刻序列	5.44	7.34	11.51	12.28	8.66	0.33	-0.22	1.00
	GM(1,1)模型	5.44	8.13	10.18	12.74				
X ₇ =152.22	等高时刻序列	5.87	7.23	11.71	12.16	10.12	0.39	-0.22	1.00
	GM(1,1)模型	5.87	8.15	10.18	12.71				
X ₈ =165.11	等高时刻序列	6.41	7.11	11.92	12.05	11.58	0.47	-0.22	1.00
	GM(1,1)模型	6.41	8.17	10.18	12.68				

表 4 旺汛期 GM(1,1)预测模型的相对误差
Tab.4 Relative errors of the GM (1,1) prediction model in main fishing season

旺汛期 Main fishing season	日期序列真实值 Actual value of date sequence	日期序列预测值 Fitted value of date sequence	相对误差 Relative error
2014 年第 1 汛 1st fishing season in 2014	65.00	71.07	9.34
2014 年第 2 汛 2nd fishing season in 2014	78.00	77.90	0.12
2014 年第 3 汛 3rd fishing season in 2014	93.00	97.54	4.88
2014 年第 4 汛 4th fishing season in 2014	108.00	160.93	49.01
2014 年第 5 汛 5th fishing season in 2014	170.00	170.51	0.30
2015 年第 2 汛 2nd fishing season in 2015	93.00	98.75	6.18
2015 年第 3 汛 3rd fishing season in 2015	108.00	135.50	25.46

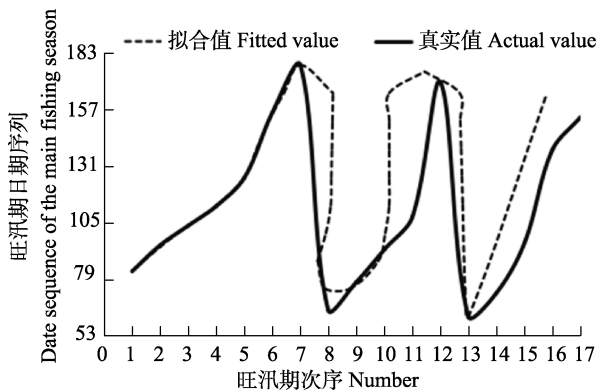


图 3 北太平洋柔鱼渔汛预测模型日期序列拟合值与真实值的比较

Fig.3 Comparison of fitted and actual values of date sequence based on main fishing season forecasting model of *O. bartramii*

只对符合以上条件的 7 组等高序列(X₂~X₈)进行 GM(1,1)建模。从模型的拟合结果来看(表 3), 平均相对误差在 11.58%以内, 等高线 X₂ 的 GM(1,1)模型拟合效果最好, 为 1.74%。从模型的相关参数来看, 小误差概率 P 均为 1.00 (>0.95); 等高线 X₇ 和等高线 X₈ 模型的方差比 C<0.50, 其他模型的方差比均符合 C<0.35, 模型精度等级为 I 级和 II 级。从模型的发展系数 a 来看, 所有模型均可用于中长期预测 (-a≤0.3)。

从旺汛期 GM(1,1)预测模型结果来看(图 3), 旺汛期拟合效果较好, 除 2014 年第 4 汛的相对误差较大外(相对误差为 49.01%), 其他旺汛期拟合的相对误差在 9.34%以内, 平均相对误差为 12.73%, 2015 年旺汛期验证的平均相对误差为 15.82% (表 4)。

3 分析与讨论

柔鱼是暖水性种类,其渔汛变化与季节性洄游有关(陈新军等,2001)。冬春生的柔鱼早期幼体生活在 35°N 以南的黑潮逆流海区,一直生长到稚柔鱼,之后稚柔鱼向北洄游至黑潮锋面,5—8月末,成熟的柔鱼向北或东北洄游进入 $35^{\circ}\sim 40^{\circ}\text{N}$ 黑潮和亲潮交汇区。8—10月性成熟和性未成熟的柔鱼主要分布在 $40^{\circ}\sim 46^{\circ}\text{N}$ 亲潮前锋区及其周围海域,它在北部海区滞留的时间比过去发育阶段的任何时期都要长(马金等,2001),因此,旺汛期为8—11月,且第1汛期通常在8月出现。而渔汛时间的迟早直接受海洋环境因子的影响特别是表温海流等因素(陈新军,2016)。邵全琴等(2005)和Chen等(2012)研究表明,黑潮和亲潮的强弱变化对柔鱼的渔汛有影响。黑潮势力较强的年份,海表温度(SST)上升显著,柔鱼幼体会随着黑潮较早来到索饵场,导致渔汛提前,亲潮势力较强的年份则相反。此外,厄尔尼诺和拉尼娜事件也会影响柔鱼栖息地环境因子,进而影响渔汛的早晚(余为等,2015)。由于拉尼娜事件会使柔鱼产卵场和育肥场海表温度上升较高,有利于柔鱼资源补充;当厄尔尼诺事件发生时,温度和叶绿素急剧下降,不利于柔鱼生长。从旺汛期分析结果来看(表2),2016年旺汛期第1汛的时间要比其他年份晚且结束提前,这可能是由于2015年发生的强厄尔尼诺事件导致产卵场的环境变化不利于仔稚鱼发育,使得柔鱼到达索饵场的时间推迟。而其他年份中,2014、2015年旺汛期第1汛的时间较早,2013、2017年较晚,是因为分别受到弱厄尔尼诺和弱拉尼娜事件的影响,但影响不明显。另外,渔汛时间变化直接由海洋渔业生产安排所决定,极端气候事件会影响渔捞作业的效率,降低单船的捕捞渔获量,从而导致旺汛期时间缩短。

本研究运用灰色波形预测方法,通过建立GM(1,1)模型,对北太平洋柔鱼旺汛期进行了预测并得到了较好的结果。从拟合值与真实值的关系来看(图3),CPUE的变化趋势基本一致,从预测模型的参数来看模型,精度较好(表3),可用作中长期预报。但此模型仍然存在一些不足,从2015年预测结果(表4)来看,除了第1汛为建模数据的已知样本外,只预测出了额外2个旺汛期,这与2015年真实的情况比较,少了2个旺汛期,原因是基于广义等高线建立的灰色波形模型只能对已出现的波形最值进行波动趋势的预测,2015年第2汛由于出现时间较早,所处的阈值等高线序列数据不足4个,所以无法预测出来。同时,在预测结果中出现了误差异常的现象(表4),如

2014年第4汛相对误差非常大,为49.01%,原因是2014年第4汛与第5汛的预测结果接近重合,导致第4汛的真实结果并未展现出来,最终2014年的旺汛期只预测出第1、2、3、5汛4个汛期,2015年第3汛预测结果误差较大的原因同上(2015年第3汛预测结果与第4汛接近重合),故此模型只能较好地预测出旺汛期开始的日期序列,但无法准确预测出汛期的个数和次序,从而导致误差异常值的出现。此外,由于旺汛期时间序号的增大,后面月份预测的相对误差虽然结果较好,但数值上的误差较小并不代表着真实旺汛期相差天数较少,这是因为计算残差时分母基数的增大导致最终结果变小。

本研究对西北太平洋柔鱼渔汛预报进行尝试,取得了较好的预报效果,这一研究方法也可作为渔情预报学的重要补充。但是,本研究中只考虑了渔业生产数据的变化,未加入影响其资源丰度变化的气候与海洋环境因子,建议在今后的渔汛预测研究中,有针对性地加入对资源渔场有显著影响的气候变化与海洋环境因子,尝试采用人工智能等方法建立更为全面的渔汛预报模型。

参 考 文 献

- CAO J, CHEN X J, LIU B L, *et al.* Review on the relationship between stock recruitment of squid and oceanographic environment. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(2): 232–239 [曹杰, 陈新军, 刘必林, 等. 鱿鱼类资源量变化与海洋环境关系的研究进展. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 232–239]
- CAO J, CHEN X J, TIAN S Q, *et al.* Assessment of western winter-spring stock of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean based on cohort analysis. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2010, 40(3): 37–42 [曹杰, 陈新军, 田思泉, 等. 基于世代分析法的西北太平洋柔鱼冬春生西部群体资源评估. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(3): 37–42]
- CHEN P, WANG J T, CHEN X J. Analysis on the fishing season and fishing ground of anchoveta in the coastal waters of Peru. *Marine Fisheries*, 2016, 38(5): 449–458 [陈芑, 汪金涛, 陈新军. 秘鲁沿岸秘鲁鳀渔场及渔汛分析. 海洋渔业, 2016, 38(5): 449–458]
- CHEN X J, CAO J, CHEN Y, *et al.* Effect of the Kuroshio on the spatial distribution of the red flying squid *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific Ocean. *Bulletin of Marine Science*, 2012, 88(1): 63–71
- CHEN X J, CHEN Y, TIAN S Q, *et al.* An assessment of the west winter-spring cohort of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 2008, 92(2/3): 221–230
- CHEN X J, GAO F, GUAN W J, *et al.* Review of fishery forecasting technology and its models. *Journal of Fisheries*

- of China, 2013, 37(8): 1270–1280 [陈新军, 高峰, 官文江, 等. 渔情预报技术及模型研究进展. 水产学报, 2013, 37(8): 1270–1280]
- CHEN X J, QIAN W G, LIU B L, *et al.* Productive survey and fishery for major pelagic economic squid in the world. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019a, 28(3): 344–356 [陈新军, 钱卫国, 刘必林, 等. 主要经济大洋性鱿鱼资源渔场生产性调查与渔业概况. 上海海洋大学学报, 2019a, 28(3): 344–356]
- CHEN X J, TIAN S Q. Analysis on fishing ground of *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific Ocean. *Fishery Modernization*, 2001(3): 3–6 [陈新军, 田思泉. 西北太平洋海域柔鱼渔场分析探讨. 渔业现代化, 2001(3): 3–6]
- CHEN X J. Development status of world cephalopod fisheries and suggestions for squid jigging fishery in China. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019b, 28(3): 321–330 [陈新军. 世界头足类资源开发现状及我国远洋鱿钓渔业发展对策. 上海海洋大学学报, 2019b, 28(3): 321–330]
- CHEN X J. *Fishery forecast science*. Beijing: China Ocean Press, 2016 [陈新军. 渔情预报学. 北京: 海洋出版社, 2016]
- CHEN X J. *Grey system theory in fisheries science*. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 1–32 [陈新军. 灰色系统理论在渔业科学中的应用. 北京: 中国农业出版社, 2003: 1–32]
- CHEN Y H, GAN A P. Improvement and application of grey wave forecasting model. *Statistics and Decision*, 2016(6): 75–78 [陈彦晖, 甘爱平. 灰色波形预测模型的改进及应用. 统计与决策, 2016(6): 75–78]
- CHEN Y H, LIU B. Grey wave forecasting model with generalized contour lines and its application. *Chinese Journal of Management Science*, 2017, 25(8): 134–139 [陈彦晖, 刘斌. 基于广义等高线的灰色波形预测模型及其应用. 中国管理科学, 2017, 25(8): 134–139]
- GAO X, CHEN X J, YU W. Forecasting model of the abundance index of winter-spring cohort of Neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean based on grey system theory. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017, 39(6): 55–61 [高雪, 陈新军, 余为. 基于灰色系统的西北太平洋柔鱼冬春生群资源丰度预测模型. 海洋学报, 2017, 39(6): 55–61]
- HOU Q L, CHEN X J, WANG J T. Study on spatio-temporal distribution of *Illex argentinus* in southwest Atlantic Ocean. *Marine Sciences*, 2019, 43(5): 103–109 [侯庆联, 陈新军, 汪金涛. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼资源时空分布研究. 海洋科学, 2019, 43(5): 103–109]
- LI Y. Research and application of the grey forecast model. Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2012 [李燕. 灰色预测模型的研究及其应用. 浙江理工大学硕士研究生学位论文, 2012]
- LIU J L, CHEN X J. Bibliometrics research of document on the theme of oceanic squid jigging fishery in the world. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(3): 331–343 [刘金立, 陈新军. 世界大洋性鱿钓渔业研究评述. 上海海洋大学学报, 2019, 28(3): 331–343]
- LIU K, DUAN J R, XU D P, *et al.* Present situation of *Coilia nasus* population features and yield in Yangtze River estuary waters in fishing season. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(12): 3138–3143 [刘凯, 段金荣, 徐东坡, 等. 长江口刀鲚渔汛特征及捕捞量现状. 生态学杂志, 2012, 31(12): 3138–3143]
- LIU S F, DENG J L. Available range of GM(1,1) model. *Systems Engineering-Theory and Practice*, 2000(5): 121–124 [刘思峰, 邓聚龙. GM(1,1)模型的适用范围. 系统工程理论与实践, 2000(5): 121–124]
- LIU S F, YANG Y J, WU L F, *et al.* *Grey system theory and its application*. Beijing: China Science Press, 2014 [刘思峰, 杨英杰, 吴利丰, 等. 灰色系统理论及其应用. 北京: 科学出版社, 2014]
- MA J, CHEN X J, LIU B L, *et al.* Review of fisheries biology of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific Ocean. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(4): 563–570 [马金, 陈新军, 刘必林, 等. 北太平洋柔鱼渔业生物学研究进展. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 563–570]
- NISHIKAWA H, TOYODA T, MASUDA S, *et al.* Wind-induced stock variation of the neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) winter-spring cohort in the subtropical North Pacific Ocean. *Fisheries Oceanography*, 2015, 24(3): 229–241
- SHAO Q Q, MA W W, CHEN Z Q, *et al.* Relationship between Kuroshio meander pattern and *Ommastrephes bartramii* CPUE in Northwest Pacific Ocean. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(2): 111–122 [邵全琴, 马巍巍, 陈卓奇, 等. 西北太平洋黑潮路径变化与柔鱼CPUE的关系研究. 海洋与湖沼, 2005, 36(2): 111–122]
- TANG F H, JIN S F, ZHANG S M, *et al.* Study for marine environmental elements on spatio-temporal distribution of neon flying squid in the north Pacific fishing ground. *China Environmental Science*, 2014, 34(8): 2093–2100 [唐峰华, 靳少非, 张胜茂, 等. 北太平洋柔鱼渔场时空分布与海洋环境要素的研究. 中国环境科学, 2014, 34(8): 2093–2100]
- WANG J T, CHEN X J, LEI L, *et al.* Comparisons between two forecasting models of fishing ground based on frequency statistics and neural network for *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific Ocean. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(3): 82–87 [汪金涛, 陈新军, 雷林, 等. 基于频度统计和神经网络的北太平洋柔鱼渔场预报模型比较. 广东海洋大学学报, 2014, 34(3): 82–87]
- WANG Y G, CHEN X J. *Commercial oceanic ommastrephid squid of the world and its fishery*. Beijing: China Ocean Press, 2005: 152–153 [王尧耕, 陈新军. 世界大洋性经济柔鱼类资源及其渔业. 北京: 海洋出版社, 2005: 152–153]
- XIE M Y, CHEN X J, WANG J T. Study on the change of the abundance index of winter-spring cohort of Japanese flying squid (*Todarodes pacificus*) in the Northwest Pacific Ocean based on grey system theory. *Marine Fisheries*, 2018, 40(6): 641–648 [解明阳, 陈新军, 汪金涛. 基于灰色系统的太平洋褶柔鱼冬春生群资源丰度变化研究. 海洋渔业, 2018, 40(6): 641–648]
- YI Q, YU W, CHEN X J. Habitat suitability variations of *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific. *Marine*

- Fisheries, 2019, 41(3): 257–265 [易倩, 余为, 陈新军. 西北太平洋柔鱼栖息地适宜性变动研究. 海洋渔业, 2019, 41(3): 257–265]
- YU W, CHEN X J, YI Q. Review on the early life history of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(5): 755–762 [余为, 陈新军, 易倩, 等. 北太平洋柔鱼早期生活史研究进展. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 755–762]
- YU W, CHEN X J. Analysis of environmental conditions and their influence on the abundance of neon flying squid in the Northwest Pacific Ocean. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(15): 5032–5039 [余为, 陈新军. 西北太平洋柔鱼栖息地环境因子分析及其对资源丰度的影响. 生态学报, 2015, 35(15): 5032–5039]

(编辑 冯小花)

Analysis of the Fishing Seasons Characteristics of *Ommastrephes bartramii* and Prediction of the Main Fishing Seasons Based on the Grey System Theory

XIE Mingyang¹, CHEN Xinjun^{1,2,3}①

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education; National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries; Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract *Ommastrephes bartramii*, a neon flying squid, is an economically important oceanic cephalopod, which is widely distributed in the North Pacific Ocean. In China, it is one of the most important fishing targets of distant-water squid jigging vessels. Because of its short life cycle, the fishing seasons and its main fishing seasons have obvious year difference. Therefore, analyzing the characteristics of the *O. bartramii* fishing season and predicting the main fishing season are helpful for the rational development and sustainable harvest of *O. bartramii*. We analyzed fishery data for neon flying squid from China squid jigging fisheries during 2013 to 2017. The daily catch per fishing effort (CPUE_{day}) was used to provide the abundance index and was considered as an indicator for judging the division of main fishing seasons. The quantile method was used to identify the main fishing seasons. And the grey wave forecasting method is also used to establish the grey model group [GM (1,1) model] based on the date series of the actual main fishing seasons. The results showed that the earliest catch of neon flying squid is May 12 with catches lasting until the end of the year. The primary period of the fishing season is from August to November each year. The first main fishing peak occurs in August. The average relative error of the grey wave forecasting GM (1,1) model group is 6.83%, the average relative error of the date series forecast during the main fishing season is 8.19%, and the average relative error of the validation data is 15.82%. It is concluded that this grey model can be used to predict the main fishing season for neon flying squid in the North Pacific Ocean. The findings of this study not only provide technical support for efficient and rational capture of distant-water fishery enterprises, but also provide a useful tool for prediction of the main fishing seasons for marine capture fisheries.

Key words *Ommastrephes bartramii*; Fishing seasons; Main fishing season; Grey wave forecasting

① Corresponding author: CHEN Xinjun, E-mail: xjchen@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200221002

http://www.yykxjz.cn/

于翔, 许莉莉, 刘强, 黄伟, 曹亮, 窦硕增. 象山湾常见海洋生物体内微塑料的丰度、形态和成分组成研究. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 09–18

YU X, XU L L, LIU Q, HUANG W, CAO L, DOU S Z. Abundance, shape, and chemical composition of microplastics within ten common marine species in Xiangshan Bay. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 09–18

象山湾常见海洋生物体内微塑料的 丰度、形态和成分组成研究*



于翔^{1,3} 许莉莉^{1,3} 刘强² 黄伟² 曹亮¹ 窦硕增^{1,3}①

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室 山东 青岛 266071;

2. 自然资源部第二海洋研究所 海洋生态系统动力学重点实验室 浙江 杭州 310012;

3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 海洋微塑料污染已成为全球性环境问题,生物体内微塑料污染水平是评估其生物效应的基础。本研究以象山湾为例,研究了 10 种常见海洋生物(贝类、头足类、甲壳类和鱼类)的消化道、鳃和肌肉等组织内微塑料污染状况。结果显示,微塑料广泛存在于各种生物的消化道和鳃等组织内,在 61.0%的生物个体内共检出 131 个微塑料,平均丰度为(1.3±1.5)个/个体;其化学成分包括人造丝(RY; 74.0%)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET; 14.5%)、聚丙烯(PP; 3.8%)和聚酰胺(PA; 3.1%)等 9 种类型。检出纤维状、碎片状和颗粒状 3 种形状的微塑料,分别占 95.4%、3.1%和 1.5%;所有检测物种中均出现人造丝和纤维状微塑料。微塑料粒径在 110~4796 μm 之间,平均为(1246±1119) μm,以 ≤ 1000 μm 的微塑料占比最高(55.2%)。养殖设施产生的典型泡沫状微塑料或聚乙烯(PE)、聚丙烯和聚苯乙烯(PS)塑料类型在生物体内出现频率和丰度较少。研究结果可为深入认识近海生物体内微塑料污染特征及其生物效应提供科学依据。

关键词 微塑料; 粒径、形状和化学成分; 海洋生物; 象山湾

中图分类号 P76 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0009-10

微塑料通常指粒径小于 5 mm 的塑料微粒,广泛存在于从近海到大洋、表层海水到沉积物的海洋环境中(Thompson *et al*, 2004; Moore, 2008; Bessa *et al*, 2018)。据报道,目前约有 $1.5 \times 10^9 \sim 5.1 \times 10^9$ 个塑料颗粒漂浮在海洋表面,总重达 2.4×10^5 t,其中,微塑料占比高达 90%以上(Eriksen *et al*, 2014; van Sebille *et al*, 2015)。按形成途径可将微塑料分为初生微塑料和次生微塑料(夏斌等, 2019)。初生微塑料是指工业

生产之初就被制成微米级的小塑料微粒,如工业磨料中添加的塑料微珠等;次生微塑料则指大型塑料碎片在环境中经物理、化学和生物过程分裂或降解而形成的塑料微粒(Cooper *et al*, 2010; 李道季, 2019)。这些塑料微粒可通过风、洋流和降水等过程进行远距离迁移,扩散到全球海洋的各个区域(Thiel *et al*, 2003)。

微塑料由于与一些海洋生物的饵料(如浮游生物)粒径大小相似,很容易通过被摄取进入生物体内,进

* 国家自然科学基金委员会“创新研究群体科学基金”(40821004; 41121064)资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China under the Programs Science Fund for Creative Research Groups (40821004; 41121064)].

于翔, E-mail: yuxiang17@mails.ucas.ac.cn

① 通讯作者: 窦硕增, 研究员, E-mail: szdou@qdio.ac.cn

收稿日期: 2020-02-21, 收修改稿日期: 2020-03-27

而对海洋生物的生理活动产生影响(武芳竹等, 2019; Sun *et al*, 2019; Zhu *et al*, 2019)。进入生物体内的微塑料会直接损伤、堵塞消化道, 造成生物的摄食效率降低、能量匮乏, 生长迟缓等问题, 也会通过其吸附的重金属和持久性有机污染物(POPs)加重对生物的毒性作用, 甚至导致生物个体死亡(Derraik *et al*, 2002; 孙晓霞等, 2016; 刘强等, 2017; 夏斌等, 2019)。科学合理评估海洋生物体内微塑料的污染特征并了解其影响因素是正确认识微塑料生态风险的基础。研究发现, 环境中微塑料的污染水平与海洋生物的生活方式、习性等会对海洋生物体内微塑料丰度产生影响。在珠江口, 牡蛎体内微塑料丰度与其生活水环境中微塑料丰度显著正相关(Li *et al*, 2018); 在矛尾海, 底栖鱼类体内微塑料丰度显著高于中上层鱼类(Zhu *et al*, 2018)。此外, 目前对鱼类摄入微塑料的研究大多集中于胃和肠道, 但在鱼类鳃丝中同样发现了微塑料的留存(Jabeen *et al*, 2017; Huang *et al*, 2019)。

象山湾位于浙江省东部沿海, 是众多渔业生物的产卵场、育幼场和重要的海水养殖区。受长期的渔业生产和其他人类活动影响, 该水域的微塑料污染问题比较明显(付翔等, 2012; 刘永超等, 2016; Chen *et al*, 2018)。研究发现, 微塑料在该水域的表层海水和表层沉积物中的平均丰度分别达到 9 个/m³ 和 74 个/kg, 在我国近岸水域处于较高水平(Chen *et al*, 2018; Wu

et al, 2019)。相对于海水和沉积物中微塑料的研究, 目前对该海域海洋生物中微塑料的研究较少。本文研究了象山湾水域 10 种常见海洋生物体内微塑料的种类、数量、粒径和成分组成等问题, 以期科学认识该水域微塑料在海洋生物体内的分布状况和累积特征、评估海湾生态系统健康和水产品生态风险提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

样品采集于 2019 年 5 月象山湾渔业资源与环境调查航次, 用底拖网采集到 8 种生物, 包括斑鰾(*Konosirus punctatus*)、鲻鱼(*Mugil cephalus*)、短棘银鲈(*Gerres lucidus*)和斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)等 4 种鱼类, 鞭腕虾(*Lysmata vittata*) 1 种长尾类, 日本螻(*Charybdis japonica*) 1 种短尾类, 以及短蛸(*Octopus ocellatus*) 1 种头足类。另外, 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)取自该水域的养殖网箱。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)和密鳞牡蛎(*Ostrea denselamellosa*) 2 种贝类采自贝类底播区(图 1)。生物样本基本信息见表 1。用锡箔纸将样品包裹置于密封袋中后存放于低温冰箱冷冻保存, 用于实验室内微塑料的提取、计数测量、镜检和化学成分分析。

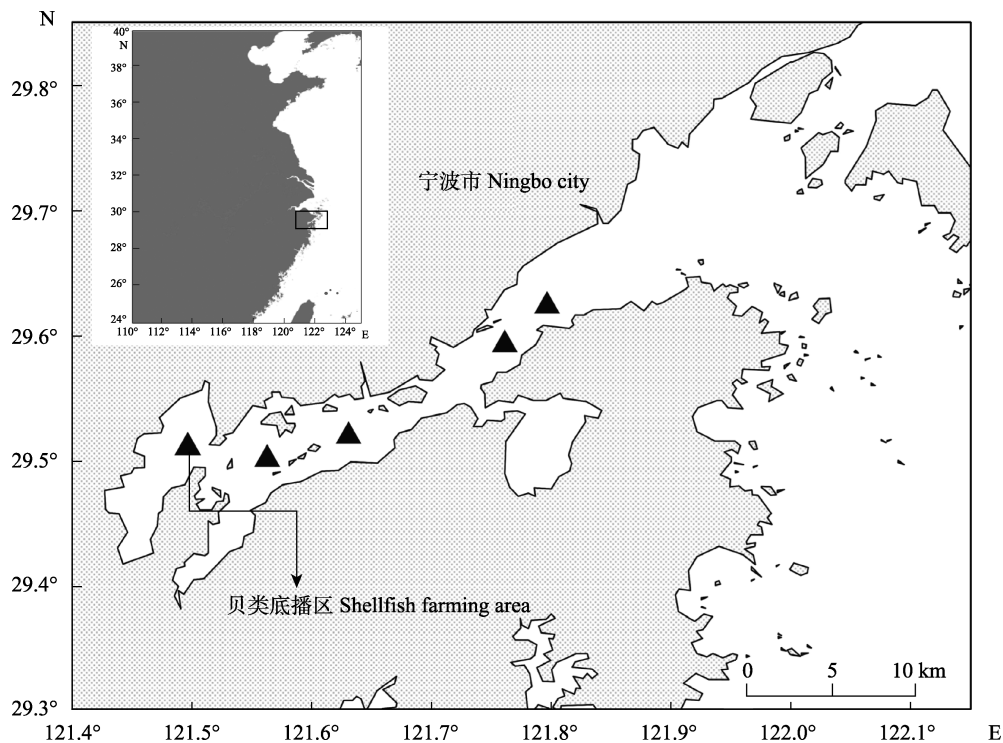


图 1 生物样品采样站位

Fig.1 Sampling sites of the biological samples in Xiangshan Bay

表 1 象山湾 10 种生物样本及其体内组织中检出的微塑料基本信息
Tab.1 Basic information of the biological specimen (10 species) collected from Xiangshan Bay and the microplastics identified in the tissues

物种 Species	样本数 No. of samples	长度 Length /cm*	体重 Body weight/g	微塑料个体数 Number of microplastics /ind.					微塑料粒径 Particle size / μm		检出率 Detective rate /%**
				肌肉 Muscle	鳃 Gill	消化道 Gastrointestinal tract	总数 Total	范围 Range	平均 Average	范围 Range	
斑鱚 <i>Konosirus punctatus</i>	10	24.8±2.6	74.2±4.5	0	9	12	21	0~4	1213±1106	110~4715	90.0
大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	10	25.9±0.7	329.6±21.1	0	8	20	28	0~5	1291±1113	223~4796	90.0
鲮鱼 <i>Mugil cephalus</i>	5	12.5±0.5	68.3±7.2	0	1	7	8	0~3	1419±1273	189~4418	80.0
短棘银鲈 <i>Gerres lucidus</i>	10	10.4±0.6	41.5±8.0	0	1	1	2	0~1	1074±609	465~1683	20.0
斑尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius ommaturus</i>	10	12.1±0.7	23.2±3.8	0	2	3	5	0~2	953±772	190~2274	30.0
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	15	6.0±0.3	9.5±1.9				27	0~5	1273±1400	185~4759	80.0
密鳞牡蛎 <i>Ostrea denselamellosa</i>	15	5.5±0.7	5.6±1.2				25	0~5	1383±846	224~3448	66.7
鞭腕虾 <i>Lysmata vittata</i>	10	3.8±0.2	0.7±0.1				3	0~1	626±552	150~1977	30.0
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	10	6.3±0.7	28.8±3.1				18	0~6	1358±1262	105~4119	80.0
短蛸 <i>Octopus ocellatus</i>	10	6.1±0.7	55.2±17.0				4	0~1	1487±829	357~2673	40.0

* 鱼类和虾类, 体长; 头足类, 胴长; 蟹类, 头胸甲长; 贝类, 壳长

* Fish and shrimp, body length; Siphonopods, mantle length; Crab, carapace length; Shellfish, shell length

** 体内检测出微塑料的个体数占检测总样本数的百分比

** The number of microplastics detected in the organism as a percentage of the total samples tested

1.2 组织内微塑料的分离和提取

生物样品在室温下解冻、洗净、沥干后进行生物学测量。鱼类和虾类测量体长与体重, 头足类测量胴长与体重, 蟹类测量头胸甲长、头胸甲宽与体重, 贝类测量壳长、壳高、壳宽及带壳湿重。长度、体重分别精确到 0.1 cm、0.1 g。

解剖生物样品, 取出个体软组织(鱼类取鳃、肠胃和背部肌肉, 虾类、贝类去壳后取全部软组织, 蟹类取头胸部软组织, 头足类取头部组织及消化道)进行消解。生物组织消解参照 Bessa 等(2018)方法, 将样品置于 500 mL 烧杯中, 加入 200 mL 10% KOH 溶液, 用锡箔纸将烧杯密封, 放置于 60℃ 烘箱中 48 h, 直至生物组织消解完全。消解液经玻璃纤维膜(GF/F, 孔径 0.7 μm ; 直径 47 mm)过滤, 用去离子水冲洗过

滤装置内壁 3 次, 使样品全部转移到滤膜上。取下滤膜后, 置于洁净的玻璃培养皿中, 贴好标签并置于 60℃ 烘箱中烘干。

1.3 微塑料镜检与化学成分鉴定

在体式显微镜(SteREO Discovery V8 Zeiss, Carl Zeiss Microimaging GmbH, 德国)下鉴别、提取和计数样品中的微塑料个体并拍照(OPLINIC C33, 美国), 测量微塑料个体的粒径(ZEN Lite, Carl Zeiss Microimaging GmbH, 德国)。参照 Hidalgo-Ruz 等(2012)的方法, 将检测到的微塑料分为纤维、碎片和颗粒 3 种形状, 其中, 纤维状为细长的丝状, 不包括较粗的渔网、渔绳等线状微塑料; 碎片状为不规则的扁平状微塑料; 颗粒状为不规则的小塑料颗粒。利用傅里叶变换显微红外光谱仪(μ -FTIR)(Nicolet iN10, Thermo Fisher Scientific,

美国)对镜检挑出的疑似微塑料个体进行化学成分分析。在 $(50 \times 50) \mu\text{m} \sim (150 \times 150) \mu\text{m}$ 光圈、 8 cm^{-1} 分辨率和液氮冷却透射模式下对微塑料个体扫描 64 次, 在 $4000 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内进行测试分析和记录光谱。将所获取的光谱与有机聚合物谱库进行比对, 验证聚合物类型(匹配度大于 70% 则认为是该类型)。

1.4 质量控制

样品前处理和测试分析过程中均设置 3 组空白对照, 以检验实验过程中的微塑料污染状况。经检测, 空白对照组中均未发现微塑料留存。PE 标准品(国家海洋环境监测中心)回收率实验结果显示回收率为 95.3%。为保证结果的准确性, 在整个取样和分析过程中均采取了防污染措施。例如, 实验前所有实验用品均用过滤后的去离子水润洗 3 次, 实验过程中所有溶液在使用前均经玻璃纤维滤膜(GF/F, 孔径 $0.7 \mu\text{m}$; 直径 47 mm) 过滤, 所有开口容器均用锡箔纸覆盖, 实验器皿均为非塑料物品等。样品测试分析时, 对体式显微镜、傅里叶变换显微红外光谱仪等实验仪器定期校准以保证设备的准确性。

1.5 数据分析

数据用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。利用 Kruskal-Wallis 方法检验不同生物物种或类群摄入的微塑料的丰度间差异(R 3.5.3 软件), 对存在显著差异的组间进行多重比较检验(Dunn test), 差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 生物组织内微塑料的丰度

所有物种体内均有微塑料出现, 但不同物种间的微塑料丰度和检出率存在差异(表 1 和图 2)。就生物组织而言, 在鱼类消化道中检测出了微塑料, 但在肌肉中未发现微塑料留存。在所有生物样本中共检出 131 个微塑料, 生物个体内微塑料的平均丰度为 (1.3 ± 1.5) 个。生物个体内微塑料的平均丰度在物种间存在显著差异(Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$), 大黄鱼 $[(2.8 \pm 1.5)$ 个]和斑鲹 $[(2.1 \pm 1.1)$ 个]体内的平均丰度显著高于斑尾刺虾虎鱼 $[(0.5 \pm 0.8)$ 个]、短蛸 $[(0.4 \pm 0.5)$ 个]、鞭腕虾 $[(0.3 \pm 0.5)$ 个]和短棘银鲈 $[(0.2 \pm 0.4)$ 个]体内的平均丰度(图 2A)(Dunn test, $P < 0.05$)。

就生物类群而言, 生物个体内微塑料的平均丰度在 (0.3 ± 0.5) 个(长尾类)至 (1.8 ± 1.7) 个(短尾类)之间, 但生物类群间的差异不显著(Kruskal-Wallis 检验, $P > 0.05$)。

2.2 微塑料的形状类型、粒径分布和成分组成

总体上, 生物体内检出的微塑料有 3 种形状: 纤维状(95.4%)、碎片状(3.1%)和颗粒状(1.5%)。纤维状微塑料在所有物种的体内均有出现, 碎片状微塑料出现在鲮鱼(12.5%)、缙蛭(7.4%)和大黄鱼(5.6%)体内, 颗粒状微塑料仅出现在日本蟳体内(11.1%)(图 2A)。就类群而言, 碎片状微塑料出现在贝类(3.8%)和鱼类(3.7%)个体内, 颗粒状微塑料仅出现在短尾类个体内(11.1%)(图 2B)。

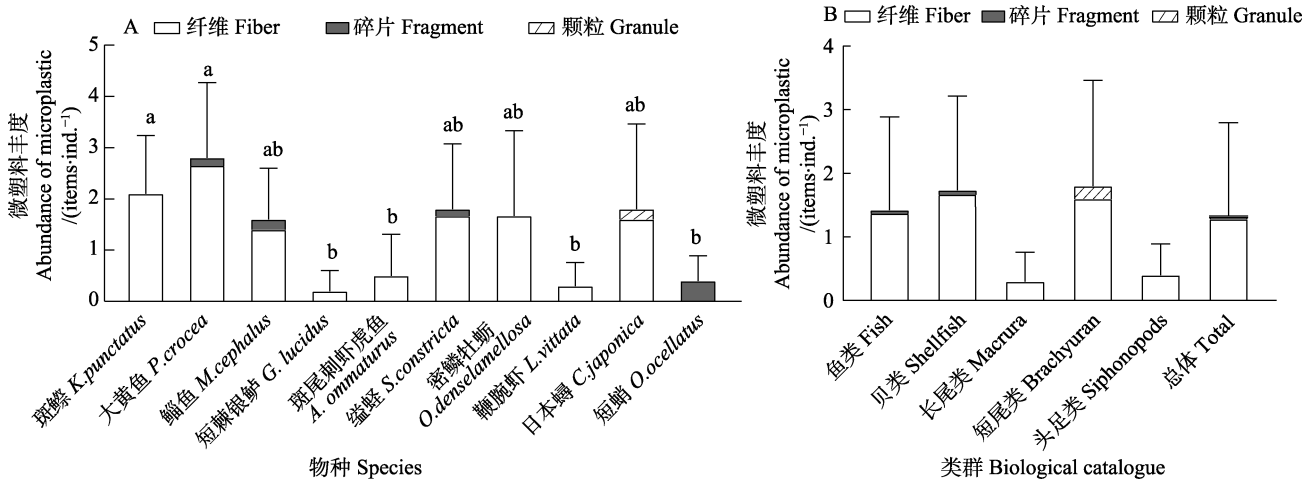


图 2 不同物种(A)和类群(B)的生物体内微塑料平均丰度

Fig.2 The individual mean abundance of microplastics identified in the tissues of the samples in terms of species (A) and biological catalogue (B)

不同字母代表物种间差异显著, Kruskal-Wallis 检验, Dunn test, $P < 0.05$

Different letters represent significant difference among species, Kruskal-Wallis test, Dunn test, $P < 0.05$

微塑料粒径范围为 110~4,796 μm , 平均粒径为 (1,246 \pm 1,119) μm , 其中, $\leq 1,000$ μm 的微塑料占比最高(55.2%), 1,001~2,000 μm 的微塑料次之(27.3%), 2,001~5,000 μm 的微塑料占比 17.5%(图 3)。

以化学成分组成划分, 生物体内检出的微塑料有 9 种类型, 包括人造丝(rayon, RY; 74.0%)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET; 14.5%)、聚丙烯(polypropylene, PP; 3.8%)、聚酰胺(polyamide, PA; 3.1%)、聚乙烯(polyethylene, PE; 1.5%)、聚碳酸酯(polycarbonate, PC; 0.8%)、聚丙烯腈(polyacrylonitrile, PAN; 0.8%)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA; 0.8%)和乙烯-醋酸乙烯共聚物(ethylene/vinyl acetate, EVA; 0.8%; 图 4)。

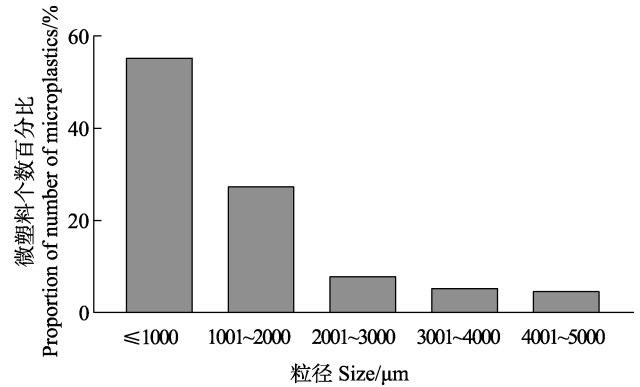


图 3 生物体内微塑料的粒径分布
Fig.3 The percentage distribution of the size of microplastics identified in the tissues of the samples

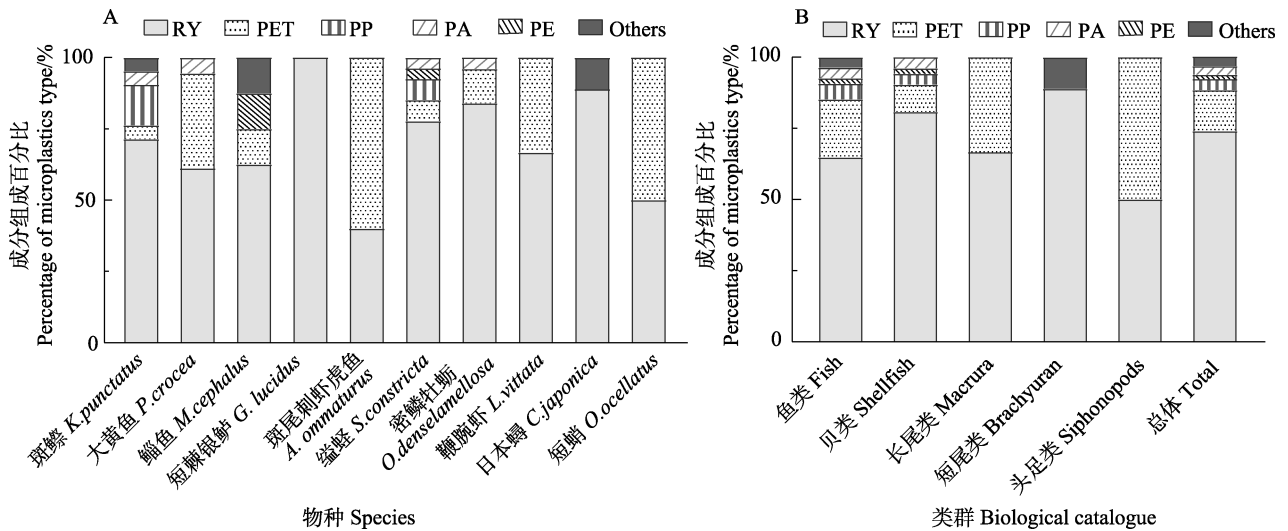


图 4 不同物种(A)和类群(B)的生物个体内微塑料的化学成分类型组成
Fig.4 The percentage distribution of the chemical type of microplastics identified in the tissues of the samples in terms of species (A) and biological catalogue (B)

就物种而言, RY 占比最高(40.0%~100.0%, 平均 74.0%), 出现在所有物种体内; PET(4.8%~50.0%)出现在除日本蝠外所有物种体内; PP 出现在缢蛭(7.4%)和斑螭(14.3%)体内; PE 出现在缢蛭(3.7%)和鲷鱼(12.5%)体内; PVA 仅出现在鲷鱼(12.5%)体内; PAN 仅出现在斑螭体内(4.8%); EVA(5.6%)和 PC(5.6%)仅出现在日本蝠体内。

3 讨论

3.1 海洋生物对塑料的摄取及其影响因素

研究发现, 在海洋中的藻类、浮游动物、双壳类、鱼类和海洋哺乳动物等众多生物的体内均检出微塑料(Woods *et al*, 2018)。象山湾常见的贝类、短尾类、长尾类、头足类和鱼类的体内均出现不同丰度水平的微塑料, 表明在该水域的海洋生物体内存在微塑料

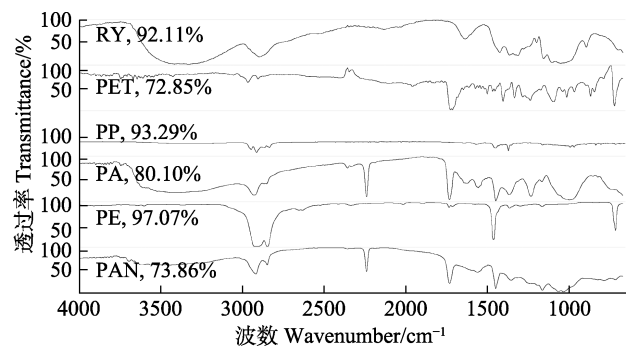


图 5 生物体内 5 种主要微塑料的红外光谱
Fig.5 The μ -FTIR spectra of five main microplastics identified in the tissues of the samples

图中的百分比数字为获取的光谱与有机聚合物谱库比对的匹配度

The percentage indicates the matching degree of a spectrum obtained with the organic polymer library

污染的现象具有一定普遍性。海洋生物体内微塑料丰度与水环境(水体、沉积物等)中微塑料的污染水平相关,前者可间接反映后者的污染水平(Pellini *et al.*, 2018)。例如,通常情况下,相对于大洋和深海生物,栖息在受人类活动影响剧烈的近海和海湾水域的生物摄入塑料碎片或微塑料的现象更明显(Moore *et al.*, 2001; Jabeen *et al.*, 2017)。

象山湾 10 种生物体内微塑料的个体平均丰度为(1.3±1.5)个,与土耳其近海[1.8 个,大西洋鲷(*Sparus aurata*)等 28 种鱼类](Güven *et al.*, 2017)和英吉利海峡[1.9 个,海鲂(*Zeus faber*)等 10 种鱼类](Lusher *et al.*, 2013)生物体内的微塑料水平相当。这一丰度值高于黄海[0.4 个,小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)等 19 种鱼类](Sun *et al.*, 2019)及葡萄牙近岸水域[0.3 个,白姑鱼(*Argyrosomus regius*)等 26 种鱼类](Neves *et al.*, 2015)生物体内微塑料的水平,但低于东京湾[2.3 个,日本鳀(*Engraulis japonicus*)](Tanaka *et al.*, 2016)、舟山嵛山列岛[2.3~7.3 个,海鳗(*Muraenesox cinereus*)等 9 种鱼类](Zhang *et al.*, 2019)、湛江红树林湿地[2.8 个,赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)等 32 种鱼类](Huang *et al.*, 2019)、南海[胃 2.0 个,肠 1.8 个,日本尖牙鲈(*Synagrops japonicus*)等 13 种鱼类](Zhu *et al.*, 2019)、波斯湾[3.7~17.7 个,拟蟹守螺(*Cerithidea cingulata*)等 5 种软体动物](Naji *et al.*, 2018)和海州湾[13.5~22.2 个,赤鼻棱鳀(*Thryssa kammalensis*)等 6 种鱼类](Feng *et al.*, 2019)生物体内微塑料的水平。海洋环境中微塑料污染水平的不同会导致各研究水域的生物体内微塑料丰度产生差异(Abidli *et al.*, 2019)。例如,在海州湾,生活于河口区的赤鼻棱鳀体内的微塑料丰度明显高于其他水域的个体内的微塑料水平(Feng *et al.*, 2019);在黄海南部,底栖生物体内的微塑料丰度与表层沉积物中微塑料丰度显著正相关(Wang *et al.*, 2018)。

海洋生物的生活习性也会影响其体内微塑料的丰度水平。深海表层沉积物是海洋塑料最终聚集的汇,即使低密度的微塑料也会通过各种生物过程沉降到海底,从而增加底栖生物摄入微塑料的风险(Zhang *et al.*, 2019)。已有研究表明,部分底栖生物体内的微塑料丰度要高于中上层生物体内的微塑料丰度(Jabeen *et al.*, 2017),如生活在泥沙中的贝类体内通常表现出较高水平的微塑料丰度(Abidli *et al.*, 2019)。而生物摄食策略是影响其体内微塑料丰度的另一个重要因素(Jabeen *et al.*, 2017)。一般而言,在同一水环境中,相对于主要从环境中直接摄入微塑料的小型滤食性生物(如中上层小型鱼类、小型虾和贝类),大型捕

食者除了通过呼吸、滤水等活动从环境中直接摄取微塑料外,还可以通过大量捕食含有微塑料的饵料生物而摄取更多的微塑料,导致其体内个体微塑料丰度水平升高(Zhang *et al.*, 2019)。但捕食者对饵料的选择性及微塑料在生物体内滞留时间的差异会导致不同营养级捕食者体内微塑料丰度的差异(Güven *et al.*, 2017; Abidli *et al.*, 2019)。在本研究中,不同类群生物体内微塑料的个体丰度未出现显著的统计学差异,生物体内微塑料丰度水平的种间差异与其摄食习性的相关性也不明显。部分其他海域的生物体内微塑料丰度水平也显示出类似的结果(Chan *et al.*, 2019)。此外,本研究中短棘银鲈和鞭腕虾等小个体生物体内微塑料丰度显著低于斑鳃和大黄鱼等大个体生物,这表明除了生物的摄食策略外,其他因素(如栖息地中微塑料丰度、生物个体大小等)均可能显著影响生物体内微塑料的丰度水平。

研究方法的差异也会对生物体内微塑料丰度的检测结果造成影响。如本研究中鱼类的相关结果所示,由于鱼类首先通过呼吸和滤水直接从环境中摄入微塑料,作为其呼吸和滤水器官,鳃丝中一般也留存了一定比例微塑料。有些研究只计测其消化道内的微塑料数量,会低估鱼类体内的微塑料丰度水平。此外,研究中生物组织的消解方法和消解程度的差异也会导致对生物体内微塑料丰度检测结果的偏差(王昆等, 2017)。例如,浓酸消解法会对 PA 等微塑料造成损伤,甚至在提取过程中这种类型的塑料被完全破坏,导致其检测丰度被低估(Claessens *et al.*, 2013)。本研究利用对微塑料损伤较轻、消解效果较好的强碱消解法对鱼类多组织内的微塑料进行了检测,改善了生物体内微塑料的检测效率。

3.2 生物体内微塑料组成特征

本研究中,象山湾 10 种常见生物体内检测出了纤维状、碎片状和颗粒状 3 种形状类型的微塑料,以纤维状个体占绝对优势(95.4%),与该海域沉积物中其占比较高(94.7%)相对应(Wu *et al.*, 2019)。纤维是海洋环境和生物体中常见的微塑料形状,本研究的结果与国内外其他水域的相关研究结果相吻合(Lusher *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2019)。例如,在海州湾、香港、嵛山列岛、葡萄牙和西班牙附近海域,鱼类摄入纤维状微塑料个体分别占比 98.0%、84.0%、83.5%、65.8%和 71.0%(Neves *et al.*, 2015; Bellas *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019)。海洋环境中较高的纤维状微塑料丰度及其物理特征会使其更易被海洋生物摄入和累积。例如,黄海鱼类

消化道内纤维状塑料占消化道检出微塑料总量的 67.0%，而沉积物中纤维状微塑料比例为 93.9%(Zhao *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019); 舟山嵊泗马鞍列岛附近海域的鱼类消化道内纤维状塑料占检出微塑料总数量的 83.5%，而水体和沉积物中纤维状微塑料分别占比 70.0%和 92.0% (Zhang *et al.*, 2019)。另外，纤维状微塑料更容易缠绕在生物的鳃上且进入消化道后不易被排出，导致生物体内纤维状微塑料的累积。例如，微塑料可通过岸蟹(*Carcinus maenas*)的呼吸过程进入鳃室，并在鳃室内积累(Watts *et al.*, 2014); 在挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)中，纤维状微塑料易滞留和累积在前肠而不能被完全排空，导致消化道内的微塑料丰度升高(Murray *et al.*, 2011)。

海洋环境和生物体内已被检出的微塑料成分有 10 多种，主要以 RY、PE、PP、PS 和 PET 等 5 种塑料为主。在象山湾 10 种常见生物体内检测出了 9 种微塑料，以 RY(74.0%)和 PET(14.5%)为主，PP(3.8%)和 PA(3.1%)次之，其他包括 PE、PC、PAN、PVA 和 EVA 等(4.7%)，这与该水域环境中表层沉积物微塑料的成分组成情况大致吻合(RY, 60.0%~88.0%; PP, 8.0%~28.0%)(Wu *et al.*, 2019)。类似结果在其他研究中也报道(Neves *et al.*, 2015)。如英吉利海峡附近海域 10 种鱼类体内检出的微塑料成分以 RY(57.8%)为主，PA(35.6%)和 PE(5.1%)等次之(Lusher *et al.*, 2013); 孟加拉湾北部 2 种虾类体内被检出的微塑料成分为 PA(68.4%)和 RY(31.6%)(Hossain *et al.*, 2019)。这几种主要类型聚合物均为日常生活和海洋环境中常见的塑料化合物。RY 通常被用作个人卫生及纺织用品，而一次日常衣物清洗可产生多达 1900 个塑料纤维(Browne *et al.*, 2011)，这些塑料纤维可随污水处理后的废水进入海洋。而 PE、PP 和 PET 在日常生活中也被广泛生产和使用。例如，近年来，欧洲的 PE、PP 和 PET 年产量占总塑料产量的 50%以上(Plastics Europe, 2019)。大量的微塑料在生产使用过程中通过各种方式进入海洋并被广泛运输和扩散，成为主要的全球性海洋微塑料污染源和留存于生物体内的微塑料主体。

就全球海洋微塑料分布而言，微塑料整体呈现出随粒径增大而丰度减小的趋势(Wang *et al.*, 2018; Mu *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019)。例如，在局部海域，南海表层海水小型微塑料(0.02~0.3 mm)是中大型微塑料(0.3~5 mm)丰度的 100 倍以上(Cai *et al.*, 2018); 在黄海南部沉积物中，<1 mm 的微塑料占比高达 81.0%(Wang *et al.*, 2018)。相应地，海洋生物体内出现的小粒径微塑料的丰度普遍高于较大粒径微塑料的丰度。

在黄海南部沉积物中，0~1 mm、1~2 mm 和 2~5 mm 粒径的微塑料分别占比 81%、12%和 7%，生活于该海域的底层鱼类体内，3 种粒径的塑料则分别占比 61.4%、20.4%和 18.2%(Wang *et al.*, 2018); 在舟山嵊泗马鞍列岛表层海水和沉积物中，<1 mm 的微塑料分别占比 78.3%和 86.5%，生活于该水域的鱼类体内，<1 mm 的微塑料占比 77.3%，与表层海水和沉积物粒径分布趋势一致(Zhang *et al.*, 2019)。象山湾 10 种常见生物体内出现的微塑料个体粒径为 0.11~4.80 mm，以≤0.5 mm (30.0%)和 0.5~1.0 mm (25.2%)的小型微塑料居多，与该水域环境中的微塑料以小型微塑料为主一致(Chen *et al.*, 2018)。而且，较大粒径的微塑料通常出现在大黄鱼等较大的生物个体体内。一方面，生物内微塑料的粒径组成可能与环境中微塑料粒径组成有关(Lima *et al.*, 2014); 另一方面，生物个体大小和摄食习性也会影响其摄取微塑料的粒径组成(Boerger *et al.*, 2010)。小型浮游动物一般通过滤食主要摄取水体中一些小型微塑料，而大型捕食者(如鱼类和头足类)则更容易通过滤水和吞食等方式从环境或食物中摄入更大粒径的微塑料，导致不同类群或个体大小的生物间摄取微塑料粒径组成产生差异。

3.3 养殖设施对象山湾生物体内微塑料的影响

本研究在生物体内未发现渔网、渔绳等线状和养殖浮标等产生的典型的泡沫状微塑料。成分分析也显示，PE、PP 和 PS 等养殖设施常用的塑料类型也较少。在贝类和藻类重要养殖区海州湾的 6 种底层鱼类体内也发现了类似的微塑料分布特征(Feng *et al.*, 2014; 李征等, 2020)，即鱼类体内的微塑料可能与养殖设施产生的微塑料关系较小。渔网和渔绳等产生的线状微塑料通常粒径较大，鱼类相对不易误食这类微塑料，养殖浮标等产生的泡沫状微塑料密度较低，容易悬浮在上层水体。在象山湾底部沉积物中也同样未发现泡沫状和 PS 类型的微塑料(Wu *et al.*, 2019)。本研究以底层物种为主，因此，养殖设施对其摄食微塑料的影响可能较小。

4 结论

本研究通过对象山湾 10 种海洋生物体内的微塑料污染特征调查发现，微塑料在生物体内普遍存在，形状类型和成分组成分别以纤维状和人造丝为主，以小粒径微塑料个体居多，丰度较其他研究海域处于中等水平，养殖设施对本研究的 10 种生物体内微塑料影响较小。在鱼类鳃丝和肠胃中均检测出微塑料颗粒，而在肌肉中未发现微塑料污染，表明微塑料会通

过鱼类呼吸过程进入鳃中,通过摄食过程进入消化器官,从而可能对鱼类呼吸与消化产生影响。海洋环境中微塑料的污染水平与海洋生物的生活方式、生活习惯性均会对微塑料在海洋生物体内的丰度、形状类型、粒径分布和成分组成等产生影响。为科学评估微塑料对生物的影响风险,未来还应加强研究生物对微塑料的摄食效率、微塑料在生物体内各组织器官内的分布特征、滞留时间及污染物释放率等科学问题。

参 考 文 献

- ABIDLI S, LAHBIB Y, EL MENIF N T. Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 142: 243–252
- BELLAS J, MARTÍNEZ-ARMENTAL J, MARTÍNEZ-CÁMARA A, *et al.* Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 109(1): 55–60
- BESSA F, BARRÍA P, NETO J M, *et al.* Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 128: 575–584
- BOERGER C M, LATTIN G L, MOORE S L, *et al.* Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(12): 2275–2278
- BROWNE M A, CRUMP P, NIVEN S J, *et al.* Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(21): 9175–9179
- CAI M, HE H, LIU M, *et al.* Lost but can't be neglected: Huge quantities of small microplastics hide in the South China Sea. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 1206–1216
- CHAN H S H, DINGLE C, NOT C. Evidence for non-selective ingestion of microplastic in demersal fish. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 149: 110523
- CHEN M, JIN M, TAO P, *et al.* Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. *Environmental Pollution*, 2018, 242: 1146–1156
- CLAESSENS M, VAN CAUWENBERGHE L, VANDEGEHUCHTE M B, *et al.* New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 70(1/2): 227–233
- COOPER D A, CORCORAN P L, PATRICIA L C. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(5): 650–654
- DERRAIK J G. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(9): 842–852
- ERIKSEN M, LEBRETON L C, CARSON H S, *et al.* Plastic pollution in the world's oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One*, 2014, 9(12): e111913
- FENG Z, ZHANG T, LI Y, *et al.* The accumulation of microplastics in fish from an important fish farm and mariculture area, Haizhou Bay, China. *Science of the Total Environment*, 2019, 696: 133948
- FU X, HAO Q, LIU CG, *et al.* Simulation for polyculture and eutrophication in Xiangshan Harbor. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 1–9 [付翔, 郝镛, 刘诚刚, 等. 象山港多品种养殖与富营养化状况的数值模拟. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 1–9]
- GÜVEN O, GÖKDAĞ K, JOVANOVIĆ B, *et al.* Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 286–294
- HIDALGO-RUZ V, GUTOW L, THOMPSON R C, *et al.* Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(6): 3060–3075
- HOSSAIN M S, RAHMAN M S, UDDIN M N, *et al.* Microplastic contamination in Penaeid shrimp from the Northern Bay of Bengal. *Chemosphere*, 2019, 238: 124688
- HUANG J S, BIMALI KOONGOLLA J, LI H X, *et al.* Microplastic accumulation in fish from Zhanjiang mangrove wetland, South China. *Science of the Total Environment*, 2019, 708: 134839
- JABEEN K, SU L, LI J, *et al.* Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. *Environmental Pollution*, 2017, 221: 141–149
- LI DX. Research advance and countermeasures on marine microplastic pollution. *Research of Environmental Sciences*, 2019, 32(2): 197–202 [李道季. 海洋微塑料污染状况及其应对措施建. *环境科学研究*, 2019, 32(2): 197–202]
- LI Z, GAO C M, YANG J L, *et al.* Distribution characteristics of microplastics in surface water and sediments of Haizhou Bay, Lianyungang. *Environmental Science*, 2020, 41(7): 3212–3221 [李征, 高春梅, 杨金龙, 等. 连云港海州湾海域表层水体和沉积物中微塑料的分布特征. *环境科学*, 2020, 41(7): 3212–3221]
- LI H X, MA L S, LIN L, *et al.* Microplastics in oysters *Saccostrea cucullata* along the Pearl River estuary, China. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 619–625
- LIMA A R A, COSTA M F, BARLETTA M, *et al.* Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. *Environmental Research*, 2014, 132: 146–155
- LIU Q, XU X D, HUANG W, *et al.* Research advances on the ecological effects of microplastic pollution in the marine environment. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(22): 7397–7409 [刘强, 徐旭丹, 黄伟, 等. 海洋微塑料污染的生态效应研究进展. *生态学报*, 2017, 37(22): 7397–7409]
- LIU Y C, LI J L, YUAN Q X, *et al.* Coastline and landscape changes in bay areas caused by human activities: A

- comparative analysis of Xiangshan Bay, China and Tampa Bay, USA. *Journal of Geographical Sciences*, 2016, 71(1): 86-103 [刘永超, 李加林, 袁麒翔, 等. 人类活动对港湾岸线及景观变迁影响的比较研究: 以中国象山湾与美国坦帕湾为例. *地理学报*, 2016, 71(1): 86-103]
- LUSHER A L, MCHUGH M, THOMPSON R C. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 67(1/2): 94-99
- MOORE C J, MOORE S L, LEECASTER M K, *et al.* A comparison of plastic and plankton in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(12): 1297-1300
- MOORE C J. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 2008, 108(2): 131-139
- MU J, ZHANG S, QU L, *et al.* Microplastics abundance and characteristics in surface waters from the Northwest Pacific, the Bering Sea, and the Chukchi Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 143: 58-65
- MURRAY F, COWIE P R. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(6): 1207-1217
- NAJI A, NURI M, VETHAAK A D. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 113-120
- NEVES D, SOBRAL P, FERREIRA J L, *et al.* Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 101(1): 119-126
- PELLINI G, GOMIERO A, FORTIBUONI T, *et al.* Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*, 2018, 234: 943-952
- Plastics Europe. *Plastics-the fact: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. 2019
- SUN X X, LI Q J, SHI Y Q, *et al.* Characteristics and retention of microplastics in the digestive tracts of fish from the Yellow Sea. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 878-885
- SUN X X. Progress and prospect on the study of the ecological risk of microplastics in the ocean. *Advances in Earth Science*, 2016, 31(6): 560-566 [孙晓霞. 海洋微塑料生态风险研究进展与展望. *地球科学进展*, 2016, 31(6): 560-566]
- TANAKA K, TAKADA H. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 34351
- THIEL M, HINOJOSA I, VÁSQUEZ N, *et al.* Floating marine debris in coastal waters of the SE-Pacific (Chile). *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(2): 224-231
- THOMPSON R C, OLSEN Y, MITCHELL R P, *et al.* Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 2004, 304(5672): 838
- VAN SEBILLE E, WILCOX C, LEBRETON L, *et al.* A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(12): 124006
- WANG J, WANG M X, RU S G, *et al.* High levels of microplastic pollution in the sediments and benthic organisms of the South Yellow Sea, China. *Science of the Total Environment*, 2018, 651: 1661-1669
- WANG K, LIN K D, YUAN D X. Research progress on the analysis of microplastics in the environment. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(1): 27-36 [王昆, 林坤德, 袁东星. 环境样品中微塑料的分析方法研究进展. *环境化学*, 2017, 36(1): 27-36]
- WATTS A J R, LEWIS C, GOODHEAD R M, *et al.* Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(15): 8823-8830
- WOODS M N, STACK M E, FIELDS D M, *et al.* Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 137: 638-645
- WU F Z, WANG Y J, LEUNG J Y S, *et al.* Accumulation of microplastics in typical commercial aquatic species: A case study at a productive aquaculture site in China. *Science of the Total Environment*, 2019, 708: 135432
- WU F Z, ZENG J N, XU X Q, *et al.* Status of marine microplastic pollution and its ecotoxicological effects on marine fish. *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(2): 85-98 [武芳竹, 曾江宁, 徐晓群, 等. 海洋微塑料污染现状及其对鱼类的生态毒理效应. *海洋学报*, 2019, 41(2): 85-98]
- XIA B, DU Y S, ZHAO X G, *et al.* Research progress on microplastics pollution in marine fishery water and their biological effects. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 178-190 [夏斌, 杜雨珊, 赵信国, 等. 微塑料在海洋渔业水域中的污染现状及其生物效应研究进展. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 178-190]
- ZHANG D, CUI Y, ZHOU H, *et al.* Microplastic pollution in water, sediment, and fish from artificial reefs around the Ma'an Archipelago, Shengsi, China. *Science of the Total Environment*, 2019, 703: 134768
- ZHAO J, RAN W, TENG J, *et al.* Microplastic pollution in sediments from the Bohai Sea and the Yellow Sea, China. *Science of the Total Environment*, 2018, 640-641: 637-645
- ZHU J, ZHANG Q, LI Y, *et al.* Microplastic pollution in the Maowei Sea, a typical mariculture bay of China. *Science of the Total Environment*, 2018, 658: 62-68
- ZHU L, WANG H, CHEN B, *et al.* Microplastic ingestion in deep-sea fish from the South China Sea. *Science of the Total Environment*, 2019, 677: 493-501

Abundance, Shape, and Chemical Composition of Microplastics within Ten Common Marine Species in Xiangshan Bay

YU Xiang^{1,3}, XU Lili^{1,3}, LIU Qiang², HUANG Wei², CAO Liang¹, DOU Shuozeng^{1,3}①

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Key Laboratory of Marine Ecosystem Dynamics, Second Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Hangzhou, Zhejiang 310012, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Marine microplastic pollution has become a global environmental problem. Understanding the status of microplastic pollution in living organisms is fundamental for assessing the biological effects on ecosystems. This study investigates the microplastic pollution status in tissues (digestive tract, gill and muscle) of ten common species in Xiangshan Bay. The results show that microplastics are widely present in all ten species. A total of 131 microplastics were detected in 61.0% of the organisms, with an average abundance of (1.3 ± 1.5) items/individual. A total of nine microplastic types were detected. The majority of the plastics were rayon (RY; 74.0%), polyethylene terephthalate (PET; 14.5%), polypropylene (PP; 3.8%) and polyamide (PA; 3.1%). Fiber, fragment, and granule microplastic shapes were detected, accounting for 95.4%, 3.1%, and 1.5% of the total microplastics, respectively. Rayon and fiber were present in all species investigated. The size of the microplastics ranged from 110 μm to 4796 μm [mean value: (1246 ± 1119) μm], with the size of ≤ 1000 μm accounting for 55.2% of the microplastics. PE, PP, and PS microplastics, as well as the typical foamed microplastics produced by breeding facilities, are detected less frequently and in a lower abundance in living organisms. Our findings provide the knowledge and data to improve our understanding of the status of microplastic pollution in marine organisms and assists in evaluating their biological effects in coastal ecosystems.

Key words Microplastic; Size, shape and chemical composition; Marine organisms; Xiangshan Bay

① Corresponding author: DOU Shuozeng, E-mail: szdou@qdio.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200211001

http://www.yykxjz.cn/

陈仕焯, 于雯雯, 张虎, 张硕. 吕泗渔场主要渔获物春夏秋三季脂肪酸组成及食性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 19–28
CHEN S X, YU W W, ZHANG H, ZHANG S. Fatty acid composition and feeding habits analysis of the main catches from Lüsi fishing ground during spring, summer and autumn. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 19–28

吕泗渔场主要渔获物春夏秋三季 脂肪酸组成及食性分析



陈仕焯^{1#} 于雯雯^{2#} 张 虎² 张 硕^{1,3①}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 江苏省海洋水产研究所 江苏 南通 226007;
3. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 为探究吕泗渔场主要渔获物营养价值、食性及季节变化,于2018年5、8和10月渔业资源调查采集渔获物,测定其脂肪酸组成,采用脂肪酸标记法进行食性分析。结果显示,8种主要渔获物多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸(PUFA/SFA)为0.88~1.79, n-3/n-6为2.56~3.18, C16:1n7和 $\Sigma 15+\Sigma 17$ 夏季显著增加($P<0.05$), C20:5n3+C22:6n3(EPA+DHA)、PUFA/SFA、n-3/n-6、C20:4n6、C22:6n3和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季显著增加($P<0.05$), C20:1+C22:1秋季显著减少($P<0.05$)。各渔获物营养价值较高且秋季显著高于春、夏季,其中,棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)和小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)营养价值最优。DHA/EPA和聚类分析将渔获物分为3组:哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)、周氏新对虾(*Metapenaeus joyneri*)和日本蟳(*Charybdis japonica*);凤鲚(*Coilia mystus*)、皮氏叫姑鱼(*Johnius belangerii*)、棘头梅童鱼和小黄鱼;银鲳(*Pampus argenteus*)。哈氏仿对虾、周氏新对虾、日本蟳植食性和底栖生物食性明显,凤鲚和小黄鱼浮游动物食性明显,银鲳植食性和浮游动物食性明显,皮氏叫姑鱼和棘头梅童鱼食性无明显偏好。夏季,硅藻和细菌食源显著增加;秋季,底栖生物、甲藻和陆生植物食源显著增加,浮游动物食性显著减少。

关键词 脂肪酸; 营养价值; 食性; 季节; 渔获物; 吕泗渔场

中图分类号 S931.1; S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)04-0019-10

吕泗渔场位于黄海西南部,属沙脊潮沟生态系统,由苏北沿岸水、长江冲淡水 and 黄海暖流三股水系汇流而成,在冷暖水系、高低盐度的交互下形成了独特的地理生态环境,该渔场水质肥沃、饵料充足,是多种鱼类产卵育肥的重要区域之一(田丰歌等,2011)。近年来,吕泗渔场频繁出现赤潮、工业污水、石油污染等,其渔场环境持续处于富营养化状态,轻度至中

度有机物污染和重金属污染,严重影响鱼类的栖息和繁殖,渔船数量和捕捞效率的提高也使得渔场渔业资源急剧衰退,部分经济鱼类已难以形成渔汛,渔场环境和渔业资源修复亟需解决(刘绿叶等,2009;宋静静等,2017)。目前,对吕泗渔场的研究多停留在生物群落结构(徐捷等,2016)、资源分布(于雯雯等,2013)与环境因子的关系上,而明晰生物食性是了解海洋食物

* 江苏省国家级海洋牧场示范项目(D8005-18-0188)和江苏省自然科学基金(BK20170438)共同资助 [This work was supported by the National Marine Ranching Demonstration Project of Jiangsu (D8005-18-0188), and the Natural Science Foundation of Jiangsu (BK20170438)]. #共同第一作者,陈仕焯, E-mail: chenshixuan2019@foxmail.com; 于雯雯: E-mail: jshyyww@163.com

① 通讯作者: 张 硕, 教授, E-mail: s-zhang@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-02-11, 收修改稿日期: 2020-03-21

网结构及物质能量流动的基础,是制定和改善渔场渔业资源修复及利用政策的重要依据。

传统食性分析法,如胃含物分析法、饵料差减分析法皆存在一定局限性,只能反映生物短期摄食情况。而脂肪酸是生物体内重要的储能物质,占生物体干质量的 5%左右,其化学性质稳定,被捕食者摄食分解后,能以原来的形式重新组合,并且以能量的形式长期储存在捕食者体内,是典型的生物标志物,脂肪酸标记法能准确反映物种一段时间内的综合摄食信息及营养级地位(沈亚男等, 2015)。本研究对吕泗渔场主要渔获物脂肪酸组成、营养关系、食性及季节变化进行分析,以期深入研究该海域鱼类食性对环境变化的响应、渔场渔业资源可持续利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样本采集

于 2018 年春季(5 月)、夏季(8 月)和秋季(10 月)采用单船有翼单囊底拖网在吕泗渔场(32°00'~34°00'N, 122°30'E 以西)进行渔业资源调查并采集实验样品,作业拖速 3.6 kn,每站拖曳时长约 25 min,采样站位见图 1。根据渔获物种类及数量,选取每个季节数量优势的物种作为研究对象,每组选取 3~5 个平行样品,包括 13 尾哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)、14 尾周氏新对虾(*Metapenaeus joyneri*)、14 只日本蟳(*Charybdis japonica*)、10 尾凤鲚(*Coilia mystus*)、12 尾皮氏叫姑鱼(*Johnius belangerii*)、13 尾棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)、13 尾小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)和 10 尾银鲳(*Pampus argenteus*),共 8 种 99 尾渔获物,冷冻保存于-20℃,带回实验室后立即处理。

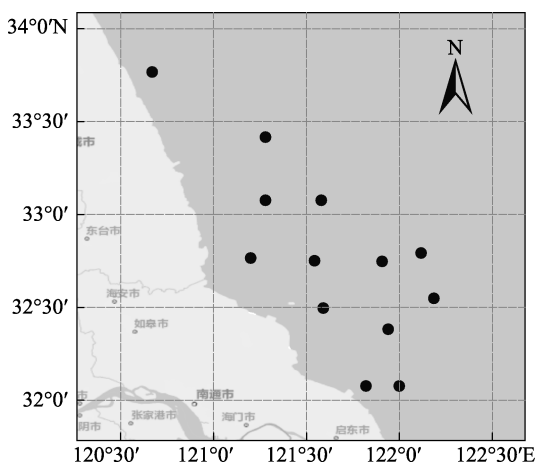


图 1 研究区域及采样站位

Fig.1 Study area and sampling locations

1.2 实验方法

1.2.1 样本预处理 测量渔获物体长、体重(表 1)和性腺成熟度,其中,日本蟳和银鲳的性腺成熟度主要处于 V~VI 期,其他渔获物主要处于 II~III 期。鱼类取第 1 背鳍附近白肌,虾类取腹部肌肉,蟹类取第 1 螯足肌肉,用超纯水冲洗干净后放入冷冻干燥机冷冻干燥 30 h,再用混合球磨仪研磨成粉末,装入离心管待测。

1.2.2 粗脂提取 采用 Folch 法提取脂肪酸(Folch *et al.*, 1957),称取 0.2 g 粉末,加入 15 mL 氯仿-甲醇溶液(体积比 2 : 1),浸泡 22 h,离心过滤(3500 r/min)后取上清液并加入 0.9%的生理盐水,取下层溶液于圆底烧瓶中氮吹,得到粗脂。

1.2.3 粗脂甲酯化 粗脂甲酯化参照 GB/T 17376-2008《动植物油脂脂肪酸甲酯制备》的三氟化硼-甲醇法,先加入氢氧化钠-甲醇溶液(0.5 mol/L) 4 mL,水浴加热,8 min 后加入 4 mL 三氟化硼-甲醇溶液,25 min 后加入 4 mL 正己烷,萃取回流 2 min,冷却至室温,再加入饱和 NaCl 溶液,吸取上层有机层,以 1 : 1 的比例与十九烷酸甲酯(50 mg/L)混合于色谱瓶,待 GC-MS 测定。

1.2.4 脂肪酸 GC-MS 分析 色谱柱型号为 Agilent HP-88 (60 m×0.25 mm×0.20 μm),进样口温度 220℃,检测器温度 280℃,温柱初始温度 125℃,以 8℃/min 上升到 145℃,保持 26 min 后,再升温至 220℃ (2℃/min)。以 37 种脂肪酸混标为标准,对比保留时间进行定性分析,以十九烷酸甲酯标准品为内标,进行定量分析,内标回收率皆在 74%以上,内标法公式如下:

$$X_i = F_i \times \frac{A_i}{A_{19}} \times \frac{m_{19}}{m} \times 100\%$$

式中, X_i 为待测样品组分 i 的含量(mg/g); A_i 是组分 i 的峰面积; m 是样品质量; m_{19} 是内标物十九烷酸甲酯的质量; A_{19} 是待测样品中内标物的峰面积; F_i 是组分 i 与内标物的校正因子之比,称为相对校正因子。

1.3 数据分析

脂肪酸数据多元统计运用方差分析(ANOVA)和聚类分析(Cluster)。聚类分析将样本分组,使用 Origin 2018 和 SPSS 20.0 软件进行,方差分析判定变量之间是否存在显著差异,分析精度为±0.01%。

2 结果

2.1 脂肪酸组成及季节差异

8 种渔获物样品体内各检测出 30 种脂肪酸,包括 12 种饱和脂肪酸(SFA) (C12:0、C13:0、C14:0、

C15:0、C16:0、C17:0、C18:0、C20:0、C21:0、C22:0、C23:0 和 C24:0)、8 种单不饱和脂肪酸(MUFA)(C14:1n5、C15:1n5、C16:1n7、C17:1n7、C18:1n9、C20:1、C22:1n9 和 C24:1n9)和 10 种多不饱和脂肪酸(PUFA)(C18:2n6、C18:3n3、C18:3n6、C20:2、C20:3n3、

C20:3n6、C20:4n6、C20:5n3、C22:2n6 和 C22:6n3)。饱和脂肪酸中, C16:0 和 C18:0 百分含量最高; 不饱和脂肪酸中, C18:1n9、C20:5n3(EPA)和 C22:6n3(DHA)百分含量最高。8 种主要渔获物 PUFA/SFA 分布于 0.88~1.79 之间, n-3/n-6 分布于 2.56~3.18 之间。

表 1 主要渔获物体长、体重范围
Tab.1 The length and weight range of the main catches

物种 Species	体长/头胸甲长 Body length/Carapace length/mm			体重 Body weight/g			数量 Number		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
	哈氏仿对虾 <i>P. hardwickii</i>	68~91	74~93	71~97	2.9~5.6	4.6~6.3	4.5~6.5	4	5
周氏新对虾 <i>M. joyneri</i>	95~104	93~107	90~101	6.4~7.3	5.6~7.4	4.0~6.3	5	5	4
日本螯 <i>C. japonica</i>	39~54	41~49	34~52	32.5~57.3	30.7~47.9	40.2~56.8	5	5	4
凤鲚 <i>C. mystus</i>	109~136	107~132	109~130	5.3~11.2	3.8~9.8	5.4~9.0	4	3	3
皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>	96~115	98~121	91~117	13.3~21.2	15.6~33.7	11.3~30.6	5	4	3
棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	96~125	97~120	95~121	19.1~24.8	16.7~26.2	6.6~19.0	5	4	4
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	87~100	85~102	96~107	10.7~14.2	9.3~16.9	7.0~15.2	4	5	4
银鲳 <i>P. argenteus</i>	127~149	131~145	124~141	42.9~75.3	40.0~74.2	36.7~44.2	3	4	3

根据脂肪酸含量显著性差异检验可知(表 2 和表 3), 日本螯 PUFA/SFA 显著高于其他渔获物($P<0.05$), 8 种渔获物的 EPA+DHA、PUFA/SFA、n-3 和 n-3/n-6, 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$)。对食性有指示作用的脂肪酸称为特征脂肪酸, 吕泗渔场主要渔获物检测到的特征脂肪酸有 C16:1n7、C18:1n9、C20:4n6、C20:5n3、C22:6n3、 $\Sigma 15+\Sigma 17$ 、C18:2n-6+C18:3n-3、C20:1+C22:1、C20:5n-3/C22:6n-3、 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 和 DHA/EPA。其中, 主要渔获物的 C16:1n7 和 $\Sigma 15+\Sigma 17$ 夏季显著高于春、秋季($P<0.05$), C20:4n6、C22:6n3、 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 和 DHA/EPA 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$), C20:1+C22:1 秋季显著低于春、夏季($P<0.05$)。

哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本螯 C20:5n3 显著高于鱼类($P<0.05$)。哈氏仿对虾的 $\Sigma 15+\Sigma 17$ 夏季显著高于春、秋季($P<0.05$), C20:5n3 秋季显著高于夏季($P<0.05$), C18: 2n-6+C18:3n-3 和 C20:1+C22:1 秋季显著低于春、夏季($P<0.05$), 3 个季节 C20:5n-3/C22:6n-3 <1 。周氏新对虾的 C20:4n6 秋季最高, 春季最低, 3 个季节差异显著($P<0.05$), $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$), $\Sigma 15+\Sigma 17$ 秋季显著低于春、

夏季($P<0.05$), 春夏 C20:5n-3/C22:6n-3 >1 , 秋季 C20:5n-3/C22:6n-3 <1 。日本螯的 C18:1n9 秋季显著高于夏季($P<0.05$), C18:2n-6+C18:3n-3 秋季显著高于春季($P<0.05$), 春季 C20:5n-3/C22:6n-3 <1 , 夏、秋季 C20:5n-3/C22:6n-3 >1 。

3 个季节所有鱼类的 C20:5n-3/C22:6n-3 皆 <1 。凤鲚的 C20:1+C22:1 秋季显著低于春、夏季($P<0.05$)。皮氏叫姑鱼的 C16:1n7 春季显著高于秋季($P<0.05$), $\Sigma 15+\Sigma 17$ 夏季显著高于春、秋季($P<0.05$), C20:1+C22:1 夏季最高, 秋季最低, 3 个季节差异显著($P<0.05$), C22:6n3 和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$)。棘头梅童鱼的 C18:2n-6+C18:3n-3 夏季显著低于春、秋季($P<0.05$), C20:4n6、C20:5n3、C22:6n3 和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$)。小黄鱼的 C20:4n6 春季显著低于夏、秋季($P<0.05$), $\Sigma 15+\Sigma 17$ 夏季显著高于春、秋季($P<0.05$), C20:1+C22:1 夏季最高, 秋季最低, 3 个季节差异显著($P<0.05$), C22:6n3 和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季最高, 春季最低, 3 个季节差异显著($P<0.05$)。银鲳 C20:5n3 春季显著高于夏季($P<0.05$), C20:4n6、C22:6n3 和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 秋季显著高于春、夏季($P<0.05$)。

表 2 主要渔获物部分脂肪酸百分含量
Tab.2 Partial fatty acid content of main catches

脂肪酸 Fatty acid	哈氏仿对虾 <i>P. hardwickii</i>	周氏新对虾 <i>M. joyneri</i>	日本蟳 <i>C. japonica</i>	凤鲚 <i>C. mystus</i>	皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>	棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	银鲱 <i>P. argentus</i>	食性指示 Feeding instructions
C16:1n7	3.99±0.80	5.58±1.17	4.40±1.12	3.78±2.63	12.42±8.50	9.30±8.09	5.26±5.20	6.23±6.11	硅藻 Diatom
C18:1n9	8.19±0.90	9.10±0.71	14.14±2.06	12.78±7.32	10.56±4.16	16.00±8.84	10.82±5.32	15.07±9.18	褐藻 Brown algae
C20:4n6	4.67±0.48	5.23±1.06	6.14±1.05	2.31±0.74	3.25±1.90	3.08±1.58	2.97±1.35	3.57±1.29	底栖生物 Benthos
C20:5n3	9.33±0.72	10.37±1.56	13.65±2.56	5.24±1.17	5.34±3.64	5.79±1.98	5.23±1.25	3.98±1.41	硅藻 Diatom
C22:6n3	17.05±1.60	15.83±2.51	13.01±1.51	16.87±7.04	13.94±7.66	16.39±6.53	20.03±9.23	16.42±10.30	甲藻 Dinoflagellate
Σ15+Σ17	4.43±0.38	2.81±1.59	4.58±3.13	3.26±1.59	2.83±0.80	2.77±0.94	3.20±1.31	4.11±1.46	细菌 Bacteria
C18:2n-6+C18:3n-3	3.46±0.61	2.13±0.39	2.30±0.43	2.62±0.95	2.45±0.57	2.76±1.37	2.92±0.72	3.20±0.66	大型藻类/海草/陆生植物 Macroalgae/Seagrass/Terrestrial plant
C20:1+C22:1	3.49±1.59	2.91±1.22	3.69±1.23	3.91±2.31	3.32±1.42	2.73±1.10	3.85±1.90	4.96±3.57	浮游动物 Zooplankton
C20:5n-3/C22:6n-3	0.55±0.05	0.89±0.38	1.06±0.25	0.35±0.11	0.39±0.12	0.37±0.08	0.30±0.11	0.33±0.19	硅藻/甲藻 Diatom/Dinoflagellate
Σ22+Σ24	24.04±1.21	21.42±2.52	20.13±1.40	24.23±6.92	19.77±8.38	21.39±7.76	26.78±9.68	23.51±8.60	陆生植物 Terrestrial plant
DHA/EPA	1.83±0.16	1.34±0.59	0.98±0.17	3.12±0.87	2.77±0.64	2.82±0.52	3.74±1.22	4.15±2.34	营养级 Trophic level
EPA+DHA	26.39±2.04	26.19±2.79	26.66±2.97	22.11±8.04	19.28±10.77	22.19±8.29	25.26±10.10	20.40±10.80	
PUFA/SFA	1.20±0.12	1.20±0.17	1.79±0.40	0.88±0.22	0.89±0.45	1.08±0.50	1.11±0.42	0.96±0.33	
n-3	31.61±1.97	31.87±2.92	32.97±2.64	25.51±8.04	22.98±12.05	25.97±9.44	29.25±10.79	24.37±11.61	
n-3/n-6	2.81±0.24	2.98±0.31	2.63±0.38	3.05±1.43	2.56±0.80	3.11±0.49	3.18±1.11	2.80±1.13	

表 3 春夏秋三季主要渔获物部分脂肪酸百分含量
Tab.3 Partial fatty acid content of main catches in spring, summer and autumn

脂肪酸 Fatty acid	哈氏仿对虾 <i>P. hardwickii</i>			周氏新对虾 <i>M. joyneri</i>			日本蟳 <i>C. japonica</i>			凤鲚 <i>C. mystus</i>		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
C16:1n7	3.53±0.45	4.06±0.64	4.37±1.14	6.82±0.62	5.54±1.21	4.59±0.66	5.04±1.13	3.64±1.00	4.55±0.86	5.69±3.43	2.55±0.47	2.46±1.04
C18:1n9	8.95±0.67	7.60±0.98	8.15±0.40	9.16±0.46	10.74±3.25	8.67±0.93	14.20±1.86 ^{ab}	12.38±0.79 ^b	16.26±1.36 ^a	17.53±9.65	8.52±1.60	10.70±4.45
C20:4n6	4.92±0.33	4.52±0.50	4.61±0.58	4.27±0.59 ^c	5.23±1.18 ^b	6.50±0.19 ^a	6.54±1.23	5.49±0.62	6.44±1.08	1.89±0.86	2.76±0.32	2.41±0.77
C20:5n3	9.58±0.77 ^a	8.68±0.35 ^b	9.90±0.37 ^a	11.14±1.94	12.11±3.28	8.76±0.49	13.03±0.61	12.83±1.57	15.45±4.31	4.72±1.20	4.72±0.86	6.46±0.32
C22:6n3	17.64±0.45	15.83±1.83	18.00±1.19	15.08±2.18	14.85±2.15	18.23±2.93	13.51±1.20	12.31±1.31	13.26±2.09	13.15±7.82	14.34±0.89	24.34±3.04
Σ15+Σ17	4.09±0.11 ^b	4.79±0.32 ^a	4.31±0.23 ^b	3.58±0.34 ^a	3.56±0.96 ^a	0.46±0.12 ^b	3.34±0.35	6.51±4.92	3.70±0.65	3.52±2.44	3.64±0.30	2.51±1.07
C18:2n-6+ C18:3n-3	3.67±0.24 ^a	3.88±0.36 ^a	2.73±0.42 ^b	2.18±0.37	2.25±0.47	2.14±0.66	1.98±0.33 ^b	2.33±0.17 ^{ab}	2.67±0.53 ^a	2.19±0.43	2.80±0.78	3.01±1.59

续表 3

脂肪酸 Fatty acid	哈氏仿对虾 <i>P. hardwickii</i>			周氏新对虾 <i>M. joyneri</i>			日本鳎 <i>C. japonica</i>			凤鲷 <i>C. mystus</i>		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
C20:1+C22:1	4.43±0.44 ^a	4.50±0.35 ^a	1.30±0.70 ^b	1.84±1.49	2.66±1.39	3.08±0.17	4.12±0.31	4.51±0.46	2.13±1.22	4.46±2.18 ^a	5.80±0.58 ^a	1.29±0.57 ^b
C20:5n-3/ C22:6n-3	0.54±0.05	0.55±0.06	0.55±0.05	1.36±0.07 ^a	1.07±0.39 ^b	0.49±0.10 ^c	0.97±0.07	1.05±0.13	1.20±0.44	0.42±0.14	0.33±0.08	0.27±0.02
Σ22+Σ24	24.97±0.80	23.91±1.19	23.27±1.15	20.66±1.47 ^b	20.78±1.62 ^b	24.36±2.55 ^a	19.96±1.79	19.84±1.15	20.72±1.33	20.52±9.71	24.40±1.93	29.00±2.95
DHA/EPA	1.85±0.18	1.82±0.19	1.82±0.17	0.74±0.04 ^c	1.08±0.45 ^b	2.09±0.35 ^a	1.04±0.07	0.97±0.12	0.91±0.29	2.65±1.10	3.13±0.69	3.76±0.28
EPA+DHA	27.21±0.72 ^a	24.51±1.98 ^b	27.90±1.05 ^a	26.21±4.07	26.97±3.25	26.99±2.94	26.54±1.66	25.14±2.40	28.71±4.15	17.87±8.81	19.06±0.16	30.80±3.36
PUFA/SFA	1.35±0.04 ^a	1.14±0.07 ^b	1.12±0.05 ^b	1.15±0.22	1.43±0.53	1.26±0.19	1.71±0.09	1.64±0.39	2.09±0.57	0.83±0.33	0.81±0.06	1.03±0.09
n-3	33.06±0.77 ^a	29.63±1.55 ^b	32.63±1.02 ^a	31.07±4.15	32.62±3.42	33.43±2.92	33.18±0.80	31.12±1.41	35.02±3.91	21.12±9.40	23.22±0.34	33.66±3.46
n-3/n-6	2.92±0.12 ^a	2.57±0.13 ^b	3.01±0.20 ^a	2.94±0.27	2.91±0.35	2.90±0.41	2.82±0.52	2.55±0.31	2.49±0.20	2.65±1.20	2.16±0.18	4.45±1.58
脂肪酸	小头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>											
脂肪酸 Fatty acid	皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>			棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>			小黄鱼 <i>L. polyactis</i>			银鲱 <i>P. argententeus</i>		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
C16:1n7	18.80±2.82 ^a	11.49±9.77 ^{ab}	3.03±1.48 ^b	17.67±8.64	9.53±3.53	2.42±1.16	12.34±3.36 ^a	2.41±0.26 ^b	1.75±0.44 ^b	10.34±9.25	7.31±2.46	0.69±0.05
C18:1n9	13.33±2.06	10.23±5.22	6.37±0.58	18.49±12.13	21.37±6.42	9.72±2.92	18.13±3.05 ^a	7.18±0.09 ^b	8.06±0.61 ^b	13.56±13.6	21.78±3.45	7.64±0.54
C20:4n6	1.47±0.36	4.06±1.32	5.16±1.49	1.47±0.53 ^b	2.80±1.02 ^b	4.59±0.99 ^a	1.11±0.36 ^b	3.88±0.42 ^a	3.69±0.44 ^a	2.92±0.49 ^b	2.87±0.75 ^b	5.14±1.02 ^a
C20:5n3	3.08±0.81	4.35±1.31	10.44±3.89	5.20±1.80 ^b	4.29±1.01 ^b	7.47±1.56 ^a	4.46±1.99	5.13±0.27	6.13±0.54	5.53±0.72 ^a	2.73±1.02 ^b	4.09±0.30 ^{ab}
C22:6n3	9.26±1.96 ^b	11.10±4.77 ^b	25.52±2.93 ^a	11.85±3.2 ^b	12.42±4.06 ^b	23.21±3.65 ^a	9.99±2.61 ^c	18.91±2.7 ^b	31.48±3.57 ^a	13.16±4.65 ^b	8.69±4.86 ^b	29.99±2.93 ^a
Σ15+Σ17	2.28±0.21 ^b	3.74±0.63 ^a	2.52±0.47 ^b	3.11±1.61	2.32±0.64	2.86±0.29	2.03±0.49 ^b	4.50±1.11 ^a	2.74±0.34 ^b	4.26±1.48	5.00±1.44	2.78±0.09
C18:2n-6+ C18:3n-3	2.14±0.44	2.73±0.74	2.56±0.39	3.04±1.37 ^a	1.30±0.29 ^b	3.70±0.92 ^a	2.53±0.53	2.84±0.82	3.41±0.59	3.29±0.86	3.42±0.75	2.80±0.11
C20:1+C22:1	3.33±0.70 ^b	4.76±0.29 ^a	1.38±0.39 ^c	3.75±1.34	2.50±0.90	2.11±0.36	3.51±0.63 ^b	5.79±0.98 ^a	1.77±0.68 ^c	8.82±3.27	4.88±1.41	1.19±0.12
C20:5n-3/ C22:6n-3	0.33±0.04	0.42±0.11	0.43±0.21	0.44±0.10	0.35±0.05	0.32±0.04	0.43±0.09 ^a	0.28±0.04 ^a	0.20±0.02 ^b	0.47±0.21	0.36±0.14	0.14±0.01
Σ22+Σ24	13.35±2.63 ^b	19.04±6.31 ^b	31.41±2.25 ^a	15.99±4.34 ^b	16.90±5.82 ^b	29.31±3.69 ^a	14.25±3.29 ^c	28.80±2.28 ^b	36.79±2.67 ^a	22.53±3.61 ^b	16.14±4.18 ^b	34.33±2.76 ^a
DHA/EPA	3.05±0.41	2.47±0.50	2.71±1.07	2.35±0.53	2.87±0.42	3.15±0.34	2.41±0.51 ^c	3.69±0.54 ^b	5.14±0.54 ^a	2.45±1.06 ^b	3.04±1.01 ^b	7.32±0.32 ^a
EPA+DHA	12.34±2.69 ^b	15.45±6.05 ^b	35.96±1.23 ^a	17.05±4.53 ^b	16.70±4.98 ^b	30.68±5.07 ^a	14.45±4.60 ^c	24.03±2.75 ^b	37.61±3.88 ^a	18.69±4.16 ^b	11.42±5.80 ^b	34.08±3.20 ^a
PUFA/SFA	0.52±0.14 ^c	0.85±0.25 ^b	1.54±0.08 ^a	1.08±0.68	0.74±0.24	1.36±0.39	0.58±0.19 ^c	1.21±0.10 ^b	1.51±0.25 ^a	1.07±0.12 ^a	0.62±0.18 ^b	1.29±0.10 ^a
n-3	14.36±3.13 ^b	20.15±7.47 ^b	41.12±0.06 ^a	20.06±5.02 ^b	19.93±6.18 ^b	35.53±5.83 ^a	16.58±5.16 ^c	29.53±2.34 ^b	41.57±3.95 ^a	22.29±4.61 ^b	14.73±5.90 ^b	39.32±2.30 ^a
n-3/n-6	2.46±0.41 ^b	1.86±0.36 ^c	3.68±0.30 ^a	3.16±0.84	3.06±0.15	3.12±0.43	2.97±1.22 ^b	2.41±0.37 ^b	4.34±0.67 ^a	2.67±0.48 ^{ab}	1.96±0.93 ^b	4.04±0.68 ^a

注: 不同小写字母表示同种鱼不同季节之间脂肪酸含量差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significant differences in fatty acid content between different seasons of the same species of fish ($P < 0.05$)

2.2 主要渔获物 DHA/EPA 值及聚类分析

用 DHA/EPA 值对主要渔获物绘制柱状图(图 2), 哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本鳀 DHA/EPA 值较低, 分别为 1.83、1.34 和 0.98; 皮氏叫姑鱼、凤鲚、棘头梅童鱼和小黄鱼的 DHA/EPA 值居中, 分别为 2.77、3.12、2.82 和 3.74; 银鲳 DHA/EPA 值较高, 为 4.15。

对吕泗渔场主要渔获物脂肪酸含量进行聚类分析(图 3a), 在距离 12 处可分为 3 组, 哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本鳀为一组, 银鲳为一组, 凤鲚、皮氏叫姑鱼、棘头梅童鱼和小黄鱼为另一组。春、夏、秋 3 个季节脂肪酸含量聚类分析结果显示(图 3b~d), 在距离 14 处, 春季分为 4 组, 哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本鳀为一组, 凤鲚为一组, 棘头梅童鱼和银鲳为一组, 皮氏叫姑鱼和小黄鱼为另一组; 夏季分为 3 组, 哈氏仿对虾、周氏新对虾、凤鲚、皮氏叫姑鱼和小黄鱼为一组, 日本鳀为一组, 棘头梅童鱼和银鲳

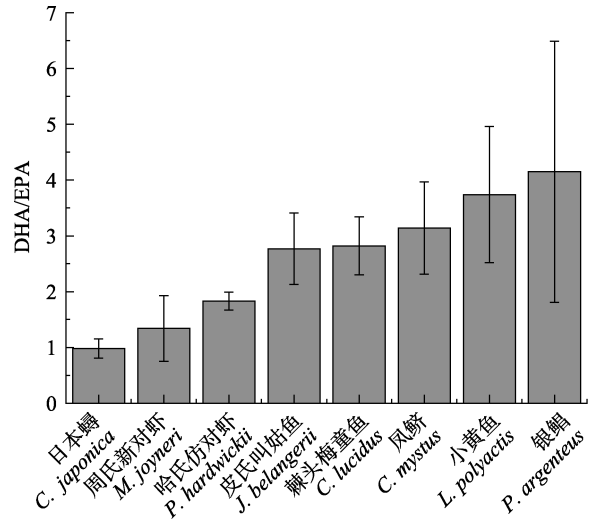


图 2 主要渔获物 DHA/EPA 值
Fig.2 DHA/EPA ratios of main catches

为另一组; 秋季可分为 3 组, 哈氏仿对虾和周氏新对虾为一组, 日本鳀为一组, 凤鲚、皮氏叫姑鱼、棘头

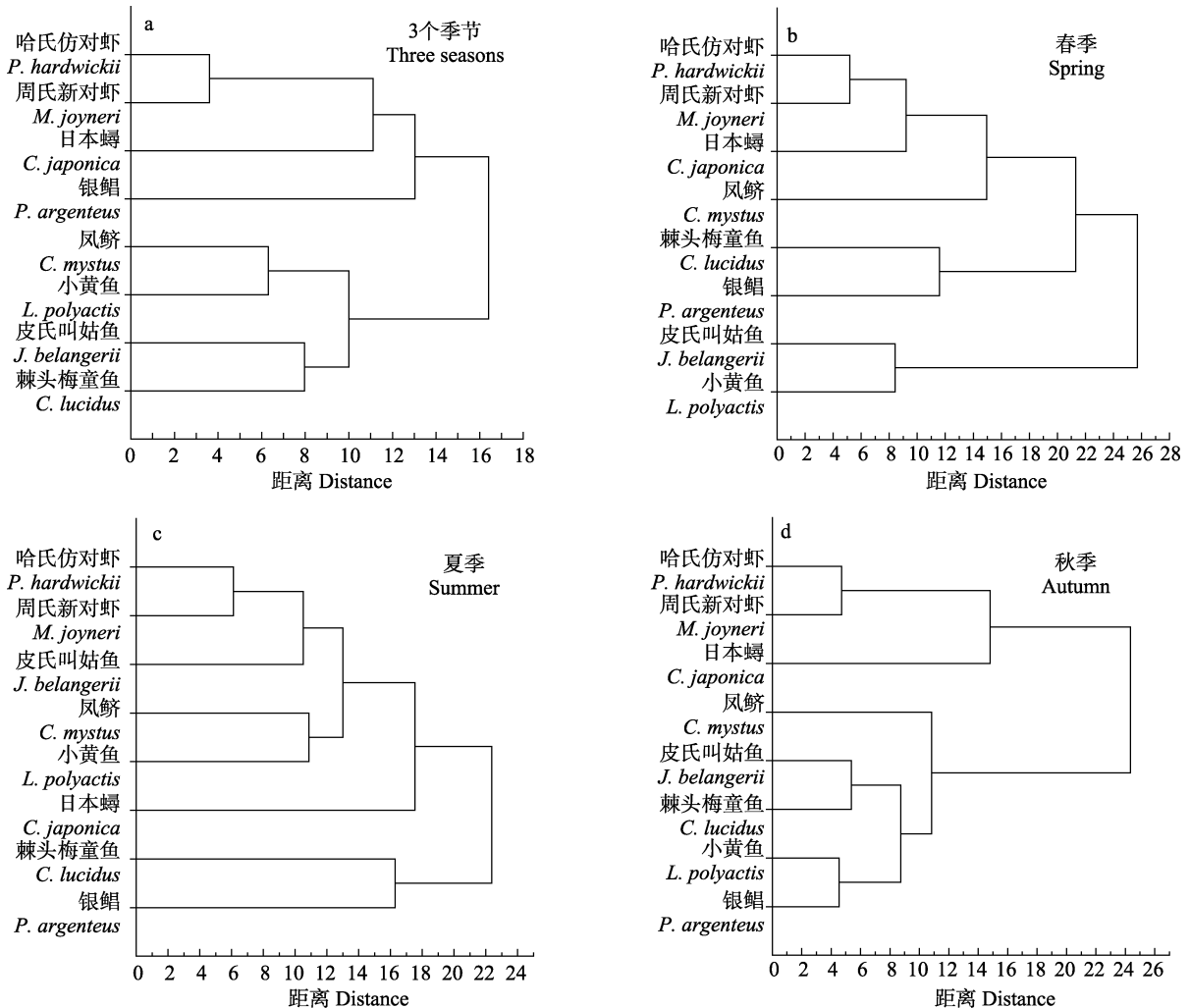


图 3 3 个季节(a)、春季(b)、夏季(c)、秋季(d)主要渔获物脂肪酸聚类分析

Fig.3 Fatty acid clustering analysis of main catches in three seasons (a), spring (b), summer (c) and autumn (d)

梅童鱼、小黄鱼和银鲳为另一组。

3 讨论

3.1 脂肪酸组成及季节差异

海洋被称作“蓝色粮仓”，一直以来都是人类重要的食物来源之一，海洋生物向人类膳食提供了近 17% 的动物蛋白，同时包括多种 PUFA，如 C18:2n6、C18:3n3、EPA 和 DHA 等，它们可以有效预防心血管疾病、炎症、癌症和神经退行性疾病等。其中，亚油酸和 α -亚麻酸又称必需脂肪酸，人类自身无法合成，只能通过膳食摄取(Wang *et al*, 2019)。PUFA 是美国食品药品监督管理局(FDA) GRAS (generally recognized as safe)认证的安全食品，美国心脏协会(AHA)推荐每天通过鱼油形式摄入 1 g n-3 PUFA，可以预防心血管类疾病，国际脂肪酸和脂类研究学会(ISSFAL)建议健康成年人每天至少摄入 0.5 g EPA+DHA，PUFA/SFA>0.4 为宜(Adkins *et al*, 2010)，人类日常膳食肉类 PUFA/SFA 值约为 0.1 (Ospina-E *et al*, 2012)。本研究渔获物 PUFA/SFA 皆分布于 0.88~1.79 之间，其中，比值较高为哈氏仿对虾(1.20)、周氏新对虾(1.20)、日本鳾(1.79)、棘头梅童鱼(1.08)和小黄鱼(1.11)。现代人类的饮食模式导致 n-6 过剩，而 n-3/n-6 比例失衡会改变下游通路细胞基因的表达和调控，从而影响到细胞膜的流动性和器官功能等，因此，n-3/n-6 值是评价脂肪质量的重要指标(Huynh *et al*, 2009)。主要渔获物中凤鲚、棘头梅童鱼和小黄鱼 n-3/n-6 值最高(>3)，因此，它们的脂肪质量比其他渔获物更优。

本研究结果显示，主要渔获物的 EPA+DHA、PUFA/SFA、n-3、n-3/n-6 秋季显著高于春、夏季，这与 Zlatanov 等(2007)水温较低时 n-3 含量较高的结论相符。因此，秋季鱼类比春、夏季鱼类具有更高的营养保健价值。

3.2 基于脂肪酸的营养关系研究

Dalsgaard 等(2003)在脂肪酸与食物网关系的研究中发现，DHA/EPA 值随营养级增大而增大，DHA/EPA 是指示营养级的良好标志物。本调查中，主要渔获物可分为 3 组，哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本鳾(DHA/EPA<2)为一组，皮氏叫姑鱼、凤鲚、棘头梅童鱼和小黄鱼(DHA/EPA 为 2~4)为一组，银鲳(DHA/EPA>4)为另一组。本研究结果与黄亮(2004)对南黄海主要鱼类食物网研究结果相符。研究表明，随着体长增大，鱼类食性范围逐渐扩大以满足不同阶段的营养需求(Lukoschek *et al*, 2001)，比较吕泗渔场主

要渔获物三季 DHA/EPA 发现，秋季显著高于春、夏季，推测由于经过春、夏两季生长，渔获物体型更加饱满，口裂增大，游泳能力更强，具备了捕食更大型饵料生物的能力，且饵料生物营养级升高，捕食者营养级也随之升高(张波等, 2016)，这也与任晓明等(2019)海州湾秋季鱼食性生物量大于春季，底栖动物食性生物量低于春季的结论一致。

聚类分析可将吕泗渔场主要渔获物分为 3 组，分别为哈氏仿对虾、周氏新对虾和日本鳾为一组，凤鲚、皮氏叫姑鱼、棘头梅童鱼和小黄鱼为一组，银鲳为另一组。春季分为 4 组，而夏、秋季皆为 3 组，推测可能是由于渔获物体型增大后摄食范围更广泛，因此，不同生物间的饵料生物重合增多，差异减小。

3.3 基于特征脂肪酸的食性研究

研究表明，C16:1n-7、EPA、EPA/DHA>1 可指示硅藻食性(金鑫, 2011)，C18: 4n-3、DHA、EPA/DHA<1 可以作为甲藻食性指标(Dalsgaard *et al*, 2003)， $\Sigma 15+\Sigma 17$ 和 C18:1n-7 可以反映细菌食性(Rajendran *et al*, 1993)，C20:1+C22:1 表示对浮游动物的摄食偏好(Kattner *et al*, 1998)，C18:1n-9 可以揭示褐藻食性(Johns *et al*, 1979)，C18:2n-6+C18:3n-3 和 $\Sigma 22+\Sigma 24$ 可指示陆生植物食性(Budge *et al*, 2001)，C18:2n-6+C18:3n-3 则是海草、大型藻类食性的标志物(Every *et al*, 2016)。较高的 C20:4n-6 则能指示底栖生物食性(Stowasser *et al*, 2009)，C18:1n-7/C18:1n-9 值<0.5 表示肉食性，反之则为植食性(Richoux, 2005)。

脂肪酸组成分析显示，日本鳾、棘头梅童鱼、银鲳 C18:1n9 较高(>14%)，褐藻食源更明显；哈氏仿对虾、银鲳 C18:2n-6+C18:3n-3 最高(>3%)，陆生植物食源明显，C18:2n-6+C18:3n-3 同时也指征了大型藻类和海草食源；凤鲚、小黄鱼、银鲳 C20:1+C22:1 较高(>3.8%)，浮游动物食性明显；较高的 C20:4n6 (>4.5%)指征了哈氏仿对虾、周氏新对虾、日本鳾皆具明显的底栖生物食性，这与黄美珍(2004)的研究结果一致。同时，哈氏仿对虾和日本鳾 $\Sigma 15+\Sigma 17$ 最高(>4.4%)，指征了细菌食源偏好；日本鳾硅藻食性显著高于鱼类，这与王春琳等(1998)硅藻类是日本鳾主要食物之一的结论一致，其他渔获物则具甲藻食源偏好(C20:5n-3/C22:6n-3<1)；由于 C18:1n-7 含量极低，远小于分析精度 0.01%，默认为 0，因此，C18:1n-7/C18:1n-9<0.5，反映各渔获物具肉食性。

总体上，渔获物夏季硅藻、细菌食源显著高于春、秋季，秋季底栖生物、甲藻、陆生植物食源显著增加，浮游动物食性显著减少。杨洋等(2016)研究表明，夏

季浮游植物以硅藻为主,春、秋季则以甲藻为主,因此,渔获物藻类食性转变可能是对藻类季节差异的响应。鱼类夏季细菌食性显著增加,推测主要源于间接摄食,如以细菌为食的饵料生物或碎屑物质等(金鑫, 2011),而秋季底栖生物食源显著增加,浮游动物食性显著降低,可能是由于秋季水温降低,浮游动物生物量随之下降(李晓慧等, 2017)。春、夏、秋 3 个季节各渔获物特征脂肪酸显著性差异检验结果显示,其中,日本鳀、银鲳性腺处于 V~VI 期,其他渔获物性腺处于 II~III 期,哈氏仿对虾的夏季细菌食源显著增加,而秋季浮游动物、大型藻类、海草食性显著减少,3 个季节皆偏好摄食甲藻。周氏新对虾秋季底栖生物、陆生植物食性显著增加,细菌食源显著减少,春夏偏好摄食硅藻,秋季偏好摄食甲藻。日本鳀秋季褐藻、大型藻类、海草食性显著增加,春季偏好摄食甲藻,夏秋偏好摄食硅藻。凤鲚秋季浮游动物食性显著减少。这与郭爱等(2014)凤鲚主要食源为浮游动物且秋季空胃率最高的结论一致。皮氏叫姑鱼春季硅藻食源显著增加,夏季浮游动物、细菌食源显著增加,因其不会直接摄食细菌,推测为间接摄食,秋季甲藻、陆生植物食源显著增加。棘头梅童鱼夏季大型藻类、海草食源显著减少,秋季甲藻、陆生植物、底栖生物食源显著增加。小黄鱼春季底栖生物食性显著减少,夏季浮游动物、细菌食源显著增加,但其不会直接取食细菌,推测为间接摄食,秋季甲藻、陆生植物食源显著增加,此结果也符合王凯等(2012)小黄鱼胃含物中藻类(%IRI=1.90)相对重要性指数百分比仅低于虾类(%IRI=95.4)。银鲳秋季食性显著转变,甲藻、陆生植物、底栖生物食性显著增加,这也与魏秀锦等(2018)银鲳为杂食性鱼类,饵料包括虾类、日本枪乌贼(*Loligo japonica*)、浮游植物、浮游动物等,其中,浮游植物占比 0~21.33%相符。

脂肪酸标记法是食性分析的重要手段,对传统食性分析中难以鉴定的藻类有较高的识别能力,但在特定生态系统中,不同生物可能具有相似的脂肪酸特征(崔莹, 2012),且生物食性转变是对多方面因素的响应,包括生物本身生长发育阶段、洄游特性、饵料生物群落季节变化、温度、盐度和人类活动等(刘鸿雁等, 2018)。因此,今后研究将结合胃含物 DNA 鉴定技术和脂肪酸标记法,深入探讨鱼类食性转变及其影响因素。

参 考 文 献

ADKINS Y, KELLEY D S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty

acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(9): 781-792

BUDGE S M, PARRISH C C, MCKENZIE C H. Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Marine Chemistry*, 2001, 76(4): 285-303

CUI Y. Study on the carbon flow within the estuarine ecosystem in China based on stable isotopes and fatty acid composition. Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2012 [崔莹. 基于稳定同位素和脂肪酸组成的中国近海生态系统物质流动研究. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2012]

DALSGAARD J, ST JOHN M, KATTNER G, *et al.* Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 2003, 46(6): 225-340

EVERY S L, PETHYBRIDGE H R, CROOK D A, *et al.* Comparison of fin and muscle tissues for analysis of signature fatty acids in tropical euryhaline sharks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, 479: 46-53

FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509

GUO A, CHEN F, JIN H W, *et al.* Food composition and seasonal changes of *Coilia mystus* in the East China Sea and Yellow Sea. *Marine Fisheries*, 2014, 36(5): 402-408 [郭爱, 陈峰, 金海卫, 等. 东、黄海凤鲚的食物组成及其食性的季节变化. *海洋渔业*, 2014, 36(5): 402-408]

HANG M Z. Study on feeding habits and nutrient level of shrimp species from Taiwan Strait and its adjacent sea areas. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2004(4): 481-488 [黄美珍. 台湾海峡及邻近海域 6 种对虾食性特征及其营养级研究. *台湾海峡*, 2004(4): 481-488]

HUANG L. Carbon, nitrogen and phosphorus compositions and fatty acid compositions of the main organisms in the food web based on anchovy in the Yellow Sea. Master's Thesis of East China Normal University, 2004 [黄亮. 黄海以鳀鱼为基础食物网中主要生物的碳、氮和磷三元素组成及脂肪酸组成特征. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2004]

HUYNH M D, KITTS D D. Evaluating nutritional quality of Pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chemistry*, 2009, 114(3): 912-918

IVERSON S J, FIELD C, BOWEN W D, *et al.* Quantitative fatty acid signature analysis: A new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs*, 2004, 74(2): 211-235

JIN X. Plankton food web analysis of the East China Sea and Yellow Sea using analyses of fatty acids and stable isotopes. Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2011 [金鑫. 黄东海浮游食物网的初步研究: 基于脂肪酸标记法和碳氮稳定同位素比值法. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2011]

- JOHNS R B, NICHOLS P D, PERRY G J. Fatty acid composition of ten marine algae from Australian waters. *Phytochemistry*, 1979, 18(5): 799–802
- KATTNER G, HAGEN W, GRAEVE M, *et al.* Exceptional lipids and fatty acids in the pteropod *Clione limacina* (Gastropoda) from both polar oceans. *Marine Chemistry*, 1998, 61(3/4): 219–228
- LI X H, LIU Z S. Biomass distribution and seasonal variation of zooplankton in the Changjiang estuary and its adjacent waters. *Journal of Marine Sciences*, 2017, 35(4): 94–101 [李晓慧, 刘镇盛. 长江口及邻近海域浮游动物生物量分布及季节变化. *海洋学研究*, 2017, 35(4): 94–101]
- LIU H Y, SUN T T, ZENG X Q, *et al.* Feeding ecology of *Conger myriaster* and structure of the food webs in artificial reef zone, Laoshan Bay, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(4): 1339–1351 [刘鸿雁, 孙彤彤, 曾晓起, 等. 崂山湾人工鱼礁区星康吉鳗摄食生态及食物网结构. *应用生态学报*, 2018, 29(4): 1339–1351]
- LIU L Y, LIU P T, CHEN Y S, *et al.* Integrated assessment of eco-environmental quality of Lüsi fishing ground. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 83–87 [刘绿叶, 刘培廷, 陈玉生, 等. 应用综合评价法研究江苏吕四渔场生态环境质量. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 83–87]
- LUKOSCHEK V, MCCORMICK M I. Ontogeny of diet changes in a tropical benthic carnivorous fish, *Parupeneus barberinus* (Mullidae): Relationship between foraging behaviour, habitat use, jaw size, and prey selection. *Marine Biology* (Berlin), 2001, 138(6): 1099–1113
- OSPINA-E JC, SIERRA-C A, OCHOA O, *et al.* Substitution of saturated fat in processed meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(2): 113–122
- RAJENDRAN N, SUWA Y, URUSHIGAWA Y. Distribution of phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay, Japan. *Marine Chemistry*, 1993, 42(1): 39–56
- REN X M, XU B D, ZHANG C L, *et al.* The composition of and variations in the trophic guilds of fish assemblages in Haizhou Bay and adjacent waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 141–150 [任晓明, 徐宾铎, 张崇良, 等. 海州湾及邻近海域鱼类群落的营养功能群及其动态变化. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 141–150]
- RICHOUX N B. Seasonal and developmental variation in the fatty acid composition of *Mysis mixta* (Mysidacea) and *Acanthostephea malmgreni* (Amphipoda) from the hyperbenthos of a cold-ocean environment (Conception Bay, Newfoundland). *Journal of Plankton Research*, 2005, 27(8): 719–733
- SHEN Y N, ZHANG B, JIANG S, *et al.* Feeding differentiation of pearl oysters (*Pinctada fucata*) in different habitats based on fatty acid biomarkers. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 27–33 [沈亚男, 张博, 姜松, 等. 基于脂肪酸标志法的不同海区合浦珠母贝的摄食差异研究. *南方水产科学*, 2015, 11(6): 27–33]
- SONG J J, WANG Q X, ZHOU J, *et al.* Analysis of aquatic aquaculture and fisheries capture changes of the Yellow Sea. *Ocean Development and Management*, 2017, 34(S2): 148–153 [宋静静, 王其翔, 周健, 等. 黄海区域海水养殖与海洋捕捞变化特征分析(1990–2015年). *海洋开发与管理*, 2017, 34(S2): 148–153]
- STOWASSER G, POND D W, COLLINS M A. Using fatty acid analysis to elucidate the feeding habits of Southern Ocean mesopelagic fish. *Marine Biology*, 2009, 156(11): 2289–2302
- TIAN F G, XU Z L. Ecological characters of zooplankton in middle area of Subei Shoal in spring and summer. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(3): 316–320 [田丰歌, 徐兆礼. 春夏季苏北浅滩大丰水域浮游动物生态特征. *海洋环境科学*, 2011, 30(3): 316–320]
- WANG C L, XUE L Y, LIU F Y, *et al.* A preliminary study on the experimental ecology and feeding habits of Japanese stone crab. *Shandong Fisheries*, 1998(3): 18–20 [王春琳, 薛良义, 刘凤燕, 等. 日本蟳实验生态及摄食习性的初步研究. *齐鲁渔业*, 1998(3): 18–20]
- WANG K, ZHANG S Y, WANG Z H, *et al.* Feeding habits of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) off Ma'an archipelago. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(6): 1188–1192 [王凯, 章守宇, 汪振华, 等. 马鞍列岛海域小黄鱼的食性. *水生生物学报*, 2012, 36(6): 1188–1192]
- WEI X J, ZHANG B, SHAN X J, *et al.* Trophic levels and feeding habits of silver pomfret *Pampus argenteus* in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 904–913 [魏秀锦, 张波, 单秀娟, 等. 渤海银鲈的营养级及摄食习性. *中国水产科学*, 2019, 26(5): 904–913]
- XU J, CHEN J J, XU Z L. Relationship of shrimp distribution with environment in the coastal water of Lüsi fishing ground in spring and summer. *Periodical of Ocean University of China (Science Edition)*, 2016, 46(3): 41–49 [徐捷, 陈佳杰, 徐兆礼. 吕泗渔场沿岸海域的虾类数量分布及其与环境的关系. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(3): 41–49]
- YANG Y, SUN X X. Seasonal variations of net phytoplankton in carbon biomass and community structure in the South Yellow Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(5): 954–962 [杨洋, 孙晓霞. 南黄海网采浮游植物碳含量及群落结构的季节变化. *海洋与湖沼*, 2016, 47(5): 954–962]
- YU W W, LIU P T, GAO Y S, *et al.* Distribution characteristics of zooplankton in national aquatic germplasm conservation area in Lüsi fishing ground of East China in spring and summer. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(10): 2744–2749 [于雯雯, 刘培廷, 高银生, 等. 春夏季吕泗渔场水产种质资源保护区浮游动物分布特征. *生态学杂志*, 2013, 32(10): 2744–2749]
- ZHANG B, YUAN W, DAI F Q. 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嵊山湾夏季鱼类群落的摄食生态. *水产学报*, 2016, 40(4): 585–594]

ZHANG T T, XU J, WANG Y M, *et al.* Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids. *Progress*

in *Lipid Research*, 2019, 75: 100997

ZLATANOS S, LASKARIDIS K. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry*, 2007, 103(3): 725–728

(编辑 冯小花)

Fatty Acid Composition and Feeding Habits Analysis of the Main Catches from Lüsi Fishing Ground during Spring, Summer and Autumn

CHEN Shixuan^{1#}, YU Wenwen^{2#}, ZHANG Hu², ZHANG Shuo^{1,3①}

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

2. Jiangsu Research Institute of Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu 226007, China;

3. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Shanghai 201306, China)

Abstract In order to explore the nutritional value, feeding habits and seasonal changes in the main catches from Lüsi fishing ground, we measured fatty acid composition of the main catches collected through a fishery resources survey in May 2018, August 2018, and October 2018. We analyzed feeding habits based on fatty acid biomarkers. The results of the eight main catches showed that the value for PUFA/SFA was 0.88~1.79 and that for n-3/n-6 was 2.56~3.18. C16:1n7, $\Sigma 15+\Sigma 17$ increased significantly in summer ($P<0.05$). The EPA+DHA, PUFA/SFA, n-3/n-6, C20:4n6, C22:6n3, and $\Sigma 22+\Sigma 24$ increased and C20:1+C22:1 decreased significantly in autumn ($P<0.05$). Previous studies have shown that the nutritional value of each catch is high and was significantly higher in autumn than in spring and summer. The nutritional value of *Collichthys lucidus* and *Larimichthys polyactis* was the highest. DHA/EPA and cluster analysis divided the catches into three groups: *Parapenaeopsis hardwickii*, *Metapenaeus joyneri* and *Charybdis japonica*; *Coilia mystus*, *Johnius belangerii*, *C. lucidus* and *L. polyactis*; *Pampus argenteus*. *P. hardwickii*, *M. joyneri* and *C. japonica* preferred phytoplankton and benthos. *L. polyactis* and *C. mystus* preferred zooplankton. *P. argenteus* preferred phytoplankton and zooplankton. *C. lucidus* and *J. belangerii* had no obvious preferences. In general, food source on diatoms and bacteria increased significantly in summer. In autumn, food source significantly increased on benthos, dinoflagellates, and terrestrial plants and it decreased on zooplankton.

Key words Fatty acid; Nutritional value; Feeding habits; Season; Catches; Lüsi fishing ground

① Corresponding author: ZHANG Shuo, E-mail: s-zhang@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201217002

http://www.yykxjz.cn/

李乐洲, 王祖峰, 张东升, 雷兆霖, 张津源, 杨耿介, 王玉龙, 周玮. 不同管理方式对参池颗粒物沉降作用及沉积物的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 29–38

LI L Z, WANG Z F, ZHANG D S, LEI Z L, ZHANG J Y, YANG G J, WANG Y L, ZHOU W. Influence of different management methods on the sedimentation of particulate matter and sediment in sea cucumber ponds. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 29–38

不同管理方式对参池颗粒物 沉降作用及沉积物的影响*



李乐洲¹ 王祖峰² 张东升¹ 雷兆霖¹ 张津源¹
杨耿介¹ 王玉龙¹ 周玮^{1①}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 2. 全国水产技术推广总站 中国水产学会 北京 100125)

摘要 为探究不同管理方式对刺参养殖池塘(简称参池)沉降颗粒物及相关底泥、水体指标的影响,分别测定 9 口参池(分为养水机、自然纳潮、微孔曝气 3 组参池,每组 3 个重复)颗粒物在四季的平均沉降量和水平空间分布情况,底泥有机质含量和弧菌(*Vibrio*)总数,水体营养盐含量、浮游植物生物量和净初级生产力。结果显示,自然纳潮和微孔曝气池塘颗粒物平均沉降量的季节、水平分布均无显著差异($P>0.05$);养水机池塘颗粒物平均沉降量在夏季为 (30.33 ± 2.46) g/(m²·d),极显著高于另外 2 组参池($P<0.01$),在冬季为 (7.49 ± 1.17) g/(m²·d),显著低于另外 2 组参池($P<0.05$);在水平分布上,养水机池塘沉降颗粒物的分布较另外 2 组参池更均匀;在相同季节,养水机池塘底泥有机质含量和弧菌总数均处于 3 组参池的最低水平,微孔曝气池塘总体次之,自然纳潮池塘总体最高;3 组参池的水体营养盐含量接近,而养水机池塘浮游植物生物量、净初级生产力均处于 3 组参池中最高水平,微孔曝气池塘总体次之,自然纳潮池塘总体最低。本研究表明,传统海参养殖在自然纳潮换水管理基础上,辅助适宜设备能够影响颗粒物的沉降规律,加快参池底泥-水体之间营养物质交换,改善水底养殖环境。

关键词 仿刺参; 颗粒沉降量; 水平分布; 养水机

中图分类号 S967.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0029-10

水体沉降颗粒物在不投饵刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘中具有重要的生态功能,其来源于参池水体,经水流的运输降至池底,既是刺参的重要天然饵料,又是构成沉积物的物质来源(Boyd, 2004; 赵文等, 2009)。沉降颗粒过少,刺参摄食需求受限,

会影响养殖效果,但沉降颗粒在池底堆积,会造成池塘“老水”、致病菌增多等有害现象发生,严重时甚至造成刺参死亡(郑忠明, 2009; 皮坤等, 2015; Callender *et al*, 1982)。参池不同于海洋和大型湖泊,通常深度较浅且封闭,底泥易在风浪、换水和潮汐等

* 辽宁省科学计划(2018104009)、辽宁省“兴辽英才”项目(XLYC1808029)和大连市第二批领军人才项目共同资助 [This work was supported by Scientific Scheme of Liaoning Province (2018104009), “Xing Liao Ying Cai” Project of Liaoning Province (XLYC1808029), and Second Batch of Leading Talents in Dalian City]. 李乐洲, E-mail: m18004267192@163.com

① 通讯作者: 周玮, 教授, E-mail: zhouwei@dliou.edu.cn

收稿日期: 2020-12-17, 收修改稿日期: 2021-01-08

扰动作用下形成再悬浮,后经矿化、降解等作用释放到水体,适量的有机转化在促进水中生物生长的同时,降低了底质环境压力,但过量的转化会引起水体富营养化(Yahel *et al*, 2008; 舒廷飞等, 2002; 乔延龙等, 2019)。因此,沉降颗粒物的科学调控对于刺参养殖起着至关重要的作用。

海参池塘养殖中,传统的纳潮换水作业是水质管理的主要方式。纳潮换水的频率和换水量一方面能够实现水质更新,另一方面能够减少沉降颗粒在池底的积累(卢超超等, 2014),但换水作业影响有限,无法将多余的沉降颗粒物排出。因此,在换水的基础上,寻求一种合理的方法处理多余的沉降颗粒物,对于养殖系统营养要素的循环具有积极意义。近年来,在纳潮换水的基础上,辅助微孔曝气增氧的参池管理方式得到了广泛推广(陈国海, 2018; 顾海涛等, 2017),该技术在提高水体溶氧的同时,会促进底泥中好氧微生物繁殖,增强沉积物酶活性,使有机化合物转化为浮游生物所利用的营养物质(徐皓等, 2017; 顾海涛等, 2017)。许宽等(2012)和凌芬等(2013)曾就河道底泥进行实验,发现曝气组底泥中有机氮的去除率较对照组高 5%,曝气组底泥中有机质较对照组低 35.1%,说明微孔曝气能加速底泥有害物质分解,并依靠物质流动的方式影响水域环境。

养水机是本团队研发的一款新型参池水质管理设备,相关研究证明(孙广伟等, 2020; 林青等, 2019; 王祖峰, 2016),该设备具有打破参池温、盐跃层(年最大温、盐差分别为 0.7℃、6.65)、提高溶氧含量(年平均溶氧为 8.39 mg/L)、提高养殖产量 30%等优势。但从颗粒物质沉降的角度,深入探讨养水机运行对参池环境的影响还未涉及。因此,本研究选择自然纳潮管理方式下的参池作为空白对照,并对配备微孔曝气增氧机和养水机设备的参池颗粒物质沉降量、沉降颗粒物的分布以及与沉降颗粒物相关的底泥和水体指标进行采集测定,旨在通过比较、分析不同参池管理方式的差异,探究参池管理新思路。

1 材料与方法

1.1 实验参池

参池选自大连市青堆子海域(39.78°N, 123.32°E)的宝发海珍品有限公司,养殖品种为仿刺参。将相邻且管理情况一致(不投饵、不投药、苗种密度规格一致)的 9 口参池分为 3 组,即养水机组、自然纳潮组和微孔曝气组,每组设 3 个重复。各参池均为矩形池塘(600 m×85 m×1.2~2 m),南深北浅,泥沙池底,进、

排水口分别位于池塘最南端和最北端。每月大潮后进行换水,冬季结冰后无换水,夏季除养水机池塘外均出现跃层现象。实验期间,各参池水温变化范围为 -2.1℃~27.5℃,盐度为 29.9~36.3, pH 值为 7.3~8.6,溶氧为 4.2~13.9 mg/L。

1.2 实验设备

养水机(专利号: ZL200610077526.5)由进水口吸入表层池水,经进水管和动力与净化装置,由专用喷头从底层水平喷出,其中动力与净化装置由机箱和生物滤料构成(图 1)。运行前,按使用说明接种商品 EM 菌;专用喷头动力为 750 W,出水量为 12 m³/h;微孔曝气设备属于面增氧设备,运行时产生上浮气泡,具体工作机理参考陈国海(2018)。养水机与微孔曝气设备均放置于各组参池池底的进水口处,养水机每日 21:00—次日 09:00 工作,冬季(12~2 月)工作 1 h;微孔曝气设备仅在参池缺氧时工作,冬季管道冻结无法工作。

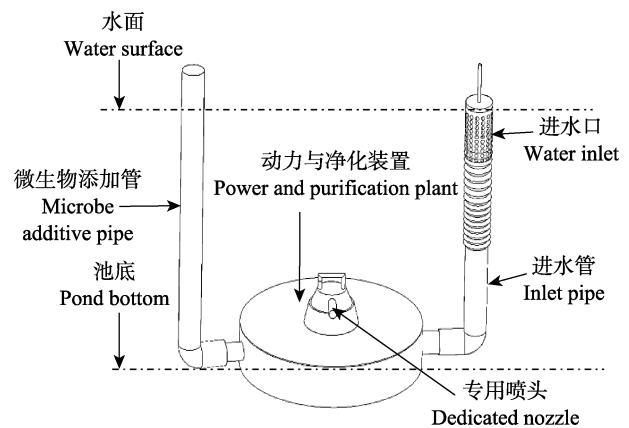


图 1 养水机模拟图

Fig.1 Simulation diagram of water quality regulator

1.3 样品采集

2015 年 10 月—2016 年 9 月,每月换水后 1 d,在各池中轴线的进水口、池塘中部、排水口底部分别放置沉降颗粒收集装置(图 2),收集沉降颗粒物样品,每点放置 3 个作为重复,6 d 后收回。收集装置由 PVC 圆柱管制成,高为 35 cm,直径为 11 cm,上端用尼龙网遮盖,防止大型水生动物进入,下端嵌套重物,防止漂浮(Takesue *et al*, 2009; Storlazzi *et al*, 2009; Whyte *et al*, 1990)。同时,用直径为 5 cm 的柱形采泥器采集各参池进水口、中部、排水口的表层(0~10 cm)泥样,用采水器采集各参池进水口、中部、排水口的表层、中层、底层 1 L 混合水体水样(泥样和水样每份均采集 3 个作为重复)。

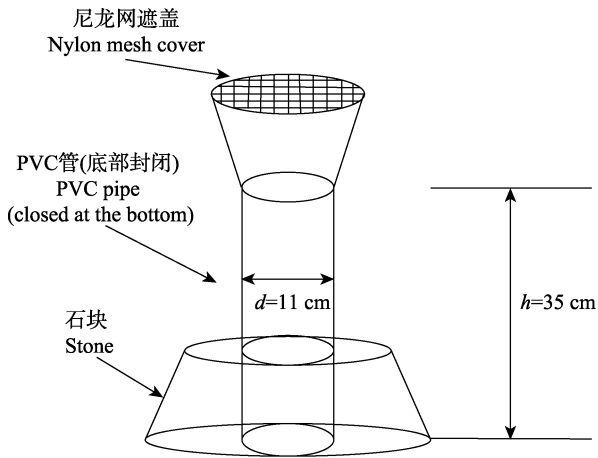


图 2 沉降颗粒物收集装置
Fig.2 Settled particles collection device

1.4 样品测定

分别同步测定 3 组参池的进水口、中部、排水口颗粒物质的沉降量, 以及底泥和水体中的相关指标, 泥样指标包含有机质含量、弧菌(*Vibrio*)数量, 水样指标包含“三氮一磷”[氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)、亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)和活性磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)]含量, 浮游植物生物量以及群落净初级生产力[数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示]。

1.4.1 颗粒物沉降量 回收的颗粒物静置 2 h 后, 利用虹吸法去除上清液, 将沉降颗粒物倒入培养皿, 转至烘箱, 在 60℃下烘干至恒重后研磨, 用电子天平称重之后, 装入密封袋在干燥器中保存。

各参池不同位置及平均沉降量按公式(1)、(2)计算:

$$Q_A = DW_A / (t \times A) \quad (1)$$

$$Q = (Q_A + Q_B + Q_C) / 3 \quad (2)$$

式中, 进水口、中部、排水口各位置的干质量和颗粒物沉降量分别记为 DW_A 、 DW_B 、 DW_C 和 Q_A 、 Q_B 、 Q_C , 池塘颗粒物月平均沉降量为 Q , t 为收集时间, A 为装置横截面积。

1.4.2 有机质含量和弧菌数量 采集的表层底泥去除杂质, 转至 60℃烘箱, 烘干后, 过 100 目筛并保存。有机质含量使用灼烧法测定(GB 17378.5-2007), 弧菌数量采用培养基法测定(TCBS培养基)。

1.4.3 营养盐浓度、浮游生物量及初级生产力 采集的混合水样, 经 0.45 μm 无菌滤膜过滤, 过滤后的水样中, $\text{NH}_4\text{-N}$ 使用次溴酸钠氧化法测定, $\text{NO}_2\text{-N}$ 使用锌铬还原法测定, $\text{NO}_3\text{-N}$ 使用萘乙二胺分光光度法测定, $\text{PO}_4\text{-P}$ 使用磷钼蓝分光光度法测定(GB/T 12763.4-2007); 采集的 1 瓶水样送至北京百迈客公司镜检以测定浮游生物量及种类组成; 净初级生产力采

用黑白瓶法测定。

1.5 数据处理与分析

使用 EXCEL2010 对 1.4 中各指标月数据按季节(春: 3—5 月、夏: 6—8 月、秋: 9—11 月、冬: 12—2 月)整理, 使用 SPSS 25.0 对整理后的数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和双变量相关性分析, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别作为显著差异水平和极显著差异水平。

2 结果

2.1 参池颗粒物平均沉降量的季节特征

分别按照四季变化测定 3 组参池的颗粒物平均沉降量(以下简称沉降量)(图 3)。从图 3 可以看出, 各参池沉降量在周年内均呈春、冬季低, 夏、秋季高的变化特征, 养水机池塘、自然纳潮池塘和微孔曝气池塘沉降量四季变化范围分别为 7.49~30.33、10.39~5.38、10.31~24.94 $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。统计分析表明, 在相同季节, 不同组别的参池沉降量具有不同差异水平。春、秋两季各组参池沉降量差异均不显著($P > 0.05$); 夏季养水机池塘沉降量显著高于另外 2 种参池($P < 0.01$), 且另外 2 种参池之间差异不显著($P > 0.05$); 冬季养水机池塘沉降量显著低于另外 2 种参池($P < 0.05$), 且另外 2 种参池之间差异不显著($P > 0.05$)。

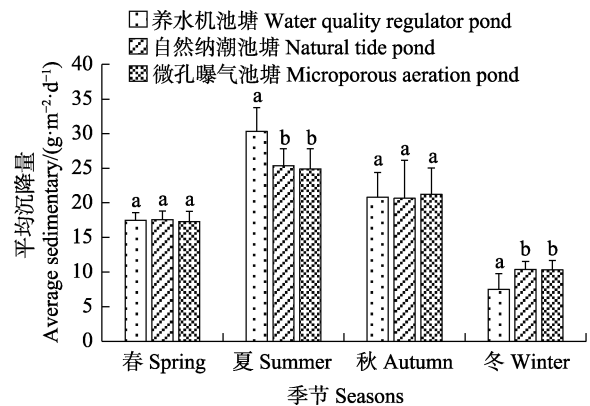


图 3 参池颗粒物平均沉降量的季节特征
Fig.3 Seasonal characteristics of average sedimentary in sea cucumber ponds

不同字母表示差异显著。下同
Different letters indicated significant different.
The same as below

2.2 参池颗粒物平均沉降量的水平分布特征

分别按照四季变化测定 3 组参池进水口、中部、排水口的颗粒物平均沉降量, 如图 4 所示。结果显

示,除夏季外,养水机池塘沉降量在水平方向上呈进水口≈中部≈排水口分布特征;除冬季外,自然纳潮与微孔曝气池塘颗粒物沉降量在水平方向上均呈进水口>中部≈排水口的分布特征。养水机池塘、自然纳潮池塘、微孔曝气池塘进水口沉降量变化范围分别为7.36~38.79、10.66~47.04、8.19~48.69 g/(m²·d),中部沉降量变化范围分别为8.98~36.21、10.30~17.56、11.81~18.13 g/(m²·d),排水口沉降量变化范围分别为6.13~15.99、9.67~11.54、9.14~10.94 g/(m²·d)。在相同季节,养水机池塘进水口沉降量均低于另外

2组参池,中部、排水口均高于另外2组参池。统计分析表明,各参池沉降量在不同水平位置上具有不同差异水平。除夏季外,在相同季节,养水机池塘各处沉降量差异不显著($P>0.05$);夏季养水机池塘排水口沉降量显著低于进水口和中部($P<0.05$);在春、夏、秋三季,自然纳潮和微孔曝气池塘进水口沉降量均显著高于中部和排水口($P<0.05$);在相同季节,自然纳潮和微孔曝气池塘中部和排水口的沉降量差异均不显著($P>0.05$);在冬季,3组参池各处沉降量差异均不显著($P>0.05$)。

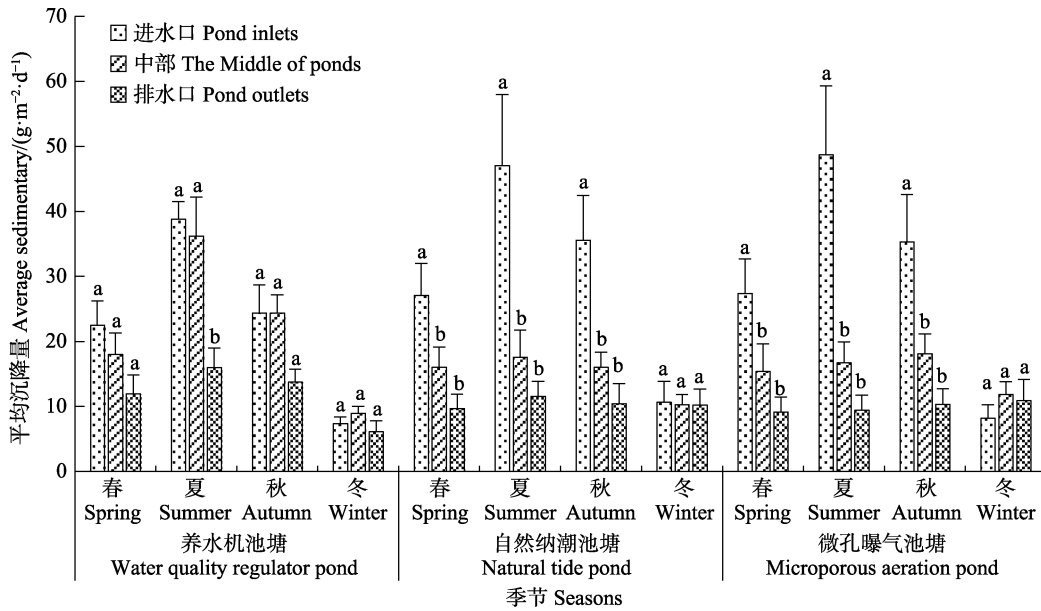


图4 参池颗粒物平均沉降量的水平分布特征

Fig.4 Horizontal distribution characteristics of average sedimentary in sea cucumber ponds

2.3 参池底泥中沉降量相关指标的季节变化

分别按照四季变化测定各组参池底泥中有机质含量和弧菌数量(表1、表2)。从表1和表2可以看出,在相同季节,养水机池塘有机质含量、弧菌数量总体上均为最低,微孔曝气池塘次之,自然纳潮池塘最高,但秋季养水机和自然纳潮池塘弧菌数量接近,微孔曝气池塘最高。统计分析表明,在相同

季节,养水机池塘有机质含量均显著低于自然纳潮池塘($P<0.05$),而与微孔曝气池塘差异不显著($P>0.05$);自然纳潮池塘有机质含量在夏季显著高于微孔曝气池塘($P<0.05$),在其余季节与微孔曝气池塘差异不显著($P>0.05$);自然纳潮池塘弧菌数量在春、夏季显著高于另外2组参池($P<0.05$),而另外2组参池差异不显著($P>0.05$);秋、冬季3组参池弧菌数量差异不显著($P>0.05$)。

表1 参池底泥有机质含量的季节变化

Tab.1 Seasonal variation of organic matter content in sea cucumber pond sediment/%

季节 Seasons	有机质含量 Organic matter content		
	养水机池塘 Water quality regulator pond	自然纳潮池塘 Natural tide pond	微孔曝气池塘 Microporous aeration pond
春 Spring	0.81±0.08	1.19±0.15	1.02±0.17
夏 Summer	0.96±0.07	1.33±0.12	1.12±0.14
秋 Autumn	0.77±0.30	1.09±0.59	0.99±0.24
冬 Winter	0.81±0.05	1.19±0.02	0.97±0.05

表2 参池底泥弧菌数量的季节变化

Tab.2 Seasonal variation of the *Vibrio* bacteria number in sea cucumber pond sediment/(CFU·mL⁻¹)

季节 Seasons	弧菌总数 Total <i>Vibrio</i> bacteria number		
	养水机池塘 Water quality regulator pond	自然纳潮池塘 Natural tide pond	微孔曝气池塘 Microporous aeration pond
春 Spring	1253.33±1225.47	3103.67±1965.69	1339.56±1329.68
夏 Summer	683.33±645.78	1648.67±1202.48	845.00±923.53
秋 Autumn	993.50±157.06	989.07±698.24	1152.67±449.59
冬 Winter	301.67±475.01	391.50±229.75	324.67±324.87

2.4 参池水体中沉降量相关指标的季节变化

分别按照四季变化测定各参池水体中 NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、PO₄-P、浮游植物生物量和净初级生产力(表3、表4)。“三氮一磷”含量(表3)结果显示,在相同季节,养水机池塘水体 NH₄-N 浓度均为最低,NO₃-N 浓度在春、夏、冬三季为最低,而秋季浓度介于另外2组参池之间,NO₂-N、PO₄-P 浓度与另外2组参池近似。浮游植物生物量和净初级生产力(表4)结果显示,在相同季节,养水机池塘浮游植物生物量和净初级生产力均为最高,微孔曝气池塘次之,自然池塘最低。统计分析表明,在相同季节,各参池水体氮、磷营养盐浓度均无显著差异($P>0.05$);养水机池塘夏季浮游植物生物量显著高于另外2组参池($P<0.05$),其余季节与另外2组参池差异不显著($P>0.05$);在相同季节,自然纳潮与微孔曝气池塘浮游植物生物量无显著差异($P>0.05$);养水机池塘春、夏、秋季净初级生产力显著高于自然纳潮池塘($P<0.05$),而

与微孔曝气池塘差异不显著($P>0.05$);自然纳潮池塘春季净初级生产力显著低于微孔曝气池塘($P<0.05$),而夏、秋季与微孔曝气池塘差异不显著($P>0.05$);冬季3组参池净初级生产力均为差异不显著($P>0.05$)。

2.5 参池颗粒物平均沉降量与各指标的相关分析

各组参池中颗粒物平均沉降量与各指标的相关性见表5。各参池颗粒物平均沉降量均与 NO₃-N 呈负相关,与其他指标均呈正相关。养水机池塘颗粒物平均沉降量与 NO₂-N 呈显著正相关($P<0.05$),与浮游生物量、净初级生产力呈极显著正相关($P<0.01$),与 NO₃-N 呈极显著负相关($P<0.01$)。自然纳潮池塘颗粒物平均沉降量与 NO₂-N、浮游植物生物量呈极显著正相关($P<0.01$),与 NO₃-N 呈显著负相关($P<0.05$)。微孔曝气池塘颗粒物平均沉降量与 NO₂-N 呈显著正相关($P<0.05$),与浮游植物生物量、净初级生产力呈极显著正相关($P<0.01$),与 NO₃-N 呈极显著负相关($P<0.01$)。

表3 参池水体营养盐含量的季节变化

Tab.3 Seasonal variation of nutrient content in sea cucumber pond water/(mg·L⁻¹)

指标 Indexes	季节 Seasons	养水机池塘 Water quality regulator pond	自然纳潮池塘 Natural tide pond	微孔曝气池塘 Microporous aeration pond
氨氮 NH ₄ -N	春 Spring	0.32±0.06	0.38±0.05	0.34±0.04
	夏 Summer	0.19±0.08	0.23±0.07	0.23±0.09
	秋 Autumn	0.12±0.08	0.18±0.09	0.14±0.07
	冬 Winter	0.16±0.05	0.19±0.05	0.20±0.06
亚硝酸盐 NO ₂ -N	春 Spring	0	0.01±0	0
	夏 Summer	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
	秋 Autumn	0.01±0	0.01±0	0.01±0
	冬 Winter	0	0	0
硝酸盐 NO ₃ -P	春 Spring	0.34±0.08	0.37±0.09	0.35±0.09
	夏 Summer	0.29±0.11	0.35±0.10	0.30±0.14
	秋 Autumn	0.29±0.03	0.34±0.03	0.28±0.02
	冬 Winter	0.42±0.08	0.50±0.15	0.51±0.20
活性磷酸盐 PO ₄ -P	春 Spring	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
	夏 Summer	0.03±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01
	秋 Autumn	0.02±0	0.02±0	0.02±0
	冬 Winter	0.02±0	0.02±0	0.02±0

表4 参池水体浮游植物生物量和净初级生产力的季节变化

Tab.4 Seasonal variation of phytoplankton biomass, and net primary productivity in sea cucumber pond water

指标 Indexes	季节 Seasons	养水机池塘 Water quality regulator pond	自然纳潮池塘 Natural tide pond	微孔曝气池塘 Microporous aeration pond
浮游植物生物量 Phytoplankton biomass/ (mg·L ⁻¹)	春 Spring	9.96±2.12	7.65±1.73	8.12±2.02
	夏 Summer	31.50±9.34	26.78±9.22	27.68±8.66
	秋 Autumn	24.73±2.57	20.32±4.70	22.08±4.36
	冬 Winter	8.70±4.27	4.60±2.63	4.79±4.05
净初级生产力 Net primary productivity/ [gO ₂ ·(m ⁻² ·d ⁻¹)]	春 Spring	2.33±0.56	1.70±0.65	2.24±0.76
	夏 Summer	6.84±2.05	5.11±1.70	5.74±1.85
	秋 Autumn	3.56±1.45	2.20±0.84	2.86±1.40
	冬 Winter	0.87±0.43	0.57±0.32	0.60±0.16

表5 参池平均沉降量与各指标的相关性

Tab.5 The correlation between the average sedimentary and other indicators in sea cucumber ponds

项目 Items	养水机池塘 Water quality regulator pond	自然池塘 Natural pond	微孔曝气池塘 Microporous aeration pond
有机质含量 Organic matter content	0.681	0.401	0.778
弧菌总数 Total <i>Vibrio</i> bacteria number	0.353	0.338	0.544
氨氮 NH ₄ -N	0.004	0.045	-0.085
亚硝酸盐 NO ₂ -N	0.805*	0.973**	0.857*
硝酸盐 NO ₃ -N	-0.912**	-0.896*	-0.931**
活性磷酸盐 PO ₄ -P	0.593	0.029	0.692
浮游植物生物量 Phytoplankton biomass	0.899**	0.929**	0.938**
净初级生产力 Net primary productivity	0.973**	0.923**	0.939**

注：*表示在 0.05 水平显著相关，**表示在 0.01 水平极显著相关

Note: * indicates correlation at the 0.05 level, and ** indicates correlation at the 0.01 level

3 讨论

本研究各组颗粒物平均沉降量均呈春、冬季低，夏、秋季高的变化特征，变化范围为 7.49~25.38 g/(m²·d)，与任贻超(2012)、赵文等(2009)的研究结果吻合。在自然情况下，参池中颗粒物沉降量呈“沿程衰减”的水平分布趋势，与史鹏程等(2020)、朱晓磊等(2016)的研究结果吻合。根据各组参池的换水条件一致，纳潮带入各池内的外源性颗粒物数量近似相同的实验条件，分析 3 种管理方式下池塘颗粒物平均沉降量的季节及水平分布差异，发现其差异主要由各组参池的内源性颗粒物数量差异引起。

3.1 参池中颗粒物沉降量的季节变化

比较不同组别之间的沉降量，养水机池塘夏季极显著高于另外 2 组参池($P<0.01$)，冬季显著低于另外 2 组参池($P<0.05$)，自然纳潮池塘与微孔曝气池塘颗粒物平均沉降量差异不显著($P>0.05$)。因此，认为养水机池塘夏季差异主要源于底泥-水体之间物质交

换能力的不同，而冬季差异主要源于颗粒物自身性质的不同。

夏季养水机池塘显著高于另外 2 组参池原因主要有 3 个方面。首先，在底泥再悬浮方面，皮坤等(2015)和于海波等(2013)观测发现，草鱼、对虾等游动会引起池塘底泥再悬浮，因此，推测养水机以 750 W 动力持续作用于池塘底部，其射出的水流扰动引起底泥的再悬浮是不可避免的。其次，在浮游植物生物量方面，养水机池塘夏季浮游植物生物量[(31.50±9.34) mg/L]为全年最高水平(表 4)，显著高于另外 2 组参池($P<0.05$)，浮游植物作为内源性颗粒物的重要组成部分，凋亡后沉至池底也会造成沉降量升高。另外，在水体分层方面，余真真等(2011)和张岩松等(2004)指出，水分层现象源于水体垂直交换能量的缺失，会抑制悬浮物质的沉降作用。养水机将上层低密度水抽至底层喷出形成强制对流的设计，在王祖峰(2016)等研究已验证其打破跃层的效果，因此，夏季池塘跃层出现期间，养水机运行可以提高沉降量。

冬季养水机池塘显著低于另外2组参池的原因:从影响夏季沉降量的3个方面看,首先养水机冬季运行时间从12 h/d减少到1 h/d(设备维护运行),对水体扰动显著降低,各参池底泥再悬浮能力近似相同;其次冬季参池中,浮游植物少、且3组参池无差异;另外冬季表、底层水体的垂直对流强烈(张玉荣等,2016)不具备水体分层条件。因此,上述3个方面内容不具备造成冬季沉降量差异的条件。但已有研究(虞兰兰等,2011;鲍献文等,2011;柴蓓蓓,2012)普遍认为,冬季颗粒物自身性质会显著影响其在池塘中的沉降过程。上述研究发现,冬季封冰后,沉积物中泥沙等无机颗粒显著减少,而以微生物残体的有机颗粒沉降为主。其特征是粒径较小、沉降速度慢、易受水流等扰动的影响,甚至形成反向输送。因此,认为冬季养水机1 h/d运行的水体扰动制约了浮游植物的沉降作用,可能是造成养水机池塘冬季沉降量降低的主要原因。

3.2 参池中颗粒物沉降的水平分布

比较不同组别之间的沉降颗粒物水平分布,自然纳潮和微孔曝气池塘沉降量总体均呈现“沿程衰减”的水平分布趋势,进水口沉降量与中部和排水口差异显著($P<0.05$),尤其表现在春、夏、秋三季(冬季因无换水,本文不做讨论);而养水机池塘沉降量分布均匀,各处沉降量差异不显著($P>0.05$),其成因与池塘换水和池塘内物质交换有关。

自然纳潮和微孔曝气池塘总体呈“沿程衰减”的水平分布特征的原因:任朝亮等(2014)研究发现,水体沉降颗粒物的分布情况与水体中悬浮物的分布直接相关,其中,悬浮物主要包括泥沙颗粒、浮游植物、有机碎屑等。各组参池在纳潮时,较大的泥沙颗粒受重力作用,在进水口先行沉降,较小的浮游植物、有机碎屑等虽然沉降较慢,但在静水条件下,悬浮物浓度将以进水口为中心,向周围区域辐射衰减分布,缓慢垂直沉降。在实验条件下,自然纳潮和微孔曝气池塘结束换水后,较好的静水条件为沉降颗粒物在进水口的辐射衰减分布和垂直沉降提供了优势条件。

养水机池塘总体上呈分布均匀特征的原因:首先,在外源性悬浮物扩散分布方面,本研究中的养水机以750 W的动力每天运行12 h,从进水口向出水口方向进行强制水体对流,打破了池塘结束换水后的静水条件,对较小的浮游植物、有机碎屑,甚至部分较大的泥沙颗粒形成了向出水口方向的输送,沉降颗粒物在水平混合作用下完成了垂直沉降过程。据前文所述,部分沉降颗粒物甚至出现再悬浮,移动后再沉降

的现象。其次,在内源性浮游植物繁殖方面,林青等(2019)调查发现,养水机扰动促进了不同位置底泥分解,释放出来的营养物质促进了浮游植物均匀生长。结合上文中养水机池塘夏季浮游植物生物量最高 $[(31.50\pm 9.34) \text{ mg/L}]$ 的结论,反映了养水机池塘中内源性浮游植物对沉降量的贡献。

至于养水机池塘夏季排水口处颗粒物沉降量与进水口、中部2处存在显著差异($P<0.05$),可能是由夏季换水量大、所含泥沙较多,而养水机的功率有限,产生的水体扰动无法影响大颗粒泥沙的先行沉降规律所致。

3.3 参池中颗粒沉降物的分解与营养循环

比较3种管理方式下沉积物相关指标发现,养水机池塘夏季沉降量虽最高,但夏季有机质含量 $[(0.96\pm 0.07)\%]$ 和弧菌数量 $[(683.33\pm 645.78) \text{ CFU/mL}]$ 均为最低,说明养水机管理方式既能促进颗粒物沉降,增加海参天然饵料,又能避免有机质的过量积累,防止弧菌引发的恶劣环境。究其原因如下:首先,养水机扰动作用促进有机质转化释放。根据Gale等(1994)的观点,再悬浮是底泥有机质向水体迁移释放的主要方式,养水机对底层水体的扰动为再悬浮创造了条件。根据党子乔(2017)对池塘沉积物-水界面的氮磷通量研究,养水机池塘全年均为正释放通量,且高于另外2组参池,而自然纳潮和微孔曝气池塘 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在7、8月甚至出现了负通量,说明养水机有助于底泥营养物质的有效释放。其次,生物包抑制弧菌繁殖,养水机的生物包中接种的异养菌随着工作水流释放到池底环境中,形成优势菌群,参与有机质降解(娄斯艺,2018),抑制弧菌繁殖。张敏(2017)研究也发现,养水机池塘异养菌年均数量(84736 CFU/mL)显著高于自然纳潮池塘(64602 CFU/mL)和微孔曝气池塘(70311 CFU/mL)异养菌年均数量。另外,高溶氧环境保障了有机质氧化反应的进行。王祖峰(2016)观测显示,养水机将表层高溶氧水体强制与底层水体交换,可有效解决底层水体缺氧问题,避免了弧菌的厌氧发酵。本研究在实验现场发现底泥不发黑、不臭的现象,也说明养水机池塘具有良好的底质环境。

在上述讨论的基础上,分析3组参池水体营养盐含量无显著差异($P>0.05$)(表4),发现养水机池塘尽管颗粒物沉降量最多,底泥有机质中有效释放的营养物质也未在营养盐层面形成积累,而是通过各季节较高的浮游植物生物量和净初级生产力水平的形式得到了表现。这与杨东方等(2007)和熊倩等(2015)的相关研究结论一致。氮、磷营养盐是浮游植物生长的必

需物质, 目前研究普遍认为(施沁璇等, 2021; 曲克明等, 2000)浮游植物生长最适 N/P 为 16 : 1 (Redfield 比), 越接近该比例, 越有利于浮游植物的生长。养水机、自然纳潮和微孔曝气池塘的 N/P 周年均值分别为 21.5、32.25 和 26.33, 养水机池塘 N/P 最接近 Redfield 比, 是浮游植物生长优势的关键因素, 与本研究, 养水机池塘中观测到的浮游植物生物量优势和在现场观察到大型水生植物和藻类被抑制的现象是一致的。

综上所述, 夏季养水机池塘颗粒物沉降量极显著高于另外 2 组参池, 其水平分布较另外 2 组参池更均匀。同时期底泥有机质含量、弧菌总数, 水体中营养盐含量, 浮游植物生物量、净初级生产力等指标, 表现出具有促进底泥-水体之间营养物质循环、改善池塘水质、提高生产力水平的优势。与实践上淤泥少、无杂草、少病害的现象一致。而微孔曝气组尽管与自然纳潮组没有表现出显著差异, 但在降低有机质积累、抑制弧菌、促进浮游植物生长、提高生产力等方面也表现出一定的优势, 作者认为实验中微孔曝气设备仅针对解决夏季缺氧的问题, 其运行方式和运行时间可能制约了参池水和底质的改良效果。因此推测, 在海参养殖池塘管理上, 辅助适宜的设备管理将成为产业技术研究新的领域; 另外, 从水体动力学角度开展池塘养殖系统相关研究, 可能给传统上偏重理化因子与生态系统相关性的研究带来新的理论突破。

参 考 文 献

- BAO X W, LI Z, WANG Y Z, *et al.* Sediment distribution features in the north Yellow Sea during summer and winter. *Journal of Sediment Research*, 2010(2): 48-56 [鲍献文, 李真, 王勇智, 等. 冬、夏季北黄海悬浮物分布特征. 泥沙研究, 2010(2): 48-56]
- BOYD C E, LIN W H. Bottom soils, sediment, and pond aquaculture. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004 [克劳德 E·博伊德(著), 林文辉(译). 池塘养殖底质. 广州: 广东科技出版社, 2004]
- CALLENDER E, HAMMOND D E. Nutrient exchange across the sediment-water interface in the Potomac River estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 1982, 15(4): 395-413
- CHAI B B. Pollutants flux on the sediments multi-phase interface in drinking water reservoir and pollution controlling technology. Doctoral Dissertation of Xi'an University of Architecture and Technology, 2012 [柴蓓蓓. 水源水库沉积物多相界面污染物迁移转化与污染控制研究. 西安建筑科技大学博士研究生学位论文, 2012]
- CHEN G H. Microporous aeration and oxygenation technology in pond culture. *Animals Breeding and Feed*, 2018(11): 43-44 [陈国海. 池塘养殖中微孔曝气增氧技术. 养殖与饲料, 2018(11): 43-44]
- DANG Z Q. The effect of three water quality control methods on the annual changes of N and P fluxes at the sediment-water interface of sea cucumber ponds. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2017 [党子乔. 三种水质调控方式对海参池塘沉积物-水界面 N、P 通量的周年变化影响. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- GALE P M, REDDY K R. Carbon flux between sediment and water column of a shallow, subtropical, hypereutrophic lake. *Journal of Environmental Quality*, 1994, 23(5): 965-972
- GU H T, LIU X G, HE Y P, *et al.* Performance and application effects of microporous aerators. *Fishery Modernization*, 2017, 44(3): 25-28 [顾海涛, 刘兴国, 何雅萍, 等. 微孔曝气式增氧机的性能及应用效果. 渔业现代化, 2017, 44(3): 25-28]
- LIN Q, ZHANG D S, WEI Y N, *et al.* Effects of three water quality regulation methods on phytoplankton population structure in a sea cucumber culture pond. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 566-572 [林青, 张东升, 魏亚南, 等. 3 种水质调控方式对刺参池塘浮游植物种群结构的影响. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 566-572]
- LING F, LIU B, WANG G X, *et al.* The role of aeration in reducing internal NH_4^+ -N release from polluted urban river channel. *Journal of Lake Science*, 2013, 25(1): 23-30 [凌芬, 刘波, 王国祥, 等. 曝气充氧对城市污染河道内源铵态氮释放的控制. 湖泊科学, 2013, 25(1): 23-30]
- LOU S Y. A preliminary study on the number and flora composition of heterotrophic bacteria in sea cucumber ponds under three water quality control methods. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 [娄斯艺. 三种水质调控方式下海参池塘异养菌数量及区系组成的初步研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LU C C, SUN Y J, GAO Q F, *et al.* Effects of different water exchange frequencies on the environments of the sediments in the sea cucumber culture pond. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014(4): 59-66 [卢超超, 孙永军, 高勤峰, 等. 不同换水频率对刺参养殖池塘底泥环境的影响. 海洋湖沼通报, 2014(4): 59-66]
- PI K, ZHANG M, LI G C, *et al.* Characteristics of nutrient in sedimentary particles in different aquaculture models ponds. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2015, 24(1): 143-148 [皮坤, 张敏, 李庚辰, 等. 不同养殖模式池塘沉降颗粒营养物质组成特征. 长江流域资源与环境, 2015, 24(1): 143-148]
- QIAO Y L, YIN X Y, XIAO G X, *et al.* Acute toxicity effects of suspended solids stress on *Fenneropenaeus chinensis* larvae. *Progress in Fisheries Science*, 2019, 40(3): 50-56 [乔延龙, 殷小亚, 肖广侠, 等. 悬浮物胁迫中国对虾幼体的急性毒性研究. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 50-56]
- QU K M, CHEN B J, YUAN Y X, *et al.* A preliminary study on influence of N and P on population constituent of planktonic diatoms in seawater. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(3): 445-448 [曲克明, 陈碧鹃, 袁有宪, 等. 氮磷营养盐影响海水浮游硅藻种群组成的初步研究. 应用生

- 态学报, 2000, 11(3): 445–448]
- REN C L, SONG J X, WANG Z, *et al.* Spatial distribution of organic matter and the correlational study of pollutions of Weihe River. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2014, 28(3): 123–128 [任朝亮, 宋进喜, 王珍, 等. 渭河底泥有机质的空间分布及与其他污染物相关性. *干旱区资源与环境*, 2014, 28(3): 123–128]
- REN Y C. Studies on the bio-deposition and related ecological effects in different polyculture mode of *Apostichopus japonicus* (Selenka) pond. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [任贻超. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)养殖池塘不同混养模式生物沉积作用及其生态效应. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- SHI P C, ZHU G W, YANG W B, *et al.* Spatial-temporal distribution of suspended solids and its sedimentation flux and nutrients effects in Xin'anjiang Reservoir, China. *Environmental Science*, 2020, 41(5): 2137–2148 [史鹏程, 朱广伟, 杨文斌, 等. 新安江水库悬浮颗粒物时空分布、沉降通量及其营养盐效应. *环境科学*, 2020, 41(5): 2137–2148]
- SHI Q X, HAO G J, YE T, *et al.* Research on eutrophication and its driving factors in reservoirs of the Quzhou area. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 18–28 [施沁璇, 郝贵杰, 叶霆, 等. 衢州地区渔业水域水库水体富营养化水平及驱动因子研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 18–28]
- SHU T F, WEN Y M, TANG Y T. Cycle and budget balance of nitrogen in the cultivated water. *Fisheries Science*, 2002(2): 30–34 [舒廷飞, 温琰茂, 汤叶涛. 养殖水环境中氮的循环与平衡. *水产科学*, 2002(2): 30–34]
- STORLAZZI C D, FIELD M E, BOTHNER M H, *et al.* Sedimentation processes in a coral reef embayment: Hanalei Bay, Kauai. *Marine Geology*, 2009, 264(3/4): 140–151
- SUN G W, ZHOU W, DANG Z Q, *et al.* Annual change of primary productivity in *Apostichopus japonicus* ponds by three water quality regulations. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 632–641 [孙广伟, 周玮, 党子乔, 等. 3种水质调控方式下刺参池塘初级生产力的周年变化. *水产学报*, 2020, 44(4): 632–641]
- TAKESUE R K, BOTHNER M H, REYNOLDS R L. Sources of land-derived runoff to a coral reef-fringed embayment identified using geochemical tracers in nearshore sediment traps. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2009, 85(3): 459–471
- WANG Z F. A comparative study of three water quality controlling technologies effected in *Apostichopus japonicus* pond-aquaculture. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 [王祖峰. 仿刺参养殖池塘三种水质控制技术效果的比较. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- WHYTE J N C, BOURNE N, HODGSON C A. Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture*, 1990, 86(1): 25–40
- XIONG Q, HUANG L C, YE S W, *et al.* The seasonal variations and spatial distribution of the primary productivities of phytoplankton in the Three Gorges Reservoir. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 853–860 [熊倩, 黄立成, 叶少文, 等. 三峡水库浮游植物初级生产力的季节变化与空间分布. *水生生物学报*, 2015, 39(5): 853–860]
- XU H, TIAN C F, LIU X G, *et al.* Comparative study on aeration mechanism and equipment performance of aquaculture ponds. *Fishery Modernization*, 2017, 44(4): 1–8 [徐皓, 田昌凤, 刘兴国, 等. 养殖池塘增氧机制与装备性能比较研究. *渔业现代化*, 2017, 44(4): 1–8]
- XU K, LIU B, WANG G X, *et al.* The effect on the variation process of internal nitrogen under aerating to the sediment condition of urban polluted river. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(12): 2935–2942 [许宽, 刘波, 王国祥, 等. 底泥曝气对城市污染河道内源氮变化过程的影响. *环境科学学报*, 2012, 32(12): 2935–2942]
- YAHIEL G, YAHIEL R, KATZ T, *et al.* Fish activity: A major mechanism for sediment resuspension and organic matter remineralization in coastal marine sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 2008, 372: 195–209
- YANG D F, CHEN S T, HU J, *et al.* Magnitude order of the effect of light, water temperature and nutrients on phytoplankton growth. *Marine Environmental Science*, 2007, 26(3): 201–207 [杨东方, 陈生涛, 胡均, 等. 光照、水温和营养盐对浮游植物生长重要影响大小的顺序. *海洋环境科学*, 2007, 26(3): 201–207]
- YU H B, GAO Q F, SUN Y J, *et al.* Dynamic change and circulation of nutrients in polyculture system of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(9): 25–32 [于海波, 高勤峰, 孙永军, 等. 刺参-对虾复合养殖系统主要营养盐动态变化及循环过程的研究. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(9): 25–32]
- YU L L, JIANG W S. Seasonal variations in the distribution of suspended fine particulate in the Yellow Sea and the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 474–481 [虞兰兰, 江文胜. 黄、东海悬浮细颗粒物浓度和粒径分布变化研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(4): 474–481]
- YU Z Z, WANG L L, DAI H C, *et al.* Study on the effect of water temperature stratification on vertical transport of suspended solids. *Journal of Sichuan University (Engineering Science)*, 2011, 43(1): 64–69 [余真真, 王玲玲, 戴会超, 等. 水温分层对水体中悬浮颗粒物垂向运输影响的研究. *四川大学学报(工程科学版)*, 2011, 43(1): 64–69]
- ZHANG M. The effect of three water quality control methods on the number of microorganisms and enzyme activities in the sea cucumber pond environment. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2017 [张敏. 三种水质调控方式对海参池塘环境中微生物数量及底泥酶活性的影响研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG Y R, DING Y P, LI T J, *et al.* Annual variations of chlorophyll *a* and primary productivity in the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 261–268 [张玉荣, 丁跃平, 李铁军, 等. 东海区叶绿素 *a* 和初级生产力季节变化特征. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1):

- 261–268]
- ZHANG Y S, ZHANG F J, GUO X W, *et al.* Vertical flux of the settling particulate matter in the water column of the Yellow Sea in summer. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(3): 230–238 [张岩松, 章飞军, 郭学武, 等. 黄海夏季水域沉降颗粒物垂直通量的研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 230–238]
- ZHAO W, ZHANG Y W, WEI J, *et al.* The structure of suspended particles and sedimentation in cultured ponds of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(11): 5749–5757 [赵文, 张义伟, 魏杰, 等. 刺参养殖池塘颗粒悬浮物结构及其沉积作用. *生态学报*, 2009, 29(11): 5749–5757]
- ZHENG Z M. Study on nutrient fluxes across sediment-water interface in sea cucumber culture ponds. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 [郑忠明. 刺参养殖池塘沉积物—水界面营养盐通量的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009]
- ZHU X L, ZHANG H, LEI P, *et al.* Historical distribution characteristics of major elements in Guanting Reservoir sediments. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(2): 442–449 [朱晓磊, 张洪, 雷沛, 等. 官厅水库沉积物中大量元素的历史分布特征. *环境科学学报*, 2016, 36(2): 442–449]

(编辑 马瑾艳)

Influence of Different Management Methods on the Sedimentation of Particulate Matter and Sediment in Sea Cucumber Ponds

LI Lezhou¹, WANG Zufeng², ZHANG Dongsheng¹, LEI Zhaolin¹, ZHANG Jinyuan¹,
YANG Gengjie¹, WANG Yulong¹, ZHOU Wei^{1①}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China;
2. National Fisheries Technology Promotion Station, Chinese Fisheries Society, Beijing 100125, China)

Abstract The aim of this study was to explore the effects of different management methods on the sedimentation of particulate matter, related sediments, and water quality indicators in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds. Nine sea cucumber culture ponds (divided into three groups: water quality regulator, natural tide, and microporous aeration) were used. The average sedimentary and horizontal distribution characteristics of particulate matter were measured in spring, summer, autumn and winter as well as the organic matter content of the mud, total number of *Vibrio*, nutrient concentrations in the water, phytoplankton biomass, and net primary productivity were analyzed. The results showed no significant difference in the seasonal and horizontal distribution of the average sediment concentrations between natural tide ponds and microporous aeration ponds. The average sediment concentrations in the water quality regulator ponds was (30.33 ± 2.46) g/(m²·d) in summer, which was significantly higher than in the other two types of ponds, while in winter it was (7.49 ± 1.17) g/(m²·d) and was significantly lower than in the other two types of ponds ($P < 0.05$). The horizontal distribution characteristics of the average sediment concentrations in the water quality regulator ponds were more than those of the other two groups of ponds. During the same season, the organic matter content, and the total number of *Vibrio* in the water quality regulator pond sediment were at the lowest level among the three groups, with the microporous aeration ponds being the second lowest, and the natural tide ponds being the highest. The results of this study show that traditional sea cucumber farming is based on the management of natural tides and auxiliary suitable equipment can affect the sedimentation rate of particulate matter, accelerate the exchange of nutrients between the bottom sediment and the water of the sea cucumber ponds, and improve the water and bottom sediment environment.

Key words *Apostichopus japonicus*; Sedimentary; Horizontal distribution; Water quality regulator

① Corresponding author: ZHOU Wei, E-mail: zhouwei@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191231004

http://www.yykxjz.cn/

安丹丹, 代应贵, 邹习俊. 基于 AFLP 分析的乌江四川裂腹鱼种群遗传结构及多样性研究. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 39-45

AN D D, DAI Y G, ZOU X J. AFLP analysis of genetic structure and diversity in population of *Schizothorax kolzovi* from the Wujiang River. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 39-45

基于 AFLP 分析的乌江四川裂腹鱼种群 遗传结构及多样性研究*



安丹丹¹ 代应贵^{1,2} 邹习俊¹

(1. 贵州大学动物科学学院 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学特种水产研究所 贵州 贵阳 550025)

摘要 本研究采用扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记技术,以筛选出的 7 对引物,对采自贵州乌江的 30 尾四川裂腹鱼(*Schizothorax kolzovi*)的遗传结构和多样性进行分析。结果显示,用 7 对引物获得的扩增片段数为 5~73,扩增片段长度范围为 69~500 bp,共检出扩增位点 856 个。其中,多态位点 796 个,占扩增总位点数的 92.99%。该种群含 30 个基因型,其观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei 多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)平均值分别为 1.933 6、1.338 8、0.212 2 和 0.338 7。个体之间遗传距离为 0.169 1~0.531 9,平均为 0.306 8。根据遗传距离,采用 UPGMA 法和 NJ 法得到了拓扑结构相似的 30 个个体的系统树,该系统树由 2 个分支组成。其中,个体 1 为一个分支,而其余 29 个个体聚为另一个分支。乌江四川裂腹鱼种群具有较丰富的遗传多样性。然而,受水电站建坝、河流污染和酷渔滥捕的影响,该种群分布区已缩小,种群数量减少,处于生态受威胁状态,需要开展对乌江四川裂腹鱼种群及种质资源的保护。

关键词 乌江; 四川裂腹鱼; 种群; AFLP; 遗传多样性

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0039-07

裂腹鱼类是原始鲃类随着青藏高原隆升而分化形成的一个自然类群,栖息于我国青藏高原及邻近地区的河流、湖泊(乐佩琦, 2000; 王绪祯等, 2016)。四川裂腹鱼(*Schizothorax kolzovi*)分布于我国长江水系金沙江、雅砻江和乌江上游以及珠江水系北盘江等(伍律, 1989; 乐佩琦, 2000)。

遗传多样性是指种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。遗传多样性是进化和适应的基础,种群遗传多样性或变异性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈强,其进化潜力也愈大(施立明, 1990)。生物种群遗传变异的大小与其进化速率成正

比,通过遗传多样性研究可以揭示物种或种群的进化历史,也能为进一步分析其进化潜力和未来命运提供资料(Soltis, 1991)。研究表明,气候变化、过度捕捞、生境破碎化、人为干扰等一系列因素可影响物种种群的遗传多样性,而种群遗传多样性的降低会影响其适合度,进而加剧物种局域灭绝的风险(Fourtune *et al*, 2016; Bertin *et al*, 2017)。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记是近年来发展起来的一种研究生物群体遗传多样性的技术,具有灵敏度高、重复性好、信息量丰富、不需要预先了解物种基因组序

* 国家自然科学基金(30760189; 30960297)资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30760189; 30960297)]. 安丹丹, E-mail: 2479277157@qq.com

① 通讯作者: 代应贵, 教授, E-mail: daiygui@163.com

收稿日期: 2019-12-31, 收修改稿日期: 2020-04-26

列信息以及呈孟德尔式和共显性遗传等优点(王伟继等, 2005; 叶宁等, 2017)。该技术用少量引物组合即可检测到大量多态位点, 获得丰富的遗传信息, 是研究基因组 DNA 变异的有效方法, 现已被广泛用于水生动物遗传多样性研究。Sharifi 等(2015)利用 7 对 AFLP 引物对波斯湾乌鲷(*Parastromateus niger*)进行了遗传多样性研究, 检测到阿巴斯港、布什尔港和阿巴丹沿海水域乌鲷群体多态性条带数占总条带数比例分别为 73.61%、91.30%和 84.78%。叶宁等(2017)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)引进群体与养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析中, 用筛选出的 7 对引物共计扩增了 90 个多态位点, 多态位点数占总位点数比例达 85.71%。

乌江位于贵州境内, 为长江上游右岸最大的支流, 河流落差大, 鱼类多样性丰富(史方, 2010)。四川裂腹鱼为乌江上游重要野生经济鱼类。迄今, 有关四川裂腹鱼的研究主要集中在对其生理生化特性、生物学特征、核型、基因克隆以及基于线粒体 DNA 测序的种群遗传多样性等方面(代应贵等, 2010; 张晓杰等, 2011; 李忠利等, 2015; He *et al.*, 2016; 何勇凤等, 2017; Dai *et al.*, 2018), 而采用 AFLP 分子标记基于全基因组信息的四川裂腹鱼种群遗传结构及多样性研究尚未见报道。本研究采用 AFLP 技术对乌江上游六冲河四川裂腹鱼种群进行遗传结构及多样性检测和分析, 旨在深入揭示其种群遗传多样性的现状, 为其种群保护以及种质资源的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2010 年于乌江上游支流六冲河赫章、大河、维新、金龙等采样点(图 1), 用刺网采集的四川裂腹鱼样品数分别为 7、8、10、5, 共计 30 尾。解剖取其背部肌肉样品, 用酒精固定, 带回实验室于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2 模板 DNA 提取

采用北京天根生化科技有限公司提供的动物组织 DNA 提取试剂盒及方法提取基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和纯度。用无菌双蒸水溶解, 4°C 保存备用。

1.3 AFLP 分析

AFLP 分析所用的接头和引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。AFLP 实验过程包括基因组 DNA 双酶切(*EcoR* I 和 *Mse* I)。酶切连接进一步进

行, 其连接产物用于后续的预扩增和选择性扩增反应。预扩增反应体系为 $25\ \mu\text{L}$, 含模板 DNA $2\ \mu\text{L}$, Pre-Amp Mix $1\ \mu\text{L}$, dNTPs $1\ \mu\text{L}$, $10\times\text{PCR buffer}$ $2.5\ \mu\text{L}$, *Taq* DNA polymerase $0.5\ \mu\text{L}$, H_2O $18\ \mu\text{L}$ 。离心数秒, 其 PCR 反应程序: 94°C 变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 复性 30 s, 72°C 延伸 80 s, 72°C 延伸 5 min, 循环 30 轮。经预扩增实验筛选出形成清晰条带的选择性扩增引物组合, 对 30 尾四川裂腹鱼个体进行选择扩增。将预扩增产物按 1:20 稀释, 作为选择性扩增反应的模板。选择性扩增反应体系为 $25\ \mu\text{L}$, 含预扩增稀释样品 $2\ \mu\text{L}$, $10\times\text{PCR buffer}$ $2.5\ \mu\text{L}$, dNTPs $0.5\ \mu\text{L}$, *EcoR* I 引物 $1\ \mu\text{L}$, *Mse* I 引物 $1\ \mu\text{L}$, *Taq* 酶 $0.5\ \mu\text{L}$, H_2O $17.5\ \mu\text{L}$ 。混匀, 离心数秒, PCR 反应程序: 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 80 s (每轮循环温度递减 0.7°C , 12 轮), 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 80 s, 循环 23 轮。PCR 产物 4°C 保存。

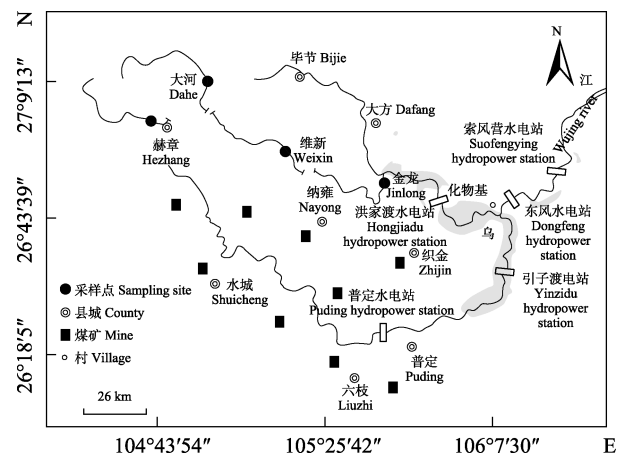


图 1 乌江四川裂腹鱼样品采集点

Fig.1 Map of the sampling sites for *S. kolzovi* in the Wujiang River

采用贝克曼库尔特公司 CEQ8000 遗传分析系统, 运用荧光标记技术和毛细管电泳分离技术, 使 PCR 产物在毛细管中电泳分离, 以激光激发荧光采集数据, 电泳结果通过软件自动统计分析并转换成“0、1”矩阵, 保存于 Excel 表格供数据处理。

1.4 数据处理及计算

用 Popgene 1.32 软件统计位点总数、多态位点数, 计算观测等位基因数(N_o)、有效等位基因数(N_e)、Nei 多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)和多态位点比例(PPL)等遗传参数。利用 NTSYS 2.10 软件计算个体间遗传相似性系数 S , 采用公式 $D=1-S$ 计算遗传距离, 并用 MEGA 6.0 软件基于遗传距离构建个体间的

UPGMA、NJ 系统树。

2 结果

2.1 不同 AFLP 引物组合的扩增结果

通过预扩增实验筛选, 获得了形成扩增条带丰富、图谱分布清晰的 7 对引物(表 1)。用该 7 对引物对 30 尾四川裂腹鱼基因组 DNA 进行选择性的扩增, 形成了条带清晰的电泳指纹图谱(图 2)。

在 30 尾四川裂腹鱼中, 用 7 对引物共计扩增到 856 个片段, 代表 856 个扩增位点。其中, 多态位点

为 796 个, 多态位点数占总位点数的比例为 92.99% (表 1)。该 7 对引物扩增的片段数在 5~73 之间, 片段长度为 69~500 bp, 总位点数为 84~155, 多态位点数为 83~141 个。以引物组合 E-AGG/M-CTA 扩增的多态位点最多, 达 155 个; 引物组合 E-AAC/M-CAC 扩增的多态位点最少, 仅 83 个。

由表 1 可知, 该群体中 7 对引物检出的基因型数与样本数相同, 均为 30, 即基于每对引物每个个体的扩增电泳图谱与其他个体都不相同, 表明 30 尾四川裂腹鱼个体之间在 DNA 序列上存在差异, 并且用每对引物均能检测出个体之间的遗传差异。

表 1 乌江四川裂腹鱼种群 7 对引物扩增片段多态性指标

Tab.1 Polymorphic indices of amplification fragment with 7 primer pairs for *S. kolzovi* population in the Wujiang River

引物组合 Primer pair	扩增片段数 Number of amplified fragment	扩增片段长度 Length of amplified fragment /bp	总位点数 Total number of loci	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点比例 Percentage of polymorphic loci /%	基因型数 Number of genotypes
E-AAC/M-CAC	5~39	70~447	84	83	98.81	30
E-AAG/M-CAG	14~55	69~498	95	89	93.68	30
E-AGC/M-CAA	41~70	71~460	134	122	91.04	30
E-AGC/M-CTG	12~69	71~492	136	129	94.85	30
E-AGG/M-CAC	16~68	72~499	124	117	94.35	30
E-AGG/M-CAG	19~66	69~498	128	115	89.84	30
E-AGG/M-CTA	42~73	70~500	155	141	90.97	30
总计 Total	-	-	856	796	92.99	30
平均值±标准差 Mean±SD	-	-	122±22	114±19	93±3	30

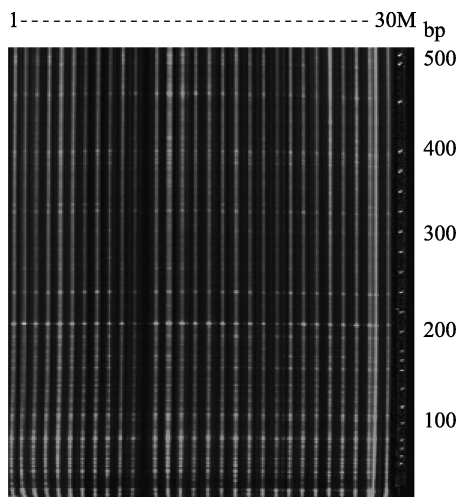


图 2 乌江四川裂腹鱼种群 AFLP 扩增结果
Fig.2 Results of AFLP amplification of *S. kolzovi* population from the Wujiang River

引物组合 E-AGG/M-CTA。1~30 表示样品编号;
M 为 DNA marker
Primer pair E-AGG/M-CTA. 1~30 represent sample numbers, and M represents DNA marker

2.2 乌江四川裂腹鱼种群的遗传多样性

基于 30 尾四川裂腹鱼扩增的 856 个 AFLP 位点, 计算了每个引物组合扩增的遗传多样性参数(表 2)。该 7 对引物对应的观测等位基因数(N_o)、有效等位基因数(N_e)、Nei 多样性指数(H)和 Shannon 信息指数(I)平均值分别为 1.933 6、1.338 8、0.212 2 和 0.338 7。

2.3 乌江四川裂腹鱼种群遗传结构及聚类分析

基于 7 对引物的扩增结果, 30 尾裂腹鱼个体之间的遗传距离为 0.169 1~0.531 9, 平均值为 0.306 8。

根据遗传距离构建的 30 尾四川裂腹鱼 NJ、UPGMA 系统树拓扑结构相似, 均由 2 个分支构成。其中, 个体 1 为一个分支, 而其余 29 个个体聚为另一个分支(图 3)。

3 讨论

检测和评价生物种群遗传变异及多样性的分子

标记方法主要有两类：一类是在特定条件下，以基因组 DNA 为模板扩增出不同长度的 DNA 片段，经电泳获得不同的指纹图谱，进而分析其遗传多样性；另一类是对基因组特定 DNA 片段进行直接测序，检测其碱基序列的变异。基于 DNA 扩增片段长度多态性的分子标记常采用 RAPD、RFLP、AFLP 以及 SSR 等技术(马召腾等, 2011)。其中，AFLP 分子标记技术兼有 RFLP 技术高重复性和 PCR 技术简便快捷等优点，却克服了 RFLP 技术复杂和 RAPD 稳定性差的缺

点(刘祥芳等, 2017)。AFLP 检测位点真实性高且扩增的条带丰富(卢建峰等, 2010)。韩志强等(2007)采用 AFLP、RAPD 和 Cytb 等标记对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)群体遗传变异研究表明，以 AFLP 标记对半滑舌鲷群体间遗传差异的检测最为灵敏。本研究中，用 7 对引物进行 AFLP 分子标记，共检测到乌江四川裂腹鱼种群 856 个位点，其中，多态位点 796 个(表 1)，从而较好地反映了群体的遗传结构并显示该种群有较丰富的遗传变异。

表 2 乌江四川裂腹鱼种群遗传多样性参数

Tab.2 Parameters of genetic diversity for *S. kolzovi* population in the Wujiang River

引物组合 Primer pair	观测等位基因数 Observed number of alleles (N_o)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Nei 多样性指数 Nei diversity index (H)	Shannon 信息指数 Shannon information index (I)
E-AAC/M-CAC	1.988 1	1.279 6	0.180 3	0.299 6
E-AAG/M-CAG	1.936 8	1.384 7	0.234 9	0.368 3
E-AGC/M-CAA	1.910 4	1.348 1	0.218 5	0.347 1
E-AGC/M-CTG	1.948 5	1.327 3	0.204 7	0.327 4
E-AGG/M-CAC	1.943 5	1.327 9	0.208 1	0.334 0
E-AGG/M-CAG	1.898 4	1.331 5	0.210 8	0.337 0
E-AGG/M-CTA	1.909 7	1.372 2	0.228 2	0.357 7
平均值±标准差 Mean±SD	1.933 6±0.028 0	1.338 8±0.031 0	0.212 2±0.016 0	0.338 7±0.020 0

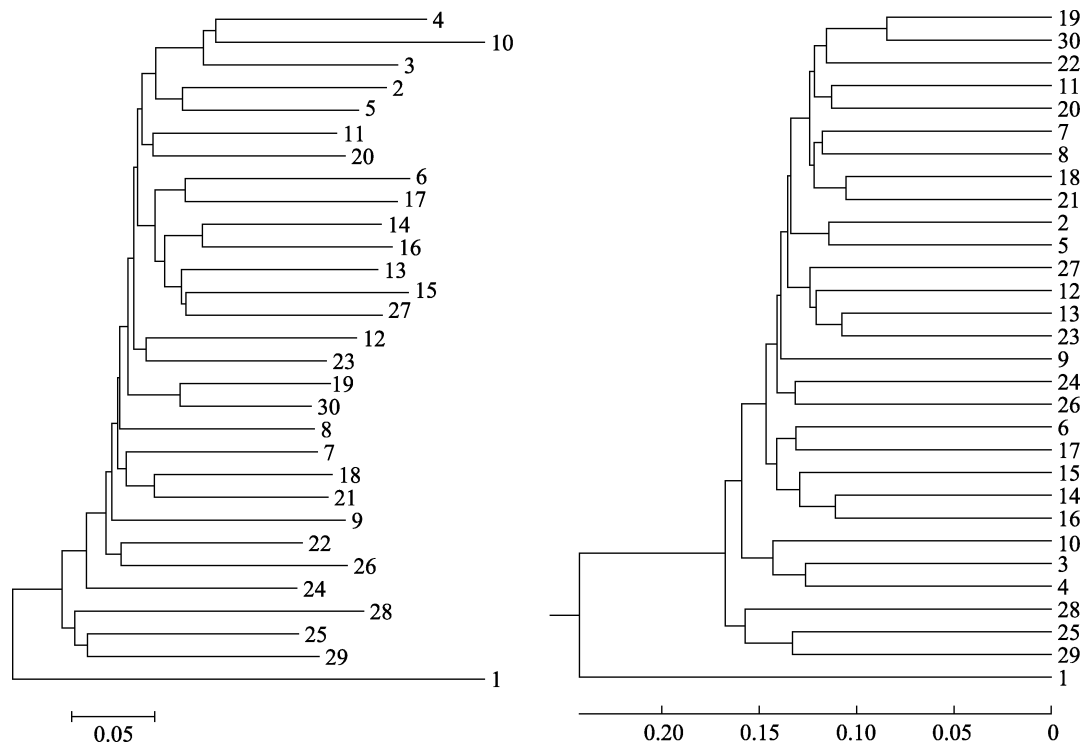


图 3 30 尾乌江四川裂腹鱼种群 NJ(左)和 UPGMA(右)系统树

Fig.3 NJ phylogenetic tree (on the left) and UPGMA phylogenetic tree (on the right) based on genetic distance between the 30 individuals of *S. kolzovi* from the Wujiang River

丰富的遗传多样性意味着物种具有较高的适应生存潜力、蕴藏着较大的进化潜能以及较丰富的育种和遗传改良的潜力,而种群贫乏的遗传多样性则会给物种生存、进化及种质资源的保护和利用带来不利影响(季维智等, 1999)。多态位点比例(PPL)、有效等位基因数(N_e)、Nei 多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)是衡量群体遗传多样性的常用指标。本研究中, 乌江四川裂腹鱼种群的 PPL、 N_e 、 H 和 I 平均值分别为 93.36%、1.338 8、0.212 2 和 0.338 7 (表 2), 与塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)塔什库勒干河群体(PPL=90.62%、 H =0.376 2、 I =0.544 3) (杨天燕等, 2012)和齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)野生种群(PPL=87.28%) (宋昭彬, 2005)处于同一水平, 高于已被证实遗传多样性较低的野生哲罗鱼(*Hucho taima*)呼玛河、海青、虎头、抓吉群体(PPL=43.6%~55.64%、 N_e =1.254 1~1.335 3、 H =0.148 0~0.195 3、 I =0.221 5~0.291 3) (佟广香等, 2009)、长江合江江段岩原鲤(*Procypris rabaudi*)种群(PPL=46.89%) (宋君等, 2005)。AFLP 标记的遗传符合孟德尔定律(王伟继等, 2005; 叶宁, 2017), 因此, 在数据分析中可将 1 个扩增位点视为 1 个基因, 1 个个体的全部扩增位点组合即为该个体的基因型。本研究中, 基于 30 个个体, 用 7 对引物共计获得了乌江四川裂腹鱼种群 30 个基因型(表 1), 即每个个体均具有各自独特的基因型。因此, 乌江四川裂腹鱼种群具有较丰富的遗传多样性。除 AFLP 标记外, 线粒体 DNA 分子标记也常用于鱼类种群遗传多样性研究(韩志强等, 2007; 刘滨等, 2013; 黄镇宇等, 2019)。代应贵等(2010)基于 mtDNA 控制区 464 bp 不完全序列的测序结果分析了乌江四川裂腹鱼种群遗传多样性, 结果表明该种群遗传多样性较低。这可能低估了乌江四川裂腹鱼种群遗传多样性的水平。可见, 本研究采用 AFLP 标记比采用线粒体 DNA 分子标记检测出了该种群更丰富的遗传变异和多样性。乌江四川裂腹鱼种群丰富的遗传多样性表明, 四川裂腹鱼在乌江上游水域生境具有较强的适应能力、生存能力和进化潜力, 乌江四川裂腹鱼种群具有较好的种质资源价值。

四川裂腹鱼在乌江水系仅分布于乌江上游(伍律, 1989)。乌江上游为位于化基村上流的乌江河段, 主要有六冲河、三岔河 2 条支流。其中, 六冲河少部分河段为喀斯特地表下浅层伏流。三岔河沿岸为煤矿分布区(郭振春, 2004) (图 1), 受煤矿污染河水常年乌黑浑浊, 野生鱼类资源贫乏, 本研究未能在该支流采集到四川裂腹鱼样品。乌江蕴藏着丰富的水力资源, 是国家梯级水电开发的重要基地。乌江中、上游先后

规划修建了普定电站、引子渡电站、洪家渡电站、东风电站和索风营电站, 至 2005 年已全部截流蓄水(郭艳娜等, 2010; 沛吉, 2003) (图 1)。这些电站大坝的修建, 改变了河流的水流情势, 使河流环境由急流变为缓流乃至静水, 阻断了鱼类的洄游路径, 导致该河流中适应原急流环境的土著鱼类分布区缩小。目前, 四川裂腹鱼主要分布于洪家渡电站大坝以上的六冲河河段(詹会祥等, 2009)。另一方面, 多年来六冲河沿岸渔民的酷渔滥捕已使该支流中四川裂腹鱼种群数量急剧减少, 个体呈现出明显低龄化的特点(李忠利等, 2015)。可见, 受水域污染、水电站建坝和过度捕捞等的影响, 四川裂腹鱼在乌江上游分布区已缩小, 种群数量减少, 处于生态受威胁状态。因此, 尽管乌江四川裂腹鱼种群仍保存着较丰富的遗传多样性, 但仍需开展对乌江四川裂腹鱼种群及种质资源的保护。

研究表明, 进行 DNA 扩增片段长度多态性分析中, 当用于群体遗传多样性研究的样本量不少于 30 时, 基于不同样本数量获得的群体遗传多样性参数值差异不显著(戴习林等, 2017)。本研究中, 乌江四川裂腹鱼种群样本量为 30, 刺网捕捞采样设置的 4 个采样点覆盖了乌江上游六冲河的全部河段, 采集的四川裂腹鱼标本样品代表性强。因此, 本研究获得的乌江四川裂腹鱼种群遗传多样性参数结果具有较高的可信度。然而, 今后仍需结合 DNA 测序分析技术和扩增片段长度多态性分析技术, 在乌江设置更多的采样点, 并在每个采样点采集更多的四川裂腹鱼个体, 增加样本量, 开展进一步的实验分析, 以更加全面、深入地了解乌江四川裂腹鱼种群的遗传背景、遗传结构及多样性, 为乌江四川裂腹鱼种质资源的开发利用与保护提供科学依据。

参 考 文 献

- BERTIN A, GOUIN N, BAUMEL A, *et al.* Genetic variation of loci potentially under selection confounds species: Genetic diversity correlations in a fragmented habitat. *Molecular Ecology*, 2017, 26(2): 431–443
- DAI X L, LIU J, LI J J, *et al.* Effects of sample size and loci number on genetic diversity index in *Macrobrachium rosenbergii* with microsatellite markers. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1083–1095 [戴习林, 刘洁, 李晶晶, 等. 罗氏沼虾种群 SSR 分析中样本量及标记量对遗传多样性指标的影响. *水产学报*, 2017, 41(7): 1083–1095]
- DAI Y G, HAN H F. Karyological analysis of two species in the subfamily Schizothoracinae (Cypriniformes: Cyprinidae) from China, with notes on karyotype evolution in Schizothoracinae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2018, 18: 175–186

- DAI Y G, ZHOU X J, XIAO H. Genetic diversity of the mtDNA D-loop in the population of *Schizothorax kozlovi* from the Wujiang River. *Sichuan Journal of Zoology*, 2010, 29(4): 505–509 [代应贵, 邹习俊, 肖海. 四川裂腹鱼乌江种群 mtDNA 控制区序列的遗传多样性分析. *四川动物*, 2010, 29(4): 505–509]
- FOURTUNE L, PAZ-VINAS I, LOOT G, *et al.* Lessons from the fish: A multispecies analysis reveals common processes underlying similar species genetic-diversity correlations. *Freshwater Biology*, 2016, 61(11): 1830–1845
- GUO Y N, WU Z, LI H, *et al.* Effect of cascade hydro-electric stations on phytoplankton in Wujiang watershed. *Environmental Science and Technology*, 2010, 33(12): 176–179 [郭艳娜, 伍志, 李海, 等. 水电梯级开发对乌江流域浮游植物分布的影响. *环境科学与技术*, 2010, 33(12): 176–179]
- GUO Z C. The main characteristics of mineral resources and the division of metallogenic areas (zones) in Guizhou Province. *Guizhou Geology*, 2004, 21(4): 271 [郭振春. 贵州省矿产资源主要特点及成矿区(带)划分. *贵州地质*, 2004, 21(4): 271]
- HAN Z Q, ZHUANG Z M, GAO T X, *et al.* Genetic diversity in *Cynoglossus semilaevis* by AFLP, RAPD and mtDNA markers. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 192–200 [韩志强, 庄志猛, 高天翔, 等. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 192–200]
- HE Y F, WU X B, WANG X G, *et al.* Otolith carbon and oxygen stable isotopes in laboratory-reared *Schizothorax kozlovi*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(7): 2339–2343 [何勇凤, 吴兴兵, 王旭歌, 等. 四川裂腹鱼耳石碳、氧稳定同位素特征. *应用生态学报*, 2017, 28(7): 2339–2343]
- HE Y F, WU X B, ZHU Y J, *et al.* Cloning of gonadal aromatase gene *Cyp19a* in an endemic fish (*Schizothorax kozlovi*) of the upper Yangtze River, and temperature effects on its expression. *Genes and Genomics*, 2016, 38: 841–848
- HUANG Z Y, ZHANG Q, LU L F, *et al.* Genetic diversity of *Liza affinis* in coastal waters of China deduced from mitochondrial *CO I* sequences. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 46–52 [黄镇宇, 章群, 卢丽锋, 等. 基于线粒体 *CO I* 序列的中国前鳞鲷遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 46–52]
- JI W Z, SU B. Principles and methodologies of genetic diversity studies. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1999 [季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999]
- LI Z L, HU S Y, CHEN Y X, *et al.* Age structure and growth characteristics of *Schizothorax kozlovi* in the upper Wujiang River. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(2): 75–80 [李忠利, 胡思玉, 陈永祥, 等. 乌江上游四川裂腹鱼的年龄结构与生长特性. *水生态学杂志*, 2015, 36(2): 75–80]
- LIU B, LIU X F, LIU S T, *et al.* Genetic diversity of partial mtDNA D-loop region among stocks of turbot *Scophthalmus maximus* recently introduced and long-farmed in China. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 31–36 [刘滨, 刘新富, 刘思涛, 等. 大菱鲆引进群体与国内累代繁养群体线粒体 D-loop 区部分序列的遗传多态性分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 31–36]
- LIU X F, ZHENG J B, JIA Y Y, *et al.* AFLP analysis on genomic sexual dimorphism of *Erythroculter ilishaeformis* and current genetic diversity of the Taihu strain. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1200–1206 [刘祥芳, 郑建波, 贾永义, 等. 翘嘴红鲌雌雄基因组差异及太湖野生群体遗传多样性现状的 AFLP 分析. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1200–1206]
- LU J F, BAI J J, LI S J, *et al.* AFLP analysis of genetic diversity in consecutive selected populations of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(3): 3–7 [卢建峰, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈选育群体遗传多样性的 AFLP 分析. *淡水渔业*, 2010, 40(3): 3–7]
- MA Z T, PAN L D. Molecular biological techniques for genetic diversity analysis of aquatic animal populations. *Bulletin of Biology*, 2011, 46(10): 1–5 [马召腾, 潘连德. 水生动物种群遗传多样性分析的分子生物学技术. *生物学通报*, 2011, 46(10): 1–5]
- PEI J. The Limited Liability Company of Wujiang Hydropower Development in Guizhou vigorously promoted the development of Cascade Hydropower along the Wujiang River. *Water Power*, 2003, 29(8): 49 [沛吉. 贵州乌江水电开发有限责任公司大力推动乌江梯级水电开发. *水力发电*, 2003, 29(8): 49]
- SHARIFI M, SOURINEJAD I, HOSSEINI S J, *et al.* Application of AFLP molecular marker for genetic analysis of black pomfret *Parastromateus niger* from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2015, 14(4): 857–875
- SHI F. Conservation genetics of *Semilabeo prochilus* and *Procypris rabaudi* populations in the middle and lower reaches of Wujiang River. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2010 [史方. 乌江中下游泉水鱼和岩原鲤群体的保护遗传学研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2010]
- SHI L M. Genetic diversity and its conservation. *Bioscience Communication*, 1990, 2(4): 159–164 [施立明. 遗传多样性及其保存. *生物科学信息*, 1990, 2(4): 158–164]
- SOLTIS P S, SOLTIS D E. Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Aliso*, 1991, 13(1): 215–223
- SONG J, SONG Z B, YUE B S, *et al.* Study on genetic diversity based on AFLP fingerprint of rock carp from Hejiang section of Yangtze River. *Sichuan Journal of Zoology*, 2005, 24(4): 495–499 [宋君, 宋昭彬, 岳碧松, 等. 长江合江江段岩原鲤种群遗传多样性的 AFLP 分析. *四川动物*, 2005, 24(4): 495–499]
- SONG Z B. Studies on genetic diversity of wild populations of prenat's schizothoracin (*Schizothorax prenanti*) and rock carp (*Procypris rabaudi*). Postdoctoral Research of Sichuan University, 2005 [宋昭彬. 齐口裂腹鱼和岩原鲤野生种群遗传多样性研究. 四川大学博士后研究论文, 2005]
- TONG G X, KUANG Y Y, YIN J S. AFLP analysis of genetic diversity of taimen (*Hucho taimen*) in wild populations. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 833–841 [佟广香, 匡友谊, 尹家胜. 野生哲罗鱼种质资源遗传多样性的 AFLP 分析. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 833–841]
- WANG W J, YUE Z Q, KONG J, *et al.* Development of AFLP

- and its application in marine organism. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(1): 80–85 [王伟继, 岳志芹, 孔杰, 等. AFLP 分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用. *海洋水产研究*, 2005, 26(1): 80–85]
- WANG X Z, GAN X N, LI J B, *et al.* Cyprininae phylogeny revealed independent origins of the Tibetan Plateau endemic polyploid cyprinids and their diversifications related to the Neogene uplift of the plateau. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46(11): 1277–1295 [王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 等. 鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(11): 1277–1295]
- WU L. *Fishes of Guizhou*. Guiyang: Guizhou Peoples's Press, 1989 [伍律. 贵州鱼类志. 贵阳: 贵州人民出版社, 1989]
- YANG T Y, GUO Y, MENG W, *et al.* AFLP analysis of genetic diversity of *Schizothorax biddulphi* populations. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(4): 83–87 [杨天燕, 郭焱, 孟玮, 等. 塔里木裂腹鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. *淡水渔业*, 2012, 42(4): 83–87]
- YE N, BAO X F, LIU J Y. AFLP analysis of genetic diversity of imported *Litopenaeus vannamei* populations and cultured stocks. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 339–346 [叶宁, 包秀凤, 刘建勇. 凡纳滨对虾引进群体与养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析. *水产学报*, 2017, 41(3): 339–346]
- YUE P Q. *Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes III*. Beijing: Science Press, 2000 [乐佩琦. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社, 2000]
- ZHAN H X, YAN H, AN Q P, *et al.* Countermeasure suggestion and reasons for decline of fish resources in Liuchong River. *Journal of Hydroecology*, 2009, 30(1): 147–149 [詹会祥, 晏宏, 安全平, 等. 六冲河鱼类资源衰退的原因与对策建议. *水生态学杂志*, 2009, 30(1): 147–149]
- ZHANG X J, DAI Y G. Feeding habits and resources protection of *Schizothorax kozlovi*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(2): 110–114 [张晓杰, 代应贵. 四川裂腹鱼摄食习性与资源保护. *水生态学杂志*, 2011, 32(2): 110–114]

(编辑 冯小花)

AFLP Analysis of Genetic Structure and Diversity in Population of *Schizothorax kozlovi* from the Wujiang River

AN Dandan¹, DAI Yinggui^{1,2}⊙, ZOU Xijun¹

(1. College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;
2. Special Fisheries Research Institute, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract *Schizothorax kozlovi*, which belongs to Cypriniformes, Cyprinidae and Schizothoracinae, is a wild fish species of high economic value, distributed in the Jinsha, Yalong, and upper Wujiang Rivers of the Yangtze River system and the Beipan River in the Pearl River system in China. To assess the genetic diversity and germplasm resources of *S. kozlovi* in the Wujiang River, Guizhou, the genetic structure and diversity were analyzed in the 30 individuals of the species from the river by the methods of amplified fragment length polymorphism (AFLP). With 7 pairs of selected primers through the pre-experiment, 5~73 DNA fragments were amplified in the 30 individuals, ranging from 69 to 500 bp. A total of 856 loci were detected, including 796 polymorphic loci accounting for 92.99% of the total. The population contained 30 genotypes, and the mean values of the observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei diversity index (H), and Shannon information index (I) were 1.933 6, 1.338 8, 0.212 2, and 0.338 7, respectively. The genetic distance between individuals ranged from 0.169 1 to 0.531 9, with an average of 0.306 8. The unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees of the 30 individuals contained 2 branches and had the similar topological structure. The *S. kozlovi* population in the Wujiang River contained rich genetic diversity. However, hydropower station dams, river pollution, and overfishing have reduced the distribution of *S. kozlovi*, and its population size has declined. Therefore, this species is ecologically threatened, and the population and germplasm resources of *S. kozlovi* in the Wujiang River needs to be protected.

Key words Wujiang River; *Schizothorax kozlovi*; Population; AFLP; Genetic diversity

⊙ Corresponding author: DAI Yinggui, E-mail: daiygui@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200314003

http://www.yykxjz.cn/

王锦秀, 任道全, 王新月, 陈生熬, 宋勇. 塔里木河流域 5 个地理种群的叶尔羌高原鳅遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 46-54

WANG J X, REN D Q, WANG X Y, CHEN S A, SONG Y. The analysis of genetic diversity of *Triplophysa yarkandensis* (Day) from five geographic populations in the Tarim River Basin. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 46-54

塔里木河流域 5 个地理种群的叶尔羌高原鳅 遗传多样性分析*



王锦秀 任道全 王新月 陈生熬 宋勇^①

(塔里木大学动物科学学院 新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

摘要 为研究塔里木河流域叶尔羌高原鳅(*Triplophysa yarkandensis*)群体的遗传多样性,基于高通量测序平台,对叶尔羌高原鳅基因组进行测序,并筛选出符合条件的微卫星位点,设计 100 对用于 PCR 扩增的引物,最终筛选出 39 对具有多态性的引物,挑选多态性较高的 15 对在 5 个河段叶尔羌高原鳅种群中进行扩增,分析不同种群的遗传多样性和种群分化情况。结果显示,5 个叶尔羌高原鳅群体的平均等位基因数(N_a)和有效等位基因数(N_e)分别为 48.467 和 15.181,平均观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.578 和 0.929,多态性信息含量(PIC)为 0.893,种群间遗传分化系数(F_{st})为 0.102。其中,车尔臣河群体等位基因数最多(18.143),阿克苏河群体等位基因数最少(10.429);阿克苏河群体的观测杂合度最高(0.706),台特玛湖群体的观测杂合度最低(0.517);阿尔干群体的多态信息含量最高(0.877),阿克苏河群体的多态信息含量最低(0.760);阿克苏河与台南河群体的遗传距离最小(0.606),阿尔干与台南河群体遗传距离最大(1.901);阿尔干群体与台南河群体遗传相似度最低(0.149),阿克苏河与台南河群体的遗传相似度最高(0.545)。群体遗传结构显示,车尔臣河与台特玛湖、阿克苏河与台南河、阿尔干群体分别聚为独立分支。研究表明,塔里木河各个河段叶尔羌高原鳅之间虽然有一定的差异,但仍然有基因交流现象。

关键词 叶尔羌高原鳅; 微卫星; 引物筛选; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0046-09

叶尔羌高原鳅(*Triplophysa yarkandensis*) (Day, 1877), 又叫叶尔羌条鳅(郭焱等, 2012), 俗称狗头鱼, 主要分布于塔里木河水系(叶尔羌河、喀什噶尔河、木札提河、阿克苏河和车尔臣河等), 是塔里木河水

系特有鱼类(何长才, 1996; 郭焱, 2012)。目前, 关于叶尔羌高原鳅的研究多集中在形态学(宋勇等, 2018; 陈生熬等, 2017)、摄食生长(陈生熬等, 2014; 王帅等, 2017)、病理学(姚娜等, 2018; 雷曼红等, 2010)等方

* 国家自然科学基金(31460691; 31360635)、农业财政专项(西北地区重点水域渔业资源与环境调查)、兵团科技局项目(2017DB003)、兵团塔里木畜牧科技重点实验室项目(HS201901)和塔里木大学研究生创新项目(TDGRI201821)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31460691; 31360635), Special Agricultural Finance Project (Investigation on Fishery Resources and Environment in Key Waters of Northwest China), Corps Science and Technology Bureau Project (2017DB003), Tarim Key Laboratory of Animal Husbandry Science and Technology (HS201901), and Graduate Innovation Project of Tarim University (TDGRI201821)]. 王锦秀, E-mail: 1342067382@qq.com

① 通讯作者: 宋勇, 副教授, E-mail: 99841449@qq.com

收稿日期: 2020-03-14, 收修改稿日期: 2020-04-10

面。近年来,随着分子生物学的发展,部分学者(Chen *et al*, 2016; González *et al*, 2013; 魏玉众等, 2019)对叶尔羌高原鳅基因组学进行研究,但关于叶尔羌高原鳅种群遗传学的研究尚未见报道。

微卫星(microsatellite)又称为简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs),是由1~6 bp的重复单位组成的串联重复DNA序列(Ibrahim *et al*, 2015),具有多态性高、变异性强、数据易统计分析等突出优点(Dewoody, 2000)。鱼类微卫星标记开发中常以二碱基重复类型为主(翟云等, 2020; Castoe *et al*, 2012),但也有学者认为,三碱基重复较二碱基重复具有更高的筛选效率和多态性(李文升等, 2011; Thiel *et al*, 2013)。随着人们对分子遗传学的深入研究,DNA分子标记技术得到越来越广泛的应用,它能够直接反映生物个体间或者种群间基因的差异。近年来,微卫星也被广泛应用于水产养殖业中,史君洁等(2018)、马秀英等(2016)、李景芬等(2016)和毛守康等(2016)分别对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、黄河鲤(*C. carpio*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和梭鱼(*Liza haematocheila*)等水产动物遗传多样性进行研究,找出了具有多态性的SSR标记。本研究基于高通量测序平台对叶尔羌高原鳅基因组进行随机测序,并挑选出100个含二碱基重复、三碱基重复的微卫星序列,并依据其侧翼序列合成引物,最终筛选出15对多态性较高的微卫星引物,对塔里木河5个河段叶尔羌高原鳅群体的遗传多样性、种群分化及遗传结构进行分析,旨在为塔里木河特有鱼类的保护提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

叶尔羌高原鳅样品于2015—2019年每年4—7月采集于塔里木河流域。其中,阿尔干(AEG)25尾,台特玛湖(TTMH)15尾,车尔臣河(CECH)27尾,阿克苏河(AKSH)17尾,台南河(TNH)18尾,共计102尾,用酒精和福尔马林浸泡保存在塔里木大学水产养殖实验基地,采样点分布见图1。

1.2 基因组DNA的提取与检测

取20 mg除去福尔马林的肌肉组织,按照常规的苯酚-氯仿抽提基因组DNA(刘忠浩, 2019)。采用核酸蛋白检测仪(DS-11, DENOVI)检测基因组DNA的浓度及纯度,用1%的琼脂糖电泳检测(电泳仪 Bio-Rad)质量,将纯度较好的DNA于-20℃保存备用。

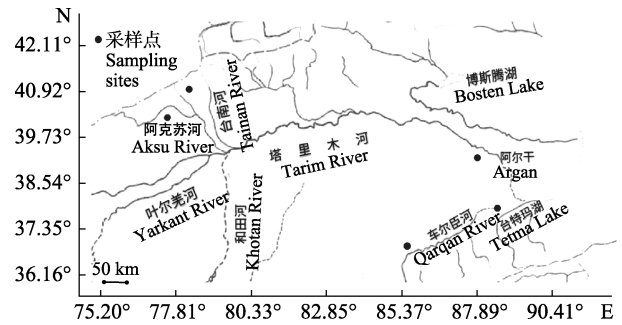


图1 塔里木河流域采样地点

Fig.1 Sampling sites in Tarim River

1.3 微卫星引物的设计与合成

叶尔羌高原鳅微卫星引物的获取参考吕振明等(2017)的方法。将样品送至上海生工生物工程股份有限公司,采用Illumina Hiseq PE150高通量测序平台进行全基因组从头测序,原始数据通过de novo拼接和组装获取拼接序列,使用MISA对拼接序列进行微卫星搜索,得到的微卫星最小间距为200 bp。随机挑选100个二碱基重复、三碱基重复且重复次数在10次以上的微卫星序列进行引物开发和合成。

1.4 微卫星引物的筛选

随机选取8尾叶尔羌高原鳅个体的基因组DNA为模板,对合成的引物进行筛选并优化反应条件。PCR反应体系总体积为30 μL: PCR Mix 15 μL(天根,北京),DNA模板3 μL,上游引物1.5 μL,下游引物1.5 μL,剩余体积双蒸水补足。反应条件:95℃预变性3 min;94℃变性30 s,退火30 s(温度见表1),72℃延伸40 s,以上程序循环34次;最后72℃继续延伸10 min,反应产物采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,经0.1%硝酸银染色后,在化学发光成像分析系统(Bio-Rad)下拍照保存。

1.5 群体多态性的检测

选取15对多态性较高引物,对塔里木河5个河段的叶尔羌高原鳅群体样本基因组DNA进行扩增,反应体系和程序同1.4,将产物送至北京华世百奥生物技术有限公司,基于Fragment Analyzer 5200毛细电泳平台分析微卫星数据。

1.6 数据处理与分析

利用Cervus 3.03软件计算出5个群体叶尔羌高原鳅的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC)。利用PopGen32分析群体内近交系数(F_{is})、群体遗传

分化指数(F_{st})、Shannon 多样性指数(H)、基因多样性指数、Hardy-Weinberg 平衡检测及遗传距离(GD)与遗传相似度(GS)。基于群体间的 Nei's 遗传距离使用 MEGA 7.0 软件构建 UPGMA 系统进化树。

2 结果

2.1 高通量测序结果及微卫星引物信息

高通量测序共获得 27,802 条存在微卫星位点的序列,在检测出的微卫星序列中,二碱基重复占优势,占全部微卫星序列的 34.34%;三碱基重复占 5.22%,四碱基重复占 2.53%,五碱基重复占 2.86%,六碱基重复占 12.46%。根据微卫星筛选要求和引物设计原则,共设计 100 对引物,其中,79 对引物成功扩增,但只有 39 对引物具有多态性(表 1)。部分引物(Y7、

Y11 和 Y45)经硝酸银染色后显示出多态性(图 2)。

2.2 叶尔羌高原鳅微卫星位点的多态性

15 对多态性较高的引物在 5 个叶尔羌高原鳅群体中进行扩增,分析扩增结果,得到种群遗传多样性信息(表 2)。叶尔羌高原鳅的等位基因数介于 30~52 之间,有效等位基因数为 6.593~30.626,平均等位基因数和有效等位基因数分别为 48.467 和 15.181,其中, Y39 位点的等位基因数最少,为 30,位点 Y7、Y11、Y17、Y28、Y42、Y44、Y54 和 Y80 的等位基因数最多,为 52。各位点的 Shannon 多样性指数为 2.447~3.699,观测杂合度为 0.043~0.826,多态信息含量为 0.853~0.975。种群间遗传分化系数为 0.043~0.295,平均值为 0.102,群体内近交系数为-0.096~0.760,多数大于零,对位点进行 Hardy-Weinberg 平

表 1 叶尔羌高原鳅微卫星位点及 PCR 引物信息

Tab.1 Information on polymorphic microsatellite markers of *T. yarkandensis*

位点 Loci	正向引物序列 Forward primer sequence (5'~3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'~3')	重复单元 Repeat motif	退火温度 $T_m / ^\circ\text{C}$	片段大小 Size range /bp
Y5	AGAGGGGAAGTCTCCGATGT	GTAGAGGCGGTATCAGCTCG	(AG)25	60.1	202~233
Y7	ATTCAAGCAGTCCAGAGCGT	ATTCAGTGTGACAAGCGCAG	(ATG)5	60.0	203~238
Y8	ATTCAAGCAGTCCAGAGCGT	ATTCAGTGTGACAAGCGCAG	(TG)48	60.1	210~234
Y11	CCGACCTTCATGGCTGTAAT	CCGATGATAATTTTGTGGGC	(AG)28	60.2	101~136
Y17	CAGTGATGGAGGGAGATTCTG	TCTGGAGATGAGAGGACCGT	(TG)42	59.7	100~129
Y20	CAGTGATGGAGGGAGATTCTG	TCTGGAGATGAGAGGACCGT	(TG)42	59.9	95~125
Y21	TTATCAGGATGCCTTCTGGG	CTGAACCCTGGGTGACAAC	(TG)48	60.0	149~162
Y23	CACGATTTCAACGAAGCTGA	AGCGAAGACCAAGAGACCA	(AC)52	59.9	115~132
Y24	ACCCTTACCTGAGGCTGGAT	TAGGTTGGGTTGACAGAGGC	(TG)24	59.9	103~126
Y25	CAGATTCATCTGCTGCCGTA	ACAATGGCCTTCATCACCAT	(GT)48	59.9	171~215
Y28	CCGCAAAGTCACCAGTGTA	TGCAAGTGAAGTGGTTCCAA	(TG)26	59.8	145~152
Y30	CATGGTCTTCTGGTCCACCT	CAACCGTACATTTGCATTCG	(CA)54	59.9	104~118
Y32	CAGGTCTGGTTCTGGTCCAT	CACTGACGTGTTTCAATGGG	(CA)52	60.0	254~276
Y38	TTTTTGTGCACGGGACATTA	TCTTTGGAACACACCCACAA	(AG)32	50.9	176~199
Y39	TGCCTTGGTTTTGTGTTTCAG	TATCGCCATCTCGTGTGAG	(TG)46	59.7	119~136
Y41	TCTGCCTTTTTTCAGCGTTTT	TTTAGCACCTCAGAGCGGTT	(AC)64	60.0	105~129
Y42	ACCACCAAACAAGGCTGAAC	TTCTCCTGCTGCAAAACCTT	(GT)25	59.9	101~123
Y44	ACCACCAAACAAGGCTGAAC	TTCTCCTGCTGCAAAACCTT	(AC)42	59.9	90~119
Y45	GACGACAGACTGGGAGAAGC	TTTCTAAGGCTGCGCATTTT	(TG)38	59.9	188~212
Y46	AGAACTCAGATTCAGGCGGA	CTGTCCTGGTATCGTTCGGT	(GT)27	59.9	193~218
Y47	CTCACTTGGGTGGTGAAGGT	CCCATAAGGGAGGATTCAT	(CA)50	69.0	175~209
Y48	GTGGAATTCGGGATTGAATG	ATGAACCGAACAGGATCGAC	(CA)48	60.1	171~194
Y49	CAGGAAGATCGCCAGAAGTC	TATGGTTCCCTTTCTGTCGG	(TG)54	59.9	258~285
Y50	TTTTTGTGCACGGGACATTA	TCTTTGGAACACACCCACAA	(AG)32	59.9	181~217
Y54	ACCACCAAACAAGGCTGAAC	TTCTCCTGCTGCAAAACCTT	(AC)42	60.0	101~137
Y55	ACCACCAAACAAGGCTGAAC	TTCTCCTGCTGCAAAACCTT	(AC)42	61.2	104~125
Y62	ACCATGTCTACAACCGTCA	AAACTGATGTTCCCCACTCG	(AC)63	60.0	184~225

续表 1

位点 Loci	正向引物序列 Forward primer sequence (5'~3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'~3')	重复单元 Repeat motif	退火温度 $T_m / ^\circ\text{C}$	片段大小 Size range /bp
Y80	CAGCAGCAGCACAGTTTGTT	ACGACCTTCAATGTTCCGTC	(CAG)10	60.2	103~122
Y82	AACCGTTTCTGGACAGATGG	GAGTCAGCTGTTTGCCTTCC	(ATA)9	59.9	121~149
Y83	GCCACAATCACTCTGAAGCA	TTGTTTGTGCGCCATGTCATT	(TTA)5	59.9	274~307
Y85	TGAGTGACAACCGGTCACAT	CCGCTGTGGACTTCTTTCTC	(AGA)5	60.0	195~217
Y86	CCAACTAAGCAAGCCAGAGG	CTGCTTGATTCGTCTGGTCA	(TCC)7	60.5	120~146
Y87	CGGTTTTACAAGGGCACACT	CCACCTCCGTGACAATACCT	(GGT)7	60.9	247~254
Y88	CACGAAGCCTGTATGCAGAA	CATGTGGGATGCAGGTACAG	(TGA)9	59.9	142~165
Y89	CAGCAGCAGCACAGTTTGTT	ACGACCTTCAATGTTCCGTC	(CAG)10	59.9	104~129
Y94	CCAACTAAGCAAGCCAGAGG	CTGCTTGATTCGTCTGGTCA	(TCC)7	60.0	123~148
Y96	CTGGGAATACCAGGTGCTGT	GACGGAACATTGAAGGTCGT	(TG)48	60.2	156~171
Y98	TCTTGTGTTCTGCTACGGGA	GAGCATGAAGGGGATGTTGT	(TGT)6	60.9	141~168
Y100	GATCCTATGCTGCTCTTGGC	TCGGCTATTTACCGCTTCAT	(ATA)7	59.1	176~207

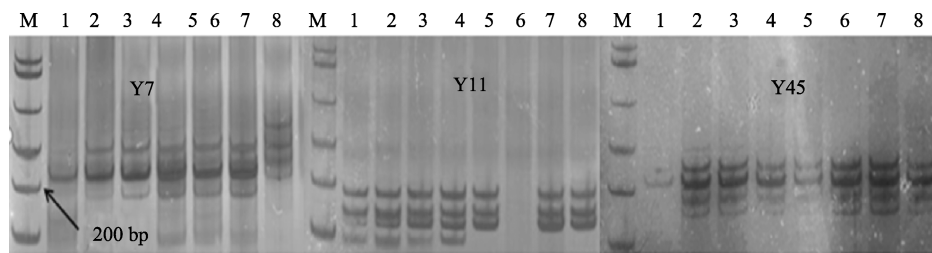


图 2 叶尔羌高原鳅 SSR 引物聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 *T. yarkandensis* SSR primer polyacrylamide gel electrophoresis

M: Marker; 泳道 1~8: 8 个不同样品 PCR 产物 M: Marker; Lane 1~8: Eight different samples of PCR product

表 2 叶尔羌高原鳅 15 个微卫星位点的遗传多样性

Tab.2 Genetic diversity information of 15 microsatellites in *T. yarkandensis*

位点 Loci	等位基因数 Average alleles N_a	有效等位基因数 Effective alleles N_e	Shannon 多样性指数 Shannon diversity index H	观测杂合度 Observed heterozygosity H_o	期望杂合度 Expected heterozygosity H_e	多态信息含量 Polymorphism information content PIC	遗传分化指数 Index of gene differentiation F_{st}	群体内近交系数 Inbreeding coefficient F_{is}
Y7	52	14.444	3.484	0.826	0.955	0.962	0.095	0.724
Y8	49	19.986	3.258	0.761	0.936	0.948	0.064	0.760
Y11	52	19.182	3.418	0.653	0.953	0.927	0.096	0.570
Y17	52	13.643	3.318	0.632	0.932	0.927	0.073	0.572
Y24	42	9.362	2.859	0.081	0.898	0.885	0.245	-0.059
Y28	52	14.144	3.340	0.747	0.934	0.927	0.073	0.737
Y30	50	12.159	3.176	0.663	0.922	0.913	0.043	0.613
Y39	30	6.593	2.447	0.607	0.853	0.836	0.083	0.577
Y42	52	30.626	3.699	0.623	0.975	0.972	0.078	0.566
Y44	52	16.330	3.361	0.678	0.944	0.937	0.085	0.683
Y47	50	23.668	3.578	0.286	0.966	0.956	0.295	0.354
Y54	52	14.017	3.335	0.713	0.934	0.929	0.064	0.692
Y80	52	14.222	3.282	0.727	0.935	0.937	0.077	0.700
Y85	51	11.704	3.087	0.043	0.920	0.909	0.048	-0.096
Y87	39	7.634	2.754	0.624	0.874	0.861	0.117	0.513
Mean	48.467	15.181	3.226	0.578	0.929	0.893	0.102	0.538

衡检测发现, 15 个位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$), 说明群体受外来因素干扰小, 群体遗传结构处于稳定状态。

2.3 叶尔羌高原鳅群体遗传多样性

5 个叶尔羌高原鳅群体遗传多样性结果见表 3。从表 3 可以看出, 叶尔羌高原鳅的等位基因数为 10.429~18.143, 其中, 车尔臣河群体最多, 阿克苏河群体最少; 平均有效等位基因数为 7.969~10.572, 其中, 车尔臣河群体最多, 台特玛湖群体最少; 平均观测杂合度为 0.517~0.706, 其中, 阿克苏河群体最高, 台特玛湖群体最低; 平均期望杂合度为 0.887~0.908, 其中, 阿尔干群体最高, 台南河群体最低; 5 个群体 Shannon 多样性指数为 2.077~2.516, 其中, 车尔臣河群体最高, 阿克苏河群体最低; 多态信息含量为

0.760~0.877, 其中, 阿尔干群体最多, 阿克苏河群体最少, 且多态信息含量均 $P>0.5$ 。

2.4 叶尔羌高原鳅群体间遗传分化及遗传距离分析

根据 15 对引物的扩增结果, 对 5 个群体间的遗传距离和遗传相似度进行分析计算(表 4)。5 个群体间的遗传距离为 0.606~1.901, 其中, 阿克苏河与台南河群体的遗传距离最小(0.606), 阿尔干与台南河群体遗传距离最大(1.901)。各群体间遗传相似度为 0.149~0.545, 其中, 阿尔干群体与台南河群体遗传相似度最小(0.149), 阿克苏河与台南河群体的遗传相似度最大(0.545)。基于群体间 Nei's 遗传距离构建 UPGMA 系统进化树如图 3 所示。结果显示, 5 个叶尔羌高原鳅群体聚为 3 类, 车尔臣河与台特玛湖群体聚为一类、阿克苏河与台南河群体聚为一类、阿尔干群体单独聚为一类。

表 3 叶尔羌高原鳅 5 个群体的遗传多样性

Tab.3 Characteristics of 15 microsatellite loci in 5 populations of *T. yarkandensis*

参数 Parameter		阿尔干 AEG	台特玛湖 TTMH	车尔臣河 CECH	阿克苏河 AKSH	台南河 TNH
等位基因数 N_a	Alleles	16.600	13.267	18.143	10.429	16.333
有效等位基因数 N_e	Effective alleles	9.767	8.402	10.572	7.969	9.143
观测杂合度 H_o	Observed heterozygosity	0.604	0.517	0.594	0.706	0.615
期望杂合度 H_e	Expected heterozygosity	0.908	0.899	0.892	0.896	0.887
Shannon 多样性指数 H	Shannon diversity index	2.492	2.307	2.516	2.077	2.392
多态信息含量 PIC	Polymorphism information content	0.877	0.855	0.804	0.760	0.876

表 4 叶尔羌高原鳅 5 个群体的遗传距离和遗传相似度

Tab.4 Genetic distance and genetic similarity of 5 populations in *T. yarkandensis*

群体 Populations		阿尔干 AEG	台特玛湖 TTMH	车尔臣河 CECH	阿克苏河 AKSH	台南河 TNH
阿尔干 AEG			0.402	0.246	0.188	0.149
台特玛湖 TMH		0.910		0.472	0.429	0.496
车尔臣河 CECH		1.403	0.751		0.444	0.463
阿克苏河 AKSH		1.671	0.845	0.813		0.545
台南河 TNH		1.901	0.700	0.771	0.606	

注: 对角线上方为遗传相似度, 对角线下方为遗传距离

Notes: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

3 讨论

3.1 微卫星位点在群体中的遗传多样性水平

多态信息含量是评价微卫星位点的重要参考标准, $PIC>0.5$ 表明位点具有较高的多态性, $0.25<PIC<0.5$ 表明该位点具有中度多态性, $PIC<0.25$ 表明位点具有低度多态性(丁海燕等, 2015)。张智等

(2019)利用高通量测序法对西昌华吸鳅(*Sinogastromyzon sichangensis*)基因组进行测序并筛选出 29 对具有多态性的引物, 平均等位基因数为 14.5, 观测杂合度和期望杂合度分别为 0.620 和 0.882, 多态信息含量为 0.859。李薇等(2017)基于高通量测序成功筛选出达氏鲟(*Acipenser dabryanus*) 25 个微卫星位点, 每个位点的等位基因数为 7.2, 观测杂合度为 0.744, 期望杂合度为 0.727, 除了 1 个位点以外, 其余位点的多态信

息含量均>0.5, 其多态性较好。本研究基于高通量测序技术开发的二碱基重复、三碱基重复的100对微卫星引物中39对微卫星位点表现出扩增多态性, 选取多态性较高的15对引物用于叶尔羌高原鳅群体的遗传多样性分析, 发现其等位基因为30~52, 且8个位点都具有较高的等位基因数(52), 各位点的平均多态信息含量为0.853~0.975, 均>0.7, 说明这15个微卫星位点均具有高度多态性(PIC>0.5), 群体遗传多样性丰富, 表明利用高通量测序技术能够较好地开发多态性良好的微卫星标记, 可用于后续分子实验。

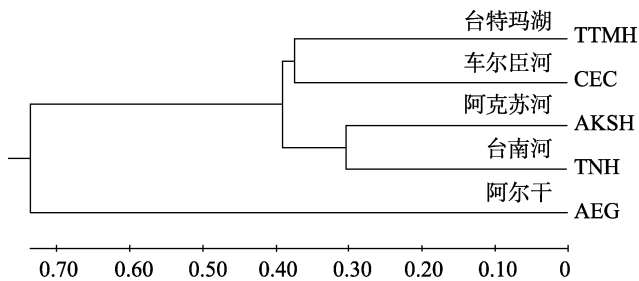


图3 基于 Nei's 遗传距离构建的5个叶尔羌高原鳅群体 UPGMA 聚类树

Fig.3 UPGMA tree among 5 populations of *T. yarkandensis* constructed based on Nei's genetic distance

3.2 叶尔羌高原鳅群体的遗传多样性水平

生物群体的遗传多样性是种质资源的重要组成部分, 它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的基础(颜元杰等, 2019)。关于鱼类遗传多样性的研究有很多报道, 丁海燕等(2015)用6个微卫星标记分析了安徽、甘肃、广东、广西、黑龙江、江苏和重庆7个泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)群体的遗传多样性, 发现7个泥鳅群体遗传多样性丰富, 泥鳅群体存在较明显的近交或斑块化分布, 我国泥鳅呈现东西向梯度分布并在南北向可能存在扰动。刘洁等(2019)对鄱阳湖地区及珠江流域的7个泥鳅群体进行研究, 发现, 目前, 我国泥鳅群体的遗传多样性处于中等水平, 泥鳅群体间的遗传分化受自身迁移能力和地理隔离等因素的影响。本研究中, 5个叶尔羌高原鳅群体的有效等位基因数、diversity index on 多样性指数大小的顺序均为车尔臣河>阿尔干>台南河>台特玛湖>阿克苏河群体, 平均多态信息含量均在0.7以上, 大小顺序为阿尔干>台南河>车尔臣河>台特玛湖>阿克苏河, 说明各群体的遗传多样性水平都较高, 其中, 车尔臣河群体、阿尔干群体具有较高的等位基因丰富度和较高的遗传多样性水平, 阿克苏河群体具有较低的等位基因丰富度和相对较低的遗传多样性水平, 5

个群体的种质资源良好, 具有种群稳定性。造成以上现象的原因可能是阿克苏河、台南河位于塔里木河上游, 阿尔干、车尔臣河、台特玛湖位于塔里木河下游, 上游叶尔羌高原鳅随水流到达下游, 造成基因交流, 导致下游群体的等位基因数增加, 遗传多样性水平较高, 说明叶尔羌高原鳅群体间的等位基因丰富度和遗传多样性水平受自身迁移能力和地理分布等因素的影响, 与上述学者的研究结果一致。

3.3 叶尔羌高原鳅群体的遗传结构

种群的遗传结构受地理隔离、生存环境、种群瓶颈、基因流、选择等多种因素的影响, 其中任一因素的变化都可能会造成该种群的遗传结构改变(武世雄等, 2018)。遗传距离是衡量群体间遗传关系的指标, 遗传距离越小, 说明两群体间亲缘关系越近; 反之, 亲缘关系越远(王林龙等, 2019)。李大命等(2019)研究了江苏省4个太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)的种群遗传结构, 将其分为2个进化类群, 并发现其遗传分化与水系的分布不吻合, 可能与其进化历史有密切关系。李旭鹏等(2020)研究发现, 6个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体内近交系数 $F_{is}>0$, 说明其群体内存在杂合度降低的现象, 综合 $H_o<H_e$, 表明其存在一定程度的近交现象。本研究中, 5个群体的遗传分化系数 F_{st} 为0.043~0.295, 大多数在0.05~0.15之间, 说明叶尔羌高原鳅群体间属于中等程度的遗传分化; 群体内除引物Y24、Y85在群体内近交系数 $F_{is}<0$ 外, 其余引物在群体内近交系数均>0, 说明群体内出现了近交现象; 5个群体间的遗传距离和遗传相似度分别为0.606~1.901和0.149~0.545, 其中, 阿克苏河与台南河群体的遗传距离最小、相似度最大, 阿尔干与台南河群体遗传距离最大、相似度最小。Nei's 遗传距离聚类树将5个群体聚为3类: 台特玛湖与车尔臣河群体、阿克苏河与台南河群体、阿尔干群体, 说明台特玛湖与车尔臣河群体、阿克苏河与台南河群体的遗传距离较近, 相似度较高, 与群体地理位置的分布相吻合。上述结果表明, 塔里木河各个河段叶尔羌高原鳅之间虽然有一定的差异, 但仍然有基因交流的现象, 可能是从2001年起实施了“塔里木河流域近期综合治理工程”, 到2013年已完成了14次生态输水, 水源多次到达台特玛湖(阿布都米吉提等, 2016), 部分叶尔羌高原鳅顺水而下而产生的。

参 考 文 献

ABLEKIM A, KASIMU A, KURBAN A, *et al.* Evolution of

- small lakes in lower reaches of Tarim River based on multi-source spatial data. *Geographical Research*, 2016, 35(11): 2071–2090 [阿布都米吉提·阿布力克木, 阿里木江·卡斯木, 艾里西尔·库尔班, 等. 基于多源空间数据的塔里木河下游湖泊变化研究. *地理研究*, 2016, 35(11): 2071–2090]
- CASTOE T A, STREICHER J W, MEIK J M, *et al.* Thousands of microsatellite loci from the venomous coral snake *Micrurus fulvius* and variability of select loci across populations and related species. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(6): 1105–1113
- CHEN S A, YAO N, SONG Y, *et al.* Effect of morphological traits on body mass of *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2017, 4(3): 546–556 [陈生熬, 姚娜, 宋勇, 等. 塔里木河叶尔羌高原鳅形态性状对体质量的影响. *新疆农业科学*, 2017, 4(3): 546–556]
- CHEN S A, YAO N, WANG Z C, *et al.* Study on feeding habits and growth of *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(3): 374–381 [陈生熬, 姚娜, 王智超, 等. 塔里木河叶尔羌高原鳅摄食和生长的研究. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(3): 374–381]
- CHEN S A, YAO N, XIE C X, *et al.* Complete mitochondrial genome of the *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Taylor and Francis*, 2016, 11(5): 64–89
- DEWOODY J A, AVISE J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3): 461–473
- DING H Y, ZHU M, PENG C, *et al.* Preliminary analysis of the microsatellite diversity of Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1433–1442 [丁海燕, 朱明, 彭冲, 等. 我国泥鳅微卫星遗传多样性初步分析. *水产学报*, 2015, 39(10): 1433–1442]
- GONZÁLEZ C, VECCHIONACCE H, ARAQUE H, *et al.* Extraction of antimicrobial peptides from epidermis of *Triplophysa yarkandensis* and bacteriostasis experiment. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 15(5): 399–404
- GUO Y. *Fishes of Xinjiang*. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2012, 34–35 [郭焱. *新疆鱼类志*. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2012, 34–35]
- HE C C. Two species of fish with the highest elevation and their distribution. *Sichuan Animal*, 1996, 15(3): 116–117 [何长才. 两种海拔最高的鱼类及其分布. *四川动物*, 1996, 15(3): 116–117]
- IBRAHIM I O, ILHAN D, ERTUGRUL F. In silico analysis of simple sequence repeats (SSRs) in chloroplast genomes of *Glycine species*. *Plant Omics*, 2015, 8(1): 24–29
- LEI M H, ZHAO Y P, JIANG R J. Acute toxicity of four drugs to *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis*(Day). *Journal of Aquaculture*, 2010, 31(9): 43–45 [雷曼红, 赵艳斐, 姜仁军. 4 种药物对叶尔羌高原鳅的急性毒性试验. *水产养殖*, 2010, 31(9): 43–45]
- LI D M, TANG S K, LIU Y S, *et al.* Genetic diversity and population structure of four *Neosalanx taihuensis* populations in Jiangsu Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 1–10 [李大命, 唐晟凯, 刘燕山, 等. 江苏省 4 个太湖新银鱼种群遗传多样性和遗传结构分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 1–10]
- LI J F, CAI K J, GONG C P, *et al.* Microsatellite analysis of the genetic characteristics of *Pelteobagrus fulvidraco*, *Pelteobagrus vachelli*, and its hybrid generation. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(7): 159–162 [李景芬, 采克俊, 公翠萍, 等. 普通黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂种一代遗传特征的微卫星分析. *江苏农业科学*, 2018, 46(7): 159–162]
- LI W, LI J X, JING H F, *et al.* Development of microsatellite loci for Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) using high-throughput sequencing. *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(3): 449–457 [李薇, 李久焯, 荆慧芳, 等. 基于高通量测序的达氏鲟微卫星标记筛选. *动物学杂志*, 2017, 52(3): 449–457]
- LI W S, LIU C, LU C Y, *et al.* Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide repeat microsatellites in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 742–750 [李文升, 刘翠, 鲁翠云, 等. 草鱼三、四核苷酸重复微卫星标记的分离与特征分析. *中国水产科学*, 2011 18(4): 742–750]
- LI X P, LUAN S, CAO B X, *et al.* Genetic background analysis of six groups of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in China using SSR markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 103–110 [李旭鹏, 栾生, 曹宝祥, 等. 凡纳滨对虾 6 个国内群体的遗传背景分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 103–110]
- LIU J, GAO F Y, LU M X, *et al.* Microsatellite genetic diversity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations in China. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(12): 2101–2109 [刘洁, 高风英, 卢迈新, 等. 我国 7 个泥鳅群体遗传多样性的微卫星分析. *农业生物技术学报*, 2019, 27(12): 2101–2109]
- LIU Z H. An optimized method to extract genomic DNA from animal whole blood by phenol method. *Inner Mongolia Science Technology and Economy*, 2019(20): 77–78 [刘忠浩. 苯酚法提取动物全血中基因组 DNA 的优化方案. *内蒙古科技与经济*, 2019(20): 77–78]
- LÜ Z M, HOU L, GONG L, *et al.* Isolation and analysis on EST microsatellites of *Sepiella japonica* by de novo high-throughput transcriptome sequencing. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 877–883 [吕振明, 侯龙, 龚理, 等. 基于 de novo 高通量测序的曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) ESTs 中微卫星位点筛选与特征分析. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4): 877–883]
- MA X Y, WANG W, PANG YZ, *et al.* Microsatellite marker

- analysis of genetic diversity in the two populations of yellow River carps. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(23): 22–26 [马秀英, 王伟, 庞有志, 等. 两个黄河鲤鱼群体遗传多样性的微卫星标记分析. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(23): 22–26]
- MAO S K, MA A J, DING F H, *et al.* Analysis of genetic structures of four wild geographic populations of mullet *Liza haematocheila* by using microsatellite marker technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 68–75 [毛守康, 马爱军, 丁福红, 等. 梭鱼4个野生地理群体遗传多样性的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 68–75]
- SHI J J, SHI L Y, LI C T, *et al.* Study on the germplasm identification technique of four species of *Carp* by microsatellite markers. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 748–755 [史君洁, 石连玉, 李池陶, 等. 微卫星标记对4种鲤鱼种质鉴定技术的研究. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 748–755]
- SONG Y, CHENG Y, LUO L L, *et al.* Correlation analysis between morphometrics and body weight of *Triplophysa yarkandensis* of wild populations. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2018, 39(11): 25–29 [宋勇, 程勇, 罗磊磊, 等. 叶尔羌高原鳅野生群体形态性状与体重的相关分析. *家畜生态学报*, 2018, 39(11): 25–29]
- THIEL T, MICHALEK W, VARSHNEY R K, *et al.* Exploiting EST databases for the development and characterization of gene derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(3): 411–422
- WANG L L, ZHANG X M, WANG Z, *et al.* Morphological characteristics and genetic differentiation of a breeding population of *Sepia esculenta* Qingdao. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 342–352 [王林龙, 张秀梅, 王展, 等. 青岛近岸金乌贼繁殖群体形态特征及遗传分化. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 342–352]
- WANG S, SONG Y, REN D Q, *et al.* Effects of ingestions and digestive enzyme activity in *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day) of different temperature. *Journal of Tarim University*, 2017, 29(3): 29–34 [王帅, 宋勇, 任道全, 等. 养殖温度对叶尔羌高原鳅摄食及主要消化酶活性的影响. *塔里木大学学报*, 2017, 29(3): 29–34]
- WEI Y Z, YAO N, WANG S, *et al.* Studies on the differences of three isozymes in *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019(1): 152–156 [魏玉众, 姚娜, 王帅, 等. 叶尔羌高原鳅三种同工酶的组织差异性研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(1): 152–156]
- WU S X, JIANG X T, WANG W, *et al.* Genetic diversity among 6 populations of *Hexagrammos otakii* based on microsatellite analysis. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2018, 8(3): 52–60 [武世雄, 姜欣彤, 王伟, 等. 大泷六线鱼6个群体遗传多样性的微卫星分析. *中国渔业质量与标准*, 2018, 8(3): 52–60]
- YAN Y J, CAO Z M, DING W D, *et al.* On genetic diversity analysis of 6 populations of *Siniperca chuatsi* in Jiangsu Province. *Marine Fisheries*, 2019, 41(1): 25–33 [颜元杰, 曹哲明, 丁炜东, 等. 江苏省6个翘嘴鲈群体的遗传多样性分析. *海洋渔业*, 2019, 41(1): 25–33]
- YAO N, SONG Y, WANG S, *et al.* Toxicity of salinity and alkalinity to *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day) of Tarim River. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(2): 423–428 [姚娜, 宋勇, 王帅, 等. 盐度和碱度对塔里木河叶尔羌高原鳅毒性的研究. *西南农业学报*, 2018, 31(2): 423–428]
- ZHAI Y, WU R X, NIU S F, *et al.* Isolation and characterization of dinucleotide microsatellite loci for *Lateolabrax maculatus* using next generation sequencing technology. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(2): 507–513 [翟云, 吴仁协, 牛素芳, 等. 采用高通量技术开发花鲈二碱基重复微卫星标记. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(2): 507–513]
- ZHANG Z, YU D, LIU F, *et al.* Isolation of microsatellite loci and diversity analysis of *Sinogastromyzon sichangensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1224–1230 [张智, 俞丹, 刘飞, 等. 西昌华吸鳅的微卫星引物筛选及赤水河四个地理种群的遗传多样性分析. *水生生物学报*, 2019, 43(6): 1224–1230]

The Analysis of Genetic Diversity of *Triplophysa yarkandensis* (Day) from Five Geographic Populations in the Tarim River Basin

WANG Jinxiu, REN Daoquan, WANG Xinyue, CHEN Sheng'ao, SONG Yong^①

(College of Animal Science, Tarim University, Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production and Construction, Alar, Xinjiang 843300, China)

Abstract To study the genetic diversity of *Triplophysa yarkandensis* in the Tarim River basin, high-throughput sequencing was used to sequence the genome of *T. yarkandensis*. We screened for qualified microsatellite loci and designed 100 primers pairs for PCR. A high-throughput sequencing platform was used to randomly sequence the genome of *Riplophysa yarkandensis* and eligible microsatellite loci were selected to design primers for PCR. Finally, 39 primers pairs with polymorphisms were selected. Fifteen pairs were randomly selected to be amplified in the five river populations of *T. yarkandensis*. The results showed that the average and effective alleles of the five *T. yarkandensis* populations were 48.467 and 15.181, respectively. The observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.578 and 0.929, respectively. The polymorphism information content (PIC) was 0.893. The index of gene differentiation (F_{st}) was 0.102. The highest number of alleles was in Che'erchen Lake (18.143), and the lowest number of alleles was in the Akesu River (10.429). The observed heterozygosity of the Akesu River group was the highest (0.706), while the observed heterozygosity of the Taitema Lake group was the lowest (0.517). The polymorphic information content of the Algan population was the highest (0.877), and the polymorphic information content of the Akesu River population was the lowest (0.760). The genetic distance between the Akesu River and Tainan River populations was the smallest (0.606), while the genetic distance between the Algan River and Tainan River populations was the largest (1.901). The genetic similarity between the Algan and Tainan River populations was low (0.149), and the genetic similarity between the Akesu and Tainan River populations was high (0.545). Genetic structuring showed that Che'erchen and Taitema Lakes, Akesu and Tainan Rivers, and the Algan group clustered in one branch. The results of this study show that there are differences among *T. yarkandensis* populations in the Tarim River, but gene exchange is ongoing.

Key words *Triplophysa yarkandensis*; Microsatellite; Primer selection; Genetic diversity; Genetic differentiation

① Corresponding author: SONG Yong, E-mail: 99841449@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200324002

http://www.yykxjz.cn/

闫允君, 卢霞, 孟宪红, 栾生, 陈宝龙, 孔杰. 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, 2021, 42(4): 55–63

YAN Y J, LU X, MENG X H, LUAN S, CHEN B L, KONG J. Screening of genes related to muscle growth under the *Myostatin* regulation by RNA-seq in *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 55–63

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*



闫允君¹ 卢霞² 孟宪红² 栾生² 陈宝龙² 孔杰^{1,2①}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 江苏 无锡 214081;

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

摘要 *Myostatin* (*Mstn*)即肌肉生长抑制素,在脊椎动物中是胚胎期肌肉形成和成体肌肉生长的主要调控因子之一,通过抑制肌细胞的扩增和分化而抑制肌肉的生长和发育。为了筛选在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)中 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的基因,为肌肉生长调控机理奠定基础,本研究利用 RNA-Seq 技术对 PBS 对照组和 *Mstn* 表达抑制组进行了测序分析。结果显示, *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。参考脊椎动物 *Mstn* 调控的肌肉生长经典信号通路 TGF- β /Smad 和 MAPK 通路及差异基因功能已有报道,初步筛选出 29 个 *Mstn* 调控的与肌肉生长相关的基因。在涉及 TGF- β /Smad 和 MAPK 通路的 16 个基因中,除 *ActRI* 被检测到略微上调外,其他基因均表现出不同程度的下调;在另外 13 个涉及蜕皮、肌肉生长等过程的基因中,促进肌肉生长的基因显示为上调。前期的研究表明, *Mstn* 可能同脊椎动物功能类似,在中国对虾中负向调控肌肉生长,而本研究结果提供了进一步的证据,为阐明对虾的肌肉发育调控机制提供了重要基础。

关键词 *Mstn*; 转录组; 基因筛选; 信号通路; 肌肉生长发育

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0055-09

肌肉生长抑制素(*Myostatin*, *Mstn*)基因,也称为生长和分化因子-8(GDF-8),是动物肌肉发育和生长过程中的负调控因子,在脊椎动物的研究中,发现 *Mstn* 主要在肌肉组织中表达,并负向抑制肌肉生长和调节发育(Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997)。 *Mstn* 对肌肉生长发育的作用为促进动物生产、增加

市场利润提供了新途径,随着对 *Mstn* 研究的不断深入,其肌肉调控机制和相关基因功能也越来越完善。 *Mstn* 作为胞外信号分子,可与成肌细胞膜上的受体结合引起受体自身的磷酸化,启动细胞内一系列信号传导过程,作用于生肌分化抗原(Myod)靶基因的调控区,进而调控肌肉的形成和分化(Morikawa *et al.*,

* 国家重点研发计划(2018YFD0900103)和国家自然科学基金联合基金项目(U1706203)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900103), and Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U1706203)]. 闫允君, E-mail: yanyunjunou@163.com

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

收稿日期: 2020-03-24, 收修改稿日期: 2020-04-09

2016)。脊椎动物 *Mstn* 功能的发挥主要通过参与调控 TGF- β /Smad 通路活性而参与肌肉的生长和发育。目前,公认的 *Mstn* 的信号传导途径是 *Mstn*-ActR II B 型受体(蛋白激酶受体)-Smad 蛋白信号传导通路。Smads 是细胞质内 TGF- β 信号转导分子,可直接与 DNA 结合,它们可以将 TGF- β 信号直接由细胞膜导入细胞核内。Langley 等(2003)研究发现, *Mstn* 对成肌细胞分化的抑制正是通过 Smad3 抑制 MyoD 的活性与表达实现的,其能够使成肌细胞不能分化形成肌管,阻碍了肌肉的形成。除了典型的 Smad 介导的信号途径外, *Mstn* 也通过 MAPK 途径,包括 p38、Erk 1/2 和 JNK 途径参与肌肉发育的信号转导,如成熟的 *Mstn* 可分别通过 TAK1-MKK6、Ras-MEK1 和 TAK1-MKK4 级联激活 p38 MAPK、Erk 1/2 和 JNK 通路,参与调控肌肉发育(Huang *et al.*, 2011)。

Mstn 对肌肉生长发育的作用,不仅仅局限于脊椎动物,对无脊椎动物 *Mstn* 的研究也发现其参与并调控无脊椎动物肌肉生长(Li *et al.*, 2016; Zhuo *et al.*, 2017),但与脊椎动物 *Mstn* 调控的肌肉发育机制相比,无脊椎动物的研究相对滞后,目前其调控模式和相关基因功能仍不清楚。转录组分析是揭示分子机制的主流方法,其可以分析特定条件下基因表达情况,挖掘生物网络调控和分子机理,为基因功能研究提供新的思路。RNA 干扰可以有效地沉默靶基因的表达,进而影响通路中基因表达量的变化, RNA 干扰后从转录水平检测基因的表达变化,可以为阐释基因功能及其调控网络提供基础。

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)作为无脊椎动物甲壳类的典型代表,具有较高的经济价值,但其海捕量极低,基本依靠养殖供给市场,而养殖产量远远满足不了市场消费的需求,加之群体的生长性状选育进展缓慢且规格整齐度较差,利用分子手段来提高产量已迫在眉睫。我们前期对中国对虾的初步研究表明, *Mstn* 可能与脊椎动物类似,负向调控中国对虾肌肉生长(Kong *et al.*, 2020)。因此,本研究拟通过生物信息学的方法发掘 *Mstn* 调控体系中与肌肉生长发育有关的基因与通路,为探索无脊椎动物 *Mstn* 的作用机制及肌肉发育调控模式提供更多证据。本研究通过 RNA 干扰方法沉默中国对虾 *Mstn* 基因,采用高通量测序技术对其进行转录组测序分析,根据分析结果,参考脊椎动物肌肉发育调控模式和差异基因的功能,初步筛选出受 *Mstn* 调控、与肌肉发育相关的重要基因,了解其在脊椎动物和无脊椎动物中的异同之处,为解析对虾肌肉发育调控机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验地点与材料

实验所用中国对虾取自山东省青岛市即墨区鳌山卫镇黄海水产遗传育种中心第 14 代选育群体。养殖期间温度范围为 21 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C,每日换水量 30%,每日投喂配方颗粒饲料和新鲜的菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*),日投喂总量为中国对虾湿重的 5%。将体重无显著差异的中国对虾分成 2 组,分别置于 500 L 养殖箱中暂养 7 d。暂养结束后,分别对实验虾的肌肉尾部注射 PBS (对照组)和 *Mstn*-siRNA [生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成](实验组),于注射后 12 h 取肌肉组织,每组取 6 尾,每尾取 2 份相同的肌肉组织,一份用于抑制效果检测,另一份用于转录组测序分析。所有样品于液氮中保存。

1.2 实验方法

1.2.1 *Mstn* 基因 RNA 干扰 中国对虾 *Mstn* 基因干扰实验所用干扰链 siRNA (F: GCUGAAUACCCUA AUGAAATT; R: UUUCAUUAGGGUAUAGCTT),由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。以 1 μ g/g 的剂量通过尾部肌肉注射至中国对虾体内,于注射后 12 h 取肌肉组织,每组取 6 尾,通过 qRT-PCR ($n=6$)分别检测相对表达量,计算抑制效率。

1.2.2 总 RNA 提取和反转录 用 Trizol (TaKaRa)法提取中国对虾肌肉组织总 RNA,用分光光度计(NanoDrop 2000, 美国)测定 $A_{260\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$ 值,检测 RNA 纯度和浓度,用 1.5%的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。使用 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa)试剂盒,按照说明书进行总 RNA 的反转。反转录完成后,将 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C,以进行下一步 qRT-PCR。

1.2.3 实时相对荧光定量(qRT-PCR) 根据 Zhang 等(2008)的方法,以 *18S* 作为内参基因,根据中国对虾 *Mstn* (*FcMstn*) ORF 序列(NCBI 登录号: MG437236)设计 *Mstn* 基因实时相对定量特异性引物(表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

为了验证转录组表达数据,根据转录组测序结果查找到相关基因的序列,通过 PCR 成功扩增并验证 *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 基因的编码区序列,根据编码区序列,分别设计引物用于 qRT-PCR 的特异性引物(表 1)。所有引物通过 PCR 检测并测序,确保目的片段特异性扩增和序列的准确性。使用 SYBR PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa, 日本)置于 ABI QuantStudio 3 系统中进行 qRT-PCR 分析。*FcMstn* 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 qRT-PCR 所需引物
Tab.1 Primers used in the qRT-PCR

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>Mstn</i>	qRT-Mstn-F	GATGCGACTGGCTTGAAACT
	qRT-Mstn-R	CGAATGAAGGAAGCTCCGAA
<i>ActR II</i>	qRT-ActR II -F	TGAAGAGCAGCAAGCCACCAAG
	qRT-ActR II -R	CAGCGCCAGGCCAAAGTCAG
<i>Smad1/5</i>	qRT-Smad1-F	ATCAAGCAGACGCAGCAGAC
	qRT-Smad1-R	CCGTGGGCATGAAAGACCTC
<i>Smad3</i>	qRT-Smad3-F	GAAGACCCGAACACTCGCTG
	qRT-Smad3-R	ATGTGCAGTGGTCAAGAGCG
<i>Smad6</i>	qRT-Smad5-F	ATCGTGCACAAGCTTCTCC
	qRT-Smad5-R	GCACCGAGTTCTGGTCGATG
18S	18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
	18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

1.2.4 转录组测序分析 通过 qRT-PCR 分析对照组和实验组相对表达量, 确保实验组中 *FcMstn* 基因表达被有效抑制后, 取出液氮中保存的样品, 使用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)进行总 RNA 的提取, 用 1.5%的琼脂糖电泳检查 RNA 完整性, NanoDrop2000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度, 所有指标经检测合格后, 根据 qRT-PCR 的检测结果选取抑制效果最好的 3 个样品, 交送至广州基迪奥生物科技有限公司进行 cDNA 文库的构建以及高通量测序, 产出样品测序原始数据(raw reads), 对原始数据进行接头及低质量 reads 去除处理, 获得高质量的 clean 数据, 使用短 reads 组装软件 Trinity 对高质量 clean 数据进行 *de novo* 组装(Liang *et al*, 2013)得到 unigene。

组装得到的高质量 unigene 按照 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG (E -value<0.000 01)的优先级进行 Blast 比对, 得到与已有 unigene 具有最高相似性的同源序列, 从而得到该 unigene 的功能注释信息。基因表达量通过 FPKM(Mortazavi *et al*, 2008)方法进行标准化, 差异表达基因的阈值设置为 P_{adj} (矫正后 P -value)<0.05 和 \log_2 Fold ≥ 1 (C 组和 E 组), 使用 DEGseq (Wang *et al*, 2010)软件对差异表达 unigene 进行分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 干扰效果分析

通过 qRT-PCR 方法分析检测 C 组和 E 组 *FcMstn* 的相对表达水平, 结果显示, E 组的 *FcMstn* 相对表达量显著低于 C 组, 抑制率达到 76% (图 1)。

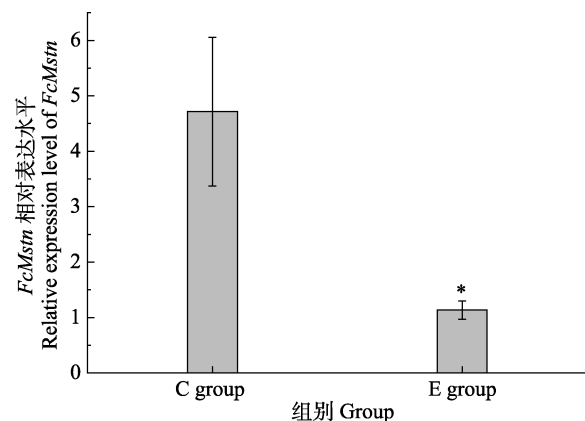


图 1 *FcMstn* 在对照组(C)和实验组(E)肌肉组织中的相对表达水平

Fig.1 Relative expression level of *FcMstn* in muscle in the control (C) and experimental (E) groups

“*”表示两组间具有显著性差异($P<0.05$)。下同
“**” indicates significant difference between two groups ($P<0.05$). The same as in Fig.4

2.2 数据组装和差异基因统计

将符合测序标准的 C 组和 E 组的肌肉组织总 RNA 送至广州基迪奥生物科技有限公司进行高通量测序和质量控制, 结果显示, 共产生 36,605 个 unigenes, Q30 碱基为 94.05%, N50 位 1107 bp, 表明测序质量良好, 组装完整性较高, 可用于后续的分析(表 2)。对获得的全部新基因与 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG 数据库进行比对, 获得注释信息的基因总数为 19,628 个, 占新基因总数的 53.62% (表 3)。在对照组和实验组样品中, 共筛选到 1657 个差异表达基因, 包括 805 个上调基因和 852 个下调基因(图 2)。

表2 转录组组装数据的特性
Tab.2 Characteristics of assembly data

指标 Parameter	数值 Value
Q30	94.05%
unigene 数目	36.605
unigene GC 含量	49.096
unigene 中位长度	379 bp
unigene N50	1107 bp

表3 四大数据库注释统计
Tab.3 Annotation statistics of four databases

项目 Items	数值 Value
Total unigenes	36,605
Nr	18,948
Swissprot	12,784
KOG	11,260
KEGG	10,067
Annotation genes	19,628
Without annotation gene	16,977

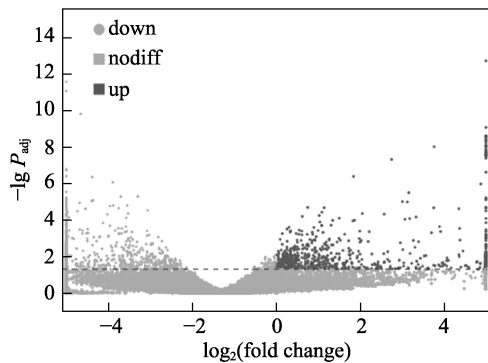


图2 中国对虾 *Mstn* 基因 RNA 干扰转录组差异基因火山图

Fig.2 Volcano plot of differentially expressed gene distribution of *FcMstn* RNA interference transcriptome

$P_{adj} < 0.05$ 为差异基因筛选标准。有显著性差异表达的基因用红色点(上调)和黄色点(下调)表示, 无显著性差异表达的基因用蓝色点表示

The screening standard of differential genes is $P_{adj} < 0.05$. Red dots indicate the up-regulated genes with significant differences, yellow dots indicate the down regulated genes with significant differences, and no significant difference in the expression of genes with blue dots

2.3 *Mstn* 调控的肌肉发育相关基因的筛选

参考脊椎动物肌肉经典信号通路调控模式和差异基因的功能,初步筛选出肌肉发育相关的基因(表4和表5)。从中国对虾转录组数据中查找到 *Mstn*, 实验组表达显著降低($\log_2fc = -4.31$), 和定量结果一致, 进一步证明了 RNA 干扰的有效性。参考脊椎动物肌肉经典信号通路调控模式,从中国对虾转录组数据中

共筛选到 16 个参与其调控通路的基因。其中,参与 TGF- β /Smad 信号通路的筛选到 12 个基因,除 *Mstn* 外,其他分别为 3 个卵泡抑素(follistatin, FST)家族成员(FST、FST Like 1 和 FST Like 5)基因, 3 个激活素受体(activin receptor, ActR)成员(ActRIA、ActRIB 和 ActRII)基因, 4 个 Smad 蛋白家族成员(Smad1/5、Smad3、Smad4 和 Smad6)基因和 1 个骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族成员(BMP-7)基因。参与 MAPK 信号通路的筛选到 4 个基因,分别为 *p38*、*Erk*、*Ras* 和 *MAP3K7* 基因。通过基因的功能筛选到的非经典信号通路的与肌肉生长、蜕皮过程等密切相关的基因有 14 个,其中包括 α -骨骼肌肌动蛋白(α -skeletal muscle actin)、肌球蛋白重链(myosin heavy chain)和肌钙蛋白 C (troponin-C)基因, 涉及蜕皮过程的蜕皮羧肽酶 A(molting fluid carboxypeptidase A)、蜕

表4 筛选到的参与 *Mstn* 调控的 TGF- β /Smad 和 MAPK 信号通路的差异基因

Tab.4 Genes screening of TGF- β /Smad 和 MAPK signal pathway regulated by *Mstn*

通路 Pathway	基因 Gene	表达模式 Expression pattern(\log_2fc)
TGF- β /Smad pathway	Myostatin (<i>Mstn</i>)	-4.31
	Follistatin (<i>FST</i>)	-1.81
	Follistatin-like 1 (<i>FSTL1</i>)	-2.99
	Follistatin-like 5 (<i>FSTL5</i>)	-8.12
	bone morphogenetic protein 7 (<i>BMP-7</i>)	-2.19
	Activin receptor IA (<i>ActR IA</i>)	-1.05
	Activin receptor IB (<i>ActR IB</i>)	0.87
	Activin receptor II (<i>ActR II</i>)	-3.36
	<i>Smad 1/5</i>	-0.91
	<i>Smad 3</i>	-0.65
	<i>Smad 4</i>	-0.77
	<i>Smad 6</i>	-2.17
MAPK pathway	<i>P38 MAPK</i>	-1.06
	<i>Ras</i>	-2.70
	<i>MAP3K7</i>	-0.89
	<i>Erk</i>	-9.07

注: \log_2fc 表示 C 组和 E 组表达量的差异倍数, 正值表示 E 组表达量上调, 负值表示下调, 数值的绝对值代表上调或下调程度的大小。下同

Note: \log_2fc represents the ratio of the expression of C and E group, positive value represents up-regulation and negative value represents down-regulation. The absolute value represents the degree of up-regulation or down-regulation. The same as below

皮质激素受体 HR3、蜕皮激素受体 HR38、几丁质结合蛋白(chitin-binding protein) PCP20 和 CP14.6 型、几丁质酶(chitinase 1)、表皮蛋白(cuticle protein)基因, 参与肌肉生长的锌指蛋白 MLP84B (muscle LIM protein 84B, MLP 84B)、谷氨酰胺合成酶 2 (glutamine synthetase 2)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF-binding protein)以及其参与脂肪代谢的脂肪酸结合蛋白 7 (fatty acid binding protein 7)基因。这些基因在 *Mstn* 被抑制后, 表现出不同程度的上调或下调表达模式(表 5)。在这些参与信号通路的相关基因中, 除 *ActR1B* 基因表现略微上调外, 其他基因均显示出不同程度的下调, 其中, *Erk*、*Wnt6*、*FSTL5*、*Mstn* 这 4 个基因下调表达变化较大。在非经典信号通路涉及的其他相关基因中, 检测到 8 个基因(谷氨酰胺合成酶 2、胰岛素样生长因子结合蛋白、 α -骨骼肌肌动蛋白、2 种几

丁质结合蛋白、蜕皮激素受体 3、蜕皮羧肽酶 A 和脂肪酸结合蛋白 7)上调, 其中, 几丁质结合蛋白 CP14.6、蜕皮羧肽酶 A、蜕皮激素受体 3 这 3 个与蜕皮相关的基因上调变化较大; 其他 6 个基因表现下调趋势, 其中, 肌钙蛋白 C、肌球蛋白重链、几丁质酶 ChiA 和表皮蛋白下调变化较大。

2.4 转录组数据的验证

为了验证转录组数据, 本研究根据转录组数据相关基因的序列, PCR 成功扩增并测序验证了 *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 的编码区序列, 并进一步设计特异性引物检测了这些基因在 PBS 对照组和 RNA 实验组 12 h 的表达。结果显示, *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 的表达量均显著下调, 这与转录组数据的下调趋势是一致的, 但下调程度有所差异。

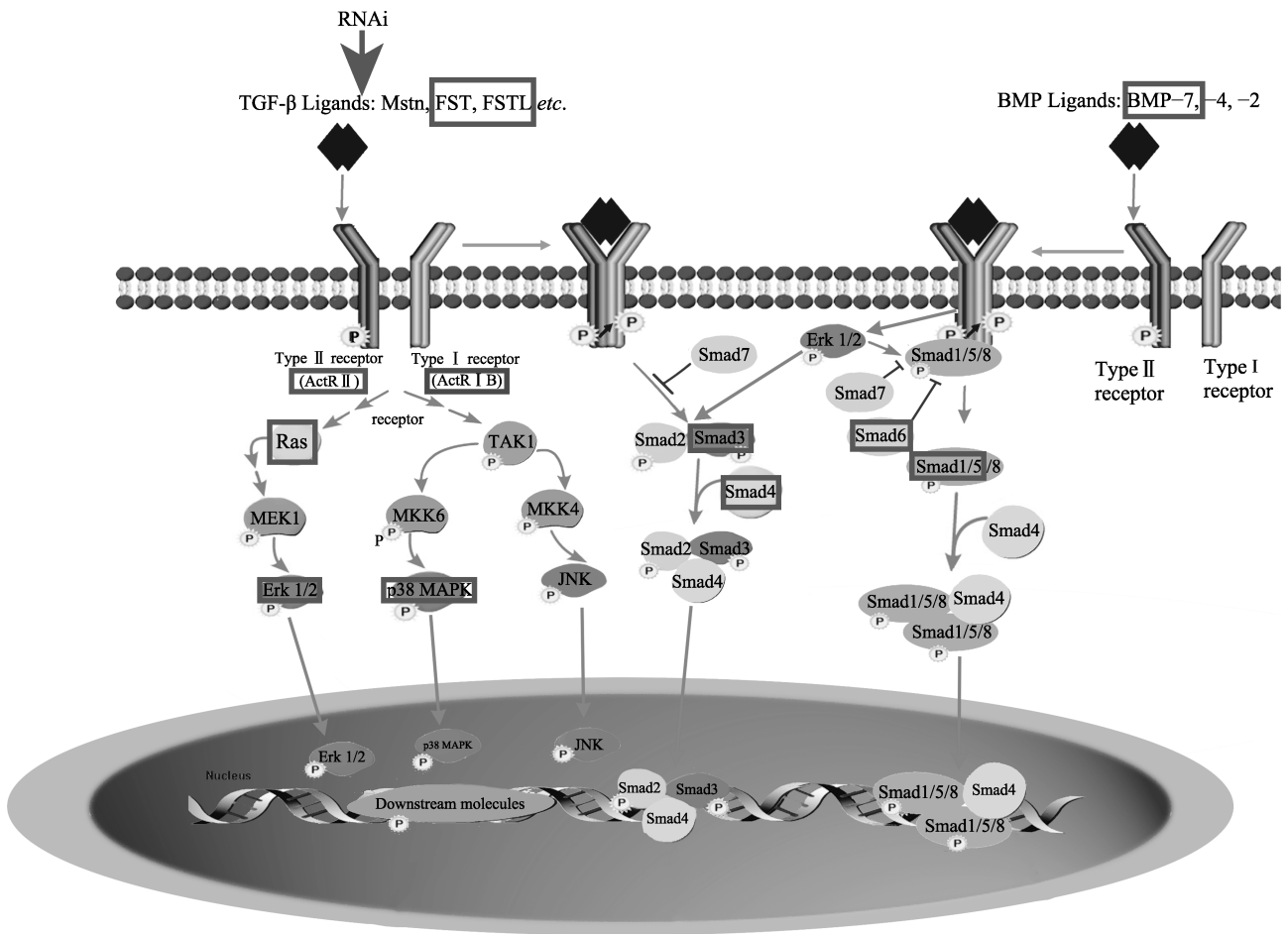


图 3 脊椎动物肌肉发育 TGF- β /Smad 信号通路

Fig.3 TGF- β /Smad signaling pathway related to muscle development in vertebrates

在中国对虾转录组数据中查找的基因用方框框出, 其中, 绿色框表示下调, 红色框表示上调
The genes from the transcriptome data of *F. chinensis* were boxed, in which the green box indicated down regulation and the red box indicated up regulation

表5 筛选到的 *Mstn* 调控的肌肉生长发育相关的差异基因
Tab.5 Screening of other genes related to muscle development regulated by *Mstn*

基因 Gene	表达模式 Expression pattern (log ₂ fc)	功能 Function
锌指蛋白(肌肉 LIM 蛋白 84B) Zinc finger protein (Muscle LIM protein 84B, MLP 84B)	-1.17	参与肌肉生成过程中基因转录的调控
谷氨酰胺合成酶 2 Glutamine synthetase 2	2.05	促进肌肉生长, 防止肌肉蛋白分解
胰岛素样生长因子结合蛋白 IGF-binding protein	0.88	与胰岛素样生长因子结合, 促进生长
α -骨骼肌肌动蛋白 α -Skeletal muscle actin	0.43	骨骼肌纤维的主要蛋白质, 调节肌肉运动
肌钙蛋白 C Troponin-C	-4.36	参与肌肉收缩和放松
肌球蛋白重链 Myosin heavy chain	-3.89	肌肉的主要组成蛋白质, 为肌肉收缩提供力
几丁质结合蛋白(PCP20) Chitin-binding protein (PCP20)	3.92	在表皮形成、维护及功能的调节中起重要作用
几丁质结合蛋白 (CP14.6) Chitin-binding protein (CP14.6)	13.94	在表皮的形成、维护以及功能的调节中起重要作用
蜕皮激素受体 3 HR3	6.11	蜕皮调节转录因子, 调控蜕皮过程中相关基因的表达
蜕皮激素受体 38 HR38	-2.41	调控蜕皮激素早期应答基因、碳水化合物的代谢、表皮的形成
几丁质酶(查尔酮黄烷酮异构酶) Chitinase (ChiA)	-9.04	消化吸收老的角质层, 参与蜕皮过程
蜕皮羧肽酶 A molting fluid carboxypeptidase A	5.16	降解旧表皮, 参与蜕皮过程
表皮蛋白 Cuticle protein	-7.90	与几丁质结合形成纤维骨架控制表皮的钙化, 对新表皮的形成起到极其重要的作用, 参与蜕皮过程
脂肪酸结合蛋白(脂肪酸结合蛋白 7) Fatty acid binding protein (FABP7)	0.02	能结合及溶解长链多不饱和脂肪酸, 具有脂肪酸摄取及向胞内转运等功能, 调控细胞内的脂质代谢平衡

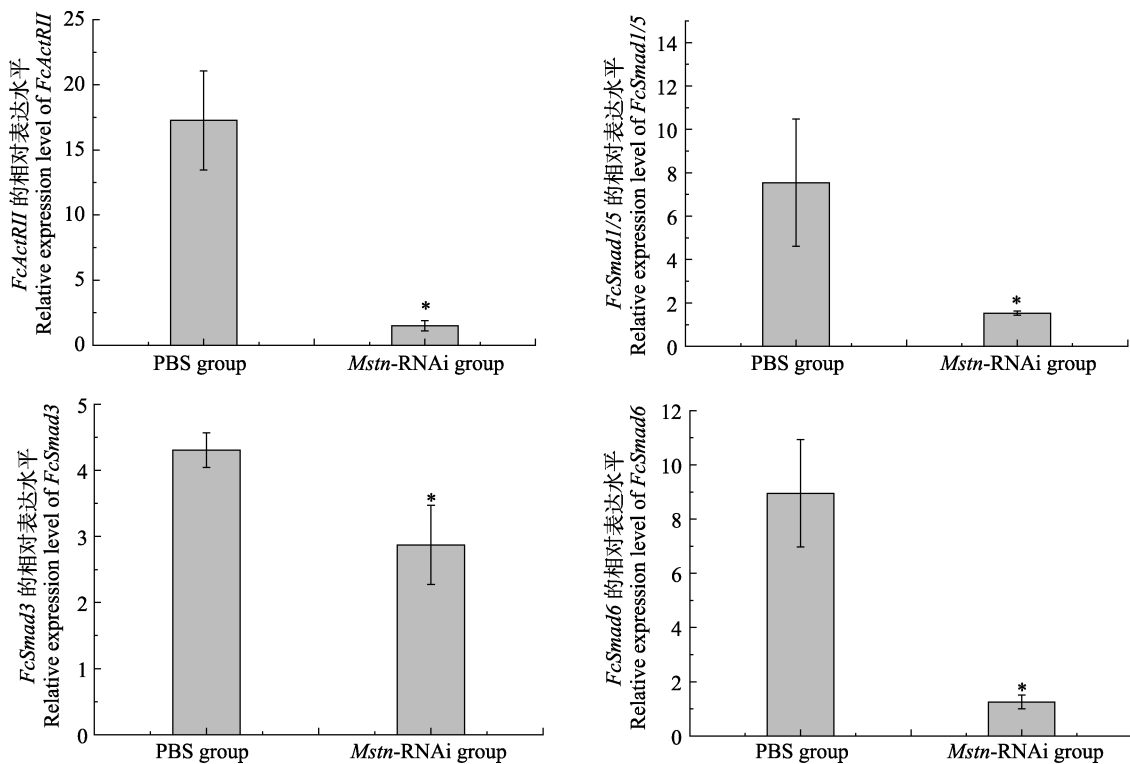


图4 对照和实验组肌肉中 *FcActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* mRNA 的相对表达

Fig.4 Relative expression of *FcActR II*, *Smad1/5*, *Smad3*, and *Smad6* mRNA in muscle in control and experimental groups

3 讨论

前期研究表明, 中国对虾 *Mstn* 可能与脊椎动物类似, 负向调控中国对虾肌肉生长(Kong *et al*, 2020)。鉴于目前尚不清楚在无脊椎动物中 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的基因, 本研究以中国对虾为材料, 利用转录组分析的方法筛选了 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的重要基因。

在脊椎动物中, 肌肉生长发育主要涉及到 TGF- β /Smad (Thomas *et al*, 2000)、MAPK (Freudenberg *et al*, 2004)、Hedgehogs(Hh) (Munsterberg *et al*, 1995)、Wnt (Logan *et al*, 2004)等经典信号通路。在脊椎动物 *Mstn* 介导的 Smad 信号通路中, *Mstn* 能够结合多种蛋白, 如其前肽、FST、FSTL, 以及能阻断 *Mstn* 信号转导的其他物质, 如 ActR II B 等拮抗剂, 从而调节自身的激活, 随后通过 Smad2 和 Smad3 参与的 Smad 信号通路激活细胞核内相关靶基因发挥对肌肉的调控作用(Huang *et al*, 2011)。在脊椎动物 BMP 介导的 Smad 信号通路中, BMP 家族成员配体通过 Smad1/5/8 参与的 Smad 信号通路进入细胞核内, 最终启动靶基因转录。除了典型的 Smad 介导的信号途径外, MAPK 途径包括 p38、Erk1/2 和 JNK 途径, 也参与了肌肉发育的信号转导。在本研究中, 参考脊椎动物肌肉生长发育较为经典的 TGF- β /Smad 和 MAPK 通路筛选到包含 *Mstn* 在内的 16 个相关信号通路基因, 其中只有 ActR IB 表现出轻微上调, 其他基因均表现出不同程度的下调, 表明 *Mstn* 被抑制后, 存在的上下游关系可能与脊椎动物类似, 进一步说明中国对虾肌肉生长涉及的 TGF- β /Smad 信号通路和 MAPK 信号通路可能与脊椎动物大体类似。脊椎动物中, FST 和 FSTL 具有促进肌肉生长的功能, 但其功能的发挥依赖于其与 *Mstn* 蛋白的 C 端配基结合, 从而抑制 *Mstn* 与其受体结合, 负性调节 *Mstn* 的功能(Matzuk *et al*, 1995; Lee *et al*, 2001; Li *et al*, 2011), 因此, 本研究 *Mstn* 基因被抑制也可能导致 FST 家族蛋白的下调。

不同于脊椎动物生长, 中国对虾的肌肉生长发育是经过多次蜕皮实现的, 蜕皮过程伴随着旧表皮的脱落、新表皮的形成和肌肉的收缩舒张等过程。除了参与经典的肌肉发育信号通路基因外, 本研究也筛选出一些与蜕皮、肌肉生长和肌肉收缩等相关的基因, 可见这些基因对肌肉的生长发育和蜕皮也起着至关重要的作用。本研究根据差异基因的功能初步筛选出 14 个与肌肉生长、肌肉运动和蜕皮相关的基因。其中, 锌指蛋白 MLP84B、谷氨酰胺合成酶 2、胰岛素样生长因子结合蛋白与肌肉发育密切相关, 促进肌肉

生长和发育的谷氨酰胺合成酶和胰岛素样生长因子结合蛋白基因被检测到上调, 提示 *Mstn* 的抑制可能会促进肌肉的生长。蜕皮羧肽酶 A、蜕皮激素受体 HR3、蜕皮激素受体 HR38、几丁质结合蛋白、几丁质酶、表皮蛋白可能与蜕皮过程密切相关, 甲壳动物通过周期性蜕去旧的表皮, 产生新表皮来进行生长发育。甲壳类蜕皮过程是一个有众多基因互相作用协同的复杂过程, 中国对虾 *Mstn* 被抑制后, 蜕皮相关的基因也出现了不同程度的上下调表达, 表明由 *Mstn* 抑制引起的相关肌肉应答系统的改变也能引起蜕皮相关基因的变化, 而具体这些基因如何作用于蜕皮过程还需要更多的研究。脊椎动物中研究报道 α -骨骼肌肌动蛋白、肌球蛋白重链和肌钙蛋白 C 参与肌肉收缩和放松(Rayment *et al*, 1993; Polyakov *et al*, 1997; Farah *et al*, 1999), 中国对虾的生长发育、运动觅食和蜕皮等生命活动都离不开肌肉收缩与舒张, 中国对虾 *Mstn* 的抑制能够引起这些基因的差异表达, 表明这些基因很可能在中国对虾肌肉生长和蜕皮中发挥着关键的作用。

综上所述, 本研究通过 RNA 干扰有效沉默 *Mstn* 基因, 利用转录组测序分析, 参考脊椎动物肌肉发育调控模式和差异基因功能, 首次在无脊椎动物中筛选出了 *Mstn* 调控的与肌肉生长发育相关的基因, 这些基因将为后续深入解析无脊椎动物肌肉调控网络和调控机制提供有价值的信息, 关于这些基因在对虾中的生理功能及其 *Mstn* 调控的肌肉发育调控模式还需开展更多探索。

参 考 文 献

- FARAH C S, REINACH C F. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB Journal*, 1999, 9: 755-767
- FREUDENBERG J A, CHEN D, CHEN W T. Stable suppression of membrane type 1 matrix metalloproteinase impairs MMP-2 activation, cell invasion, and tumorigenesis. *Cellular, Molecular, and Tumor Biology*, 2004, 64(S7): 529-530
- HUANG Z, CHEN X, CHEN D. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular Signalling*, 2011, 23(9): 1441-1446
- KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T P L, *et al*. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 1997, 7(9): 910
- KONG J, YAN Y, LU X, *et al*. Integrative phenotypic and gene expression data identify myostatin as a muscle growth inhibitor in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5985

- LANGLEY B, THOMAS M, BISHOP A, *et al.* Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 277(51): 49831–49840
- LEE S J, MCPHERRON A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98(16): 9306–9311
- LI S, ZHOU Z, DONG Y, *et al.* Molecular characterization, expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 201: 12
- LI X, NIE F, YIN Z, *et al.* Enhanced hyperplasia in muscles of transgenic zebrafish expressing Follistatin1. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(2): 65–71
- LIANG C, LIU X, YIU S M, *et al.* De novo assembly and characterization of *Camelina sativa* transcriptome by paired-end sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 146
- LOGAN C Y, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20(1): 781–810
- MATZUK M M, LU N, VOGEL H, *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 1995, 374(6520): 360–363
- MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(23): 12457–12461
- MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(5): a021873
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Natural Methods*, 2008, 5(7): 621–628
- MUNSTERBERG A E, KITAJEWSKI J, BUMCROT D A, *et al.* Combinatorial signaling by sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes and Development*, 1995, 9(23): 2911–2922
- POLYAKOV A A, GUSEV N B. Utilization of troponin C as a model calcium-binding protein for mapping of the calmodulin-binding sites of caldesmon. *Biochemical Journal*, 1997, 321(3): 873–878
- RAYMENT I, HOLDEN H, WHITTAKER M, *et al.* Structure of the actin- myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993, 261(5117): 58–65
- THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(51): 40235–40243
- WANG L, FENG Z, WANG X, *et al.* DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136–138
- ZHANG Q, LI F, ZHANG X, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 584–591
- ZHUO R Q, ZHOU T T, YANG S P, *et al.* Characterization of a molt-related myostatin gene (*FmMstn*) from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 248: 55–68

(编辑 冯小花)

Screening of Genes Related to Muscle Growth under the *Myostatin* Regulation by RNA-Seq in *Fenneropenaeus chinensis*

YAN Yunjun¹, LU Xia², MENG Xianhong², LUAN Sheng², CHEN Baolong², KONG Jie^{1,2}①

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract *Myostatin* (*Mstn*) is one of the main regulatory factors of embryonic muscle formation and adult muscle growth in vertebrates, which inhibits muscle growth and development by inhibiting the expansion and differentiation of muscle cells. Our previous researches have preliminarily suggested that *Mstn* involved in myogenesis and muscle growth probably as a negative regulator in *Fenneropenaeus chinensis* like vertebrates. In order to screen genes related to muscle growth regulated by *Mstn* in *F. chinensis* and understand the mechanism of muscle growth regulation, RNA-Seq technology was used to sequence control group injected PBS and experimental group injected siRNA for inhibition of *Mstn* expression. The results showed that a total of 36,605 unigenes were produced and 19,628 genes were annotated by transcriptome analysis. Under the inhibition of *Mstn* expression by RNAi, a total of 1657 differentially expressed genes were screened, of which 805 genes were significantly up regulated and 852 genes were significantly down regulated. Referring to the previous reports of TGF- β /Smad and MAPK pathways as well as function of differential genes, 29 genes related to muscle growth regulated by *Mstn* were preliminarily screened. In these genes, 16 genes were involved in TGF- β /Smad and Mapk pathways. Among the 16 genes, only the ActRI was detected to be slightly up-regulated and other genes showed different degrees of down-regulation. The other screened 13 genes were involved in molting, muscle growth and other processes related muscle such as muscle contractions, of which the genes correlated with promoting muscle growth were detected up-regulation. The results of this study provided further evidence for our previous studies that *Mstn* probably negatively regulates muscle growth in a similar way to vertebrate in *F. chinensis*. Our results will also provide important theoretical basis for the regulation mechanism of muscle development in invertebrate.

Key words *Mstn*; Transcriptome; Gene screening; Signal pathway; Muscle growth and development

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200315002

http://www.yykxjz.cn/

郑芯瑜, 刘必林, 孔祥洪, 王雪辉. 基于 *K*-means 动态聚类的鸢乌贼角质颚模式识别. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 64–72
ZHENG X Y, LIU B L, KONG X H, WANG X H. Pattern of recognition beaks in *Sthenoteuthis oualaniensis* based on *K*-means dynamic clustering. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 64–72

基于 *K*-means 动态聚类的鸢乌贼 角质颚模式识别*



郑芯瑜¹ 刘必林^{1,2①} 孔祥洪¹ 王雪辉³

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 上海海洋大学
国家远洋渔业工程技术研究中心 农业农村部大洋渔业开发重点实验室 农业农村部大洋渔业资源环境
科学观测实验站 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300)

摘要 本研究采用 *K*-means 动态聚类算法, 对 2014—2019 年间采集于西北印度洋、热带东太平洋、中国南海的鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)样本的角质颚进行识别。基于 *K*-means 动态聚类算法能够很好地区分来自 3 个海区的鸢乌贼, 对数据进行 *z*-score 标准化后, 任选 2 维角质颚形态学参数以曼哈顿距离和欧氏距离进行 *K*-means 动态聚类分析, 总正确区分率分别为 86.7% 和 88.7%。*K*-means 动态聚类算法对于鸢乌贼角质颚的识别有很大的参考价值, 后续改进优化 *K*-means 算法使其具有普适性, 将会提高鸢乌贼种群的识别能力。

关键词 鸢乌贼; 角质颚; 模式识别; 曼哈顿距离; 欧氏距离

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)04-0064-09

头足类作为海洋食物链中重要的一环, 研究其分类状况可为其他捕食者的食性分析提供有力依据, 同时, 为进一步研究海洋食物网关系、生态系统能量流动情况以及资源评估提供重要基础(刘必林等, 2009; 范江涛等, 2015)。头足类的软组织(如胴体、腕足部等)与硬组织(如角质颚、内壳、耳石等)均可用作其种群和种类的判别, 一般认为硬组织比软组织更有效(Borges, 1990; 胡飞飞等, 2017)。作为头足类硬组织之一的角质颚因其结构稳定、耐腐蚀、特征信息丰富等而被广泛用于头足类的种类和种群判定(Jackson *et al*,

1997)。Vega 等(2002)基于角质颚长度成功区分来自太平洋和大西洋的巴塔哥尼亚枪乌贼(*Loligo gahi*)的种群。方舟等(2014)研究发现, 北太平洋柔鱼的 2 个群体在耳石与角质颚形态学特征上存在显著差异。刘必林等(2015)根据角质颚长度的差异成功判别中国近海 5 种常见经济头足类。方舟等(2019)利用角质颚实现东海和黄海的头足类的科类判别。

鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)广泛分布于印度洋-太平洋海域, 其地理种群结构复杂(刘必林等, 2010)。Liu 等(2019)采用传统的逐步判别法从胴体和

* 国家重点研发计划(2019YFD0901404)、国家自然科学基金面上项目(41876141)、上海市“浦江人才”计划项目(18PJ1404100)、上海市高校特聘教授“东方学者”岗位计划项目(0810000243)和上海市科技创新行动计划(19DZ1207502)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901404), National Natural Science Foundation of China (41876141), Shanghai Pujiang Program Under Contract (18PJ1404100), Program for Professor of Special Appointment (Eastern Scholar) at Shanghai Institutions of Higher Learning under Contract (0810000243), and Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (19DZ1207502)]. 郑芯瑜, E-mail: 1187019761@qq.com

① 通讯作者: 刘必林, 教授, E-mail: bl-liu@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-03-15, 收修改稿日期: 2020-04-08

角质颚形态差异对鸢乌贼的地理种群进行划分,但误判率较高。由于模式识别中的 K-means 动态聚类方法简单高效,为此,本研究引入该算法对鸢乌贼角质颚的形态学参数进行聚类分析,期待为头足类种群识别提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 样品采集采样

样本于2014—2019年间分别由中国灯光围网渔船、鱿钓渔船、敷网渔船采集于西北印度洋(59°~64°E, 13°~20°N)、热带东太平洋(110°~119°E, 5°S~1°N)和中国南海(110°~118°W, 9°~21°N)(表1)。

样本在实验室解冻后,测量其胴长(mantle length,

ML, 精确到 1 mm)和体质量(body weight, BW, 精确到 1 g)。角质颚提取后,放入 75%酒精溶液中保存。分别从西北印度洋海区选取鸢乌贼大型群、热带东太平洋中型群及中国南海中型群(有发光器)的角质颚,选取胴长范围为 80~500 mm 的 150 对角质颚,使用精度为 0.01 mm 的游标卡尺对上颚和下颚各 5 个特征进行测量,包括上头盖长(upper hood length, UHL)、上脊突长(upper crest length, UCL)、上喙长(upper rostrum length, URL)、上侧壁长(upper lateral wall length, ULWL)、上翼长(upper wing length, UWL)、下头盖长(lower hood length, LHL)、下脊突长(lower crest length, LCL)、下喙长(lower rostrum length, LRL)、下侧壁长(lower lateral wall length, LLWL)和下翼长(lower wing length, LWL),测量标准参照文献(方舟等, 2014)(图 1)。

表 1 采样信息
Tab.1 Sampling information

海区 Sea area	经纬度 Latitude and longitude	采样日期 Sampling date	样本量 Sample number/ind.	胴长 Mantle length/mm	体质量 Weight/g
西北印度洋 Northwest Indian Ocean	59°~64°E 13°~20°N	2019.06	50	120~443	105~5564
热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	110°~119°E 5°S~1°N	2014.04—2014.05	50	119~351	45~1975
中国南海 South China Sea	110°~118°W 9°~21°N	2017.01—2017.05	50	80~213	16~460

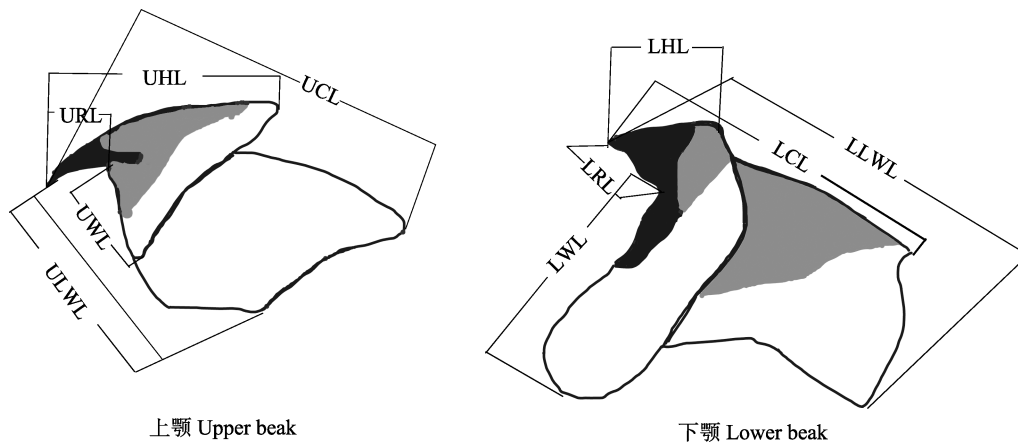


图 1 角质颚外部形态测量示意图

Fig.1 Scheme of morphometric measurement for beak

UHL: 上头盖长; UCL: 上脊突长; URL: 上喙长; ULWL: 上侧壁长; UWL: 上翼长; LHL: 下头盖长;

LCL: 下脊突长; LRL: 下喙长; LLWL: 下侧壁长; LWL: 下翼长

UHL: Upper hood length; UCL: Upper crest length; URL: Upper rostrum length; ULWL: Upper lateral wall length;

UWL: Upper wing length; LHL: Lower hood length; LCL: Lower crest length; LRL: Lower rostrum length;

LLWL: Lower lateral wall length; LWL: Ower wing length

1.2 角质颚数据标准化

为排除个体大小对角质颚尺寸的影响,采用

z-score 标准化将原始角质颚数据值映射到[0,1]之间,该标准化方法保留了原来数据中存在的关系,消除量纲和数据取值范围影响,其计算公式如下:

$$X_{ij} = \frac{x_{ij} - u}{\delta} \quad (1)$$

式中, u 为各角质颚形态学数据的均值; δ 为各角质颚形态学数据的标准差; x_{ij} 为第 i 行 j 列的角质颚数据, i 为样本总量, $i=1,2,\dots,150$, j 为角质颚上头盖长、上脊突长等 10 个形态学参数, $j=1,2,\dots,10$; X_{ij} 为标准化后的角质颚数据。

1.3 K-means 聚类建模

第 1 步, 以标准化后的 150 组角质颚样本总量为行, 以 10 个形态学参数为列, 形成 150×10 的总矩阵。第 2 步, 根据 K-means 聚类原则, 将预处理完毕的角质颚数据按照采样的海区来源分为 3 类, 即 $K=3$ 。第 3 步, K-means 算法在数据集中随机选择 1 个点作为第 1 个初始类的中心点, 接着选择距离该点最远的点作为第 2 个初始类簇中心点, 最后选择距离前 2 个点的最近距离最大的点作为第 3 个初始类簇的中心点, 最终选定 3 个初始聚类的中心即 C_1, C_2, C_3 (曾俊, 2020)。第 4 步, 选择任意 2 组角质颚形态学参数 x_{ij} ($i=1,2,\dots,150; j=1,2,\dots,10$) 按曼哈顿距离(或欧氏距离、马氏距离等)归给某一个距离最近的聚类中心 C_k ($0 < k < 3$) (曾俊, 2020; 王同兴等, 2010), 与聚类中心最小距离为:

$$\|x_{ij} - C_k\| = \min_{1 \leq l < 3} \|x_{ij} - C_l\| \quad (2)$$

其中, 曼哈顿距离为:

$$L_1(x_a, x_b) = \sum_{l=1}^n |x_a^{(l)} - x_b^{(l)}| \quad (3)$$

式中, $n=10$, 即 10 维角质颚形态学数据; x_a 和 x_b 分别为 10 维角质颚形态学参数矩阵的任一维 (150×1)。

其中, 欧氏距离为:

$$L_2(x_a, x_b) = \left(\sum_{l=1}^n |x_a^{(l)} - x_b^{(l)}|^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

第 5 步, 重新计算各个新类的聚类中心值 $C_{k'}$:

$$C_{k'} = \frac{1}{N_k} \sum_{x \in S_k} x \quad (k=1,2,3) \quad (5)$$

式中, N_k 是第 k 个聚类集合 S_k 中所包含的角质颚样本个数; 迭代逐次修正更新聚类的中心点, 当没有改变任何点的分类情况及聚类中心, 则算法收敛; 否则继续修正。算法收敛的条件为:

$$C_k^{n+1} = C_k^n \quad (\text{对所有 } k=1,2,3 \text{ 成立}) \quad (6)$$

若上式成立, 则算法收敛, 计算结束, 利用 MATLAB 软件编程实现。

2 结果与分析

2.1 角质颚大小

未经标准化的原始角质颚形态参数分析显示, 西北印度洋海区整体角质颚最大, 其次为热带东太平洋、中国南海鸢乌贼角质颚最小(表2)。经过标准化后的角质颚数据, 由曼哈顿距离法和欧氏距离分析显示, 西北印度洋海区鸢乌贼角质颚最大, 热带东太平洋次之, 中国南海最小(图2和图3)。

2.2 聚类中心

欧氏距离与曼哈顿距离法分析显示, 对于 10 组角质颚形态学参数, 任选 2 组, 各海区的聚类中心位置均会相应变化。以曼哈顿距离为例, 西北印度洋海区、

表 2 原始鸢乌贼地理种群形态参数/mm
Tab.2 Morphologic indices of primitive *S. oualaniensis*/mm

形态参数 Morphologic indices	西北印度洋 Northwest Indian Ocean			热带东太平洋 Tropical eastern Pacific			中国南海 South China Sea		
	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差
	Min	Max	Mean±SD	Min	Max	Mean±SD	Min	Max	Mean±SD
上头盖长 UHL	13.0	17.2	14.1±0.9	9.2	13.0	11.6±0.8	8.3	10.9	9.8±0.6
上脊突长 UCL	15.9	20.6	17.5±0.9	12.9	19.0	15.2±1.2	10.3	13.7	12.3±0.8
上喙长 URL	3.8	6.6	5.0±0.7	3.1	4.9	3.8±0.5	2.2	4.3	3.4±0.4
上侧壁长 ULWL	10.0	14.6	12.3±1.1	8.7	12.3	11.0±0.8	7.9	11.0	9.7±0.7
上翼长 UWL	3.2	5.3	4.5±0.5	4.0	5.7	4.7±0.6	2.4	3.8	3.3±0.4
下头盖长 LHL	3.4	5.4	4.2±0.4	3.0	4.2	3.6±0.3	2.6	4.0	3.3±0.3
下脊突长 LCL	6.8	10.3	8.6±0.8	5.6	8.0	6.9±0.6	2.6	6.5	5.8±0.6
下喙长 LRL	3.7	5.7	4.6±0.5	2.6	4.5	3.5±0.4	1.6	3.6	2.9±0.4
下侧壁长 LLWL	11.1	15.7	12.7±1.1	7.8	11.8	13.4±1.4	7.2	9.9	8.7±0.6
下翼长 LWL	3.7	8.8	7.4±1.1	4.2	6.6	5.4±0.5	4.0	6.2	5.0±0.5

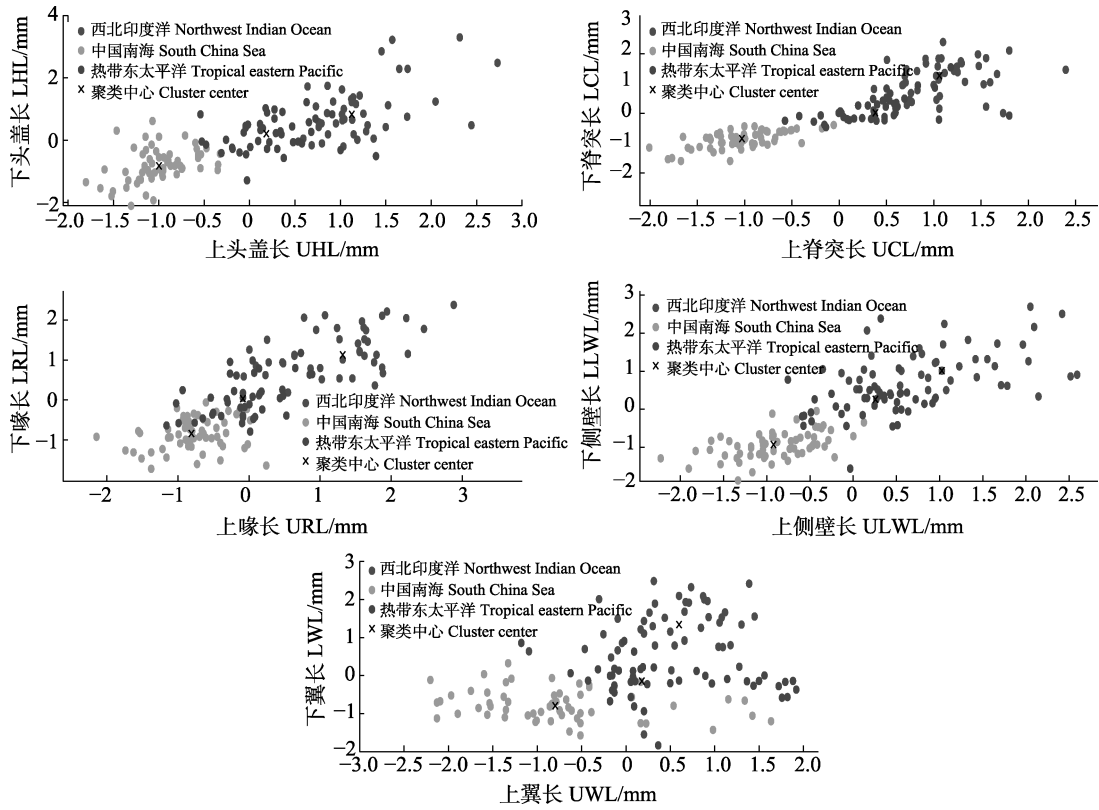


图 2 基于曼哈顿距离的鸢乌贼地理种群聚类效果
Fig.2 Clustering effect of *S. oualaniensis* based on Manhattan

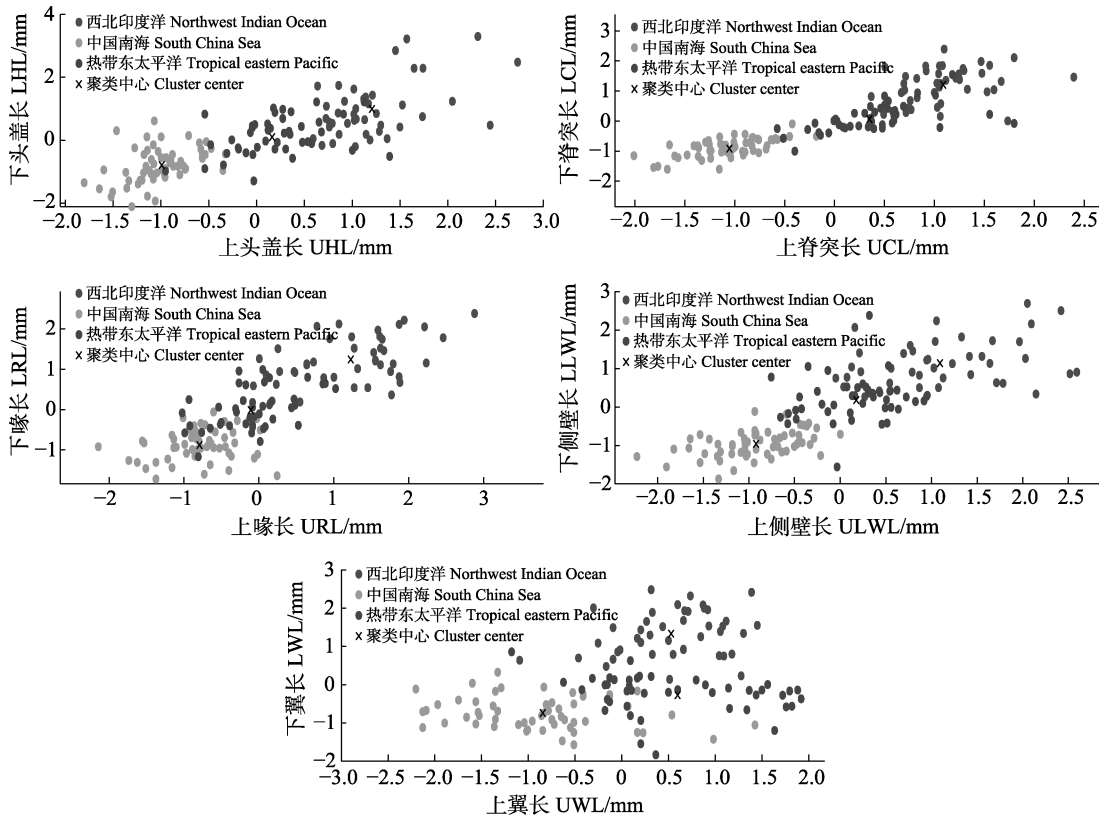


图 3 基于欧氏距离的鸢乌贼地理种群聚类效果
Fig.3 Clustering effect of *S. oualaniensis* based on Euclidean

热带东太平洋海区、中国南海鸢乌贼上、下头盖长的聚类中心分别为(1.12, 0.83)、(0.18, 0.21)和(-1.00, -0.82), 上、下脊突长聚类中心分别为(1.06, 1.26)、(0.38, 0.02)、(-1.03, -0.85), 上、下喙长的聚类中心

分别为(1.32, 1.13)、(-0.08, 0.03)、(-0.81, -0.84), 上、下侧壁长的为聚类中心分别为(1.03, 1.01)、(0.26, 0.26)、(-0.92, -0.93), 上、下翼长为聚类中心分别为(0.60, 1.34)、(0.18, -0.14)、(-0.80, -0.79)(表3)。

表 3 聚类中心的存储位置
Tab.3 Storage locations for cluster centers

距离 Distance	聚类中心 Cluster centers	上头盖长/ 下头盖长 UHL/LHL	上脊突长/ 下脊突长 UCL/LCL	上喙长/ 下喙长 URL/LRL	长侧壁长/ 下侧壁长 ULWL/LLWL	上翼长/ 下翼长 UWL/LWL
曼哈顿距离 Manhattan	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	1.12/0.83	1.06/1.26	1.32/1.13	1.03/1.01	0.60/1.34
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	0.18/0.21	0.38/0.02	-0.08/0.03	0.26/0.26	0.18/-0.14
	中国南海 South China Sea	-1.00/-0.82	-1.03/-0.85	-0.81/-0.84	-0.92/-0.93	-0.80/-0.79
欧氏距离 Euclidean	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	1.21/0.99	1.09/1.21	1.23/1.24	1.09/1.14	0.53/1.33
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	0.16/0.10	0.35/0.07	-0.11/-0.01	0.18/0.18	0.60/-0.27
	中国南海 South China Sea	-0.99/-0.79	-1.05/-0.92	-0.79/-0.88	-0.92/-0.96	-0.85/-0.74

从聚类中心的位置可初步得出,不同的距离算法和远离样本均值中心的点,均会对聚类中心产生一定的偏移。

2.3 判别成功率

选择 10 组上、下角质颚形态学参数中的任意 2 组,例如上、下头盖长,上、下脊突长等,尽管各海区的聚类中心位置会相应变化,但聚类识别的结果不变。

曼哈顿距离分析显示,西北印度洋鸢乌贼 43 尾被成功识别,7 尾漏分至热带东太平洋,识别成功率为 86.0%;热带东太平洋鸢乌贼 37 尾被成功识别,13 尾漏分至中国南海,识别成功率为 74.0%;中国南海鸢乌贼 50 尾均被成功识别,识别成功率为 100%;总体识别成功率为 86.7% (表 4、表 5)。

欧氏距离分析显示,西北印度洋鸢乌贼 43 尾被成功识别,7 尾漏分至热带东太平洋,识别成功率为 86.0%;热带东太平洋鸢乌贼 40 尾被成功识别,10 尾漏分至中国南海,识别成功率为 80.0%;中国南海鸢乌贼 50 尾均被成功识别,识别成功率为 100%;总体识别成功率为 88.7% (表 4、表 5)。

从三大海区鸢乌贼的整体区分情况来看,当角质颚数据经过 z-score 标准化,采用欧氏距离进行聚类分析的总正确区分率为 88.7%,略优于曼哈顿距离(表 5)。本研究初步得出,曼哈顿距离和欧氏距离均适

用于鸢乌贼角质颚的识别,二者对于西北印度洋和中国南海的鸢乌贼角质颚识别结果一致,但无论采用以上哪种距离以及哪种角质颚形态学参数的组合方法,对于中国南海鸢乌贼的判别效果最好,而对于热带东太平洋鸢乌贼的漏分率以及中国南海鸢乌贼的错分率均最高,但其中欧氏距离识别热带东印度洋鸢乌贼结果更为准确,成功区分率为 80.0%(表 4、表 5)。

3 讨论

3.1 角质颚在头足类地理种群判别的优势

头足类广泛分布于大西洋、太平洋、印度洋和南极等海域,是海洋中重要的食物资源之一,研究其种群分类情况可为更高消费者的食性分析提供依据,更好地了解海洋食物网关系,为资源评估以及合理开发奠定基础(范江涛等, 2015)。形态学法通过度量头足类外形长度特征、解剖学特征等,实现头足类分类鉴定最常用的传统方法,而头足类的硬组织要比软组织更适用于种类与种群的鉴定识别(胡飞飞等, 2017; 韩青鹏等, 2017)。其中,硬组织中的耳石和角质颚均可作为种类和种群划分的主要依据,但与耳石相比,角质颚更易提取、生长纹更易观察、耐腐蚀且结构稳定,其广泛存在于更高营养级消费者的胃内(刘必林等, 2009),应用前景远大于耳石。

表 4 三大海区鸢乌贼地理种群聚类统计结果/ind.
Tab.4 Cluster result statistics of *S. oualaniensis*/ind.

距离 Distance	实测/聚类 Measured/Cluster	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	中国南海 South China Sea	实测 Measured
曼哈顿距离 Manhattan	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	43	7	0	50
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	0	37	13	50
	中国南海 South China Sea	0	0	50	50
	聚类总和 Sum of clusters	43	44	63	150
欧氏距离 Euclidean	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	43	7	0	50
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	0	40	10	50
	中国南海 South China Sea	0	0	50	50
	聚类总和 Sum of clusters	43	47	60	150

表 5 不同方法下对比三大海区鸢乌贼地理种群区分效果
Tab.5 Distinction effect of different algorithms on *S.oualaniensis*

距离 Distance	海区 Sea area	漏分率 Leakage/ %	错分率 Error rate/%	总正确 区分率 Accuracy/%
曼哈顿距离 Manhattan	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	14.0	0	86.7
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	26.0	15.9	
	中国南海 South China Sea	0	20.6	
欧氏距离 Euclidean	西北印度洋 Northwest Indian Ocean	14.0	0	88.7
	热带东太平洋 Tropical eastern Pacific	14.0	0	
	中国南海 South China Sea	20.0	14.9	

3.2 鸢乌贼角质颚尺寸差异

研究表明, 鸢乌贼的角质颚作为摄食器官, 喙是咬食过程中首先接触的部分(刘必林等, 2009)。鸢乌贼的生长栖息环境、饵料丰富程度、种内变异等因素会造成种群间喙生长变化的不同(方舟等, 2014)。角质颚尺寸大小因受摄食、食性和环境等不同的影响而

有所差异(瞿俊跃等, 2018), 不同部位在摄食过程中作用不同, 导致角质颚不同部位的生长也有所差异(胡贯宇等, 2016)。

本研究中, 鸢乌贼角质颚形态参数数据标准化前后的结果均显示, 西北印度洋海区鸢乌贼角质颚最大, 热带东太平洋次之, 而南海海区的角质颚最小, 进一步说明, 角质颚的相对大小与鸢乌贼的胴长无关, 角质颚形态的地理区域差异是由于抽样偏差导致的可能性不大, 与刘必林等(2019)结论一致。西北印度洋主要受到海表风引起的上升流影响, 使含氧不足但营养丰富的深层水涌至表层, 带来较高的初级生产力, 而热带东太平洋主要受较暖赤道逆流和较冷南赤道流的影响, 初级生产力较低, 所以, 判断印度洋西北部的鸢乌贼比热带东太平洋的鸢乌贼具有更大的角质颚尺寸(Burkill *et al*, 1993; 陆化杰等, 2014)。热带东印度洋的角质颚大小分布范围与本研究其他 2 个海域存在较多重叠, 故其漏判率和误判率相应高。相比之下, 南海海区的鸢乌贼受黑潮支流、季节环流等影响, 渔场的水温偏低, 其角质颚具有较小形态(Hu *et al*, 2000; 冯波等, 2014; Liu *et al*, 2019)。此外, 本研究根据 1 个海域鸢乌贼渔业生产进行采样, 较难实现同一时间内进行捕获样本, 另外, 鸢乌贼样本均为成体样本, 不存在个体发育期不同而影响角质颚形态, 标准化处理的角质颚数据排除了网具选择性对角质颚大小的影响(李思亮等, 2010)。

研究表明, 同一种群的雌雄鸢乌贼在角质颚形态

学参数上存在差异(朱凯等, 2016、2020; 李建华等, 2018), 本研究中, 雌性角质颚形态学参数的均值大于雄性, 三大海区雌雄角质颚的形态学参数差异显著($P < 0.05$), 后续将引入鸢乌贼雌雄差异进一步分析。

3.3 K-means 算法优越性

K-means 算法属于非监督分类, 无需先验经验和训练数据集、方法简单、计算快速、处理大数据集时保持可伸缩性和高效性, 是聚类分析最常用的算法之一(林涛等, 2019)。目前, 利用角质颚判别种类与种群的方法有很多, 其中, 刘必林等(2019)在研究角质颚的地理变异中采用逐步判别分析, 得出鸢乌贼的正确识别率为 63.5%。范江涛等(2015)基于南海鸢乌贼性别, 建立角质颚判别函数, 正确判别率达到 65%以上。马迪等(2019)运用傅里叶法基于角质颚上颚的判别总正确率为 83.3%。陈芑等(2015)结合主成分分析判别成功率为 76.9%。而本研究基于模式识别的 K-means 动态聚类法对于识别鸢乌贼种群快速有效, 总正确区分率为 88.7%。

4 展望

传统形态学度量角质颚形态参数方法耗力费时, 数据的读取与记录存在误差, 期待后续基于计算机模式识别自动提取角质颚形态学长度, 将大大提高度量角质颚形态参数的效率。K-means 动态聚类法采用迭代方法, 得到的结果通常陷入局部最优解、且该算法对于离群点比较敏感, 会导致聚类中心产生一定偏移(杨俊闯等, 2019)。此外, 对于鸢乌贼在不同海域的不同时期生长阶段、洄游变化等因素会导致群体形态存在差异, 而这些差异会导致 K-means 聚类结果出现偏差。

针对上述不足, 期望后续尽可能在同一时间段内采样, 考虑雌雄个体以及季节差异等, 进一步的研究有必要对 K-means 算法进行改进, 使用剪枝后的数据集, 并采用局部离群因子检测算法得到离群点集(许艳静等, 2019), 或利用加权密度法选取初始聚类中心点(马克勤等, 2020), 降低 K-means 算法对离群点的敏感性; 基于样本方差结合其他算法, 例如, 遗传算法、人工蜂群算法等具有强鲁棒性和全局搜索能力的算法, 避免 K-means 算法过早陷入全局最优解(王丝丝等, 2018), 后续还需改良构造出普遍适用于识别各海区鸢乌贼的算法, 能具体区分同一海域雌雄鸢乌贼的不同种群, 期待进一步为头足类资源评估提供科学依据。

参 考 文 献

- BORGES T C. Discriminate analysis of geographic variation in hard structures of *Todarodes saguttatus* (Lamarck 1798) from North Atlantic Ocean. ICES Marine Science Symposium, 1990(199): 433-440
- BURKILL P H, MANTOURA R F C, OWENS N J P. Biogeochemical cycling in the northwestern Indian Ocean: A brief overview. Deepsea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 1993, 40(3): 643-649
- CHEN P, FANG Z, CHEN X J. Population identification of *Ommastrephes bartramii* based on beak's external morphological characters. Marine Fisheries, 2015, 37(1): 1-9 [陈芑, 方舟, 陈新军. 基于角质颚外部形态学的柔鱼种群判别. 海洋渔业, 2015, 37(1): 1-9]
- FAN J T, QIU Y S, CHEN Z Z, et al. Morphological difference of the beak between two stocks of *Sthenoteuthis oualaniensis* inhabiting South China Sea. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2015, 45(10): 42-49 [范江涛, 邱永松, 陈作志, 等. 南海鸢乌贼两个群体间角质颚形态差异分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(10): 42-49]
- FANG Z, CHEN X J, JIN Y. Preliminary study of species identification of cephalopod in East China Sea and Yellow Sea based on beak morphology. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(3): 365-372 [方舟, 陈新军, 金岳. 基于角质颚的东、黄海头足类科类判别. 上海海洋大学学报, 2019, 28(3): 365-372]
- FANG Z, CHEN X J, LU H J, et al. Morphology and growth of beaks in two cohorts for neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific Ocean. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(19): 5405-5415 [方舟, 陈新军, 陆化杰, 等. 北太平洋两个柔鱼群体角质颚形态及生长特征研究. 生态学报, 2014, 34(19): 5405-5415]
- FENG B, YAN Y R, ZHANG Y M, et al. A new method to assess the population of *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea. Progress in Fishery Science, 2014, 35(4): 1-6 [冯波, 颜云榕, 张宇美, 等. 南海鸢乌贼资源评估的新方法. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 1-6]
- HAN Q P, LU H J, CHEN X J, et al. Morphological analysis of beaks of *Uroteuthis chinensis* in the northern South China Sea. South China. Fisheries Science, 2017, 13(4): 122-130 [韩青鹏, 陆化杰, 陈新军, 等. 南海北部海域中国枪乌贼角质颚的形态学分析. 南方水产科学, 2017, 13(4): 122-130]
- HU F F, CHEN X J, LIU B L, et al. Review on identification of cephalopods classification. Marine Fisheries, 2017, 39(1): 110-120 [胡飞飞, 陈新军, 刘必林, 等. 头足类分类鉴定的研究进展. 海洋渔业, 2017, 39(1): 110-120]
- HU G Y, CHEN X J, FANG Z. Effect of individual growth on beak morphometry of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* off the Peruvian exclusive economic zone. Journal of

- Fisheries of China, 2016, 40(1): 36–44 [胡贯宇, 陈新军, 方舟. 个体生长对秘鲁外海茎柔鱼角质颚形态变化的影响. 水产学报, 2016, 40(1): 36–44]
- HU J, KAWAMURAM H, HONG H, *et al.* A review on the currents in the South China Sea: Seasonal circulation, South China Sea warm current and Kuroshio intrusion. *Journal of Oceanography*, 2000, 56: 607–624
- JACKSON G D, BUXTON N G, GEORGE M J A. Beak length analysis of *Moroteuthis ingens* (Cephalopoda: Onychoteuthidae) from the Falkland Islands region of the Patagonian shelf. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1997, 77(4): 1235–1238
- LI J H, CHEN X J, CHEN P, *et al.* Morphological and growth characteristics of *Dosidicus gigas* beak in the equatorial waters. *Marine Fisheries*, 2018, 40(4): 385–393 [李建华, 陈新军, 陈芑, 等. 赤道海域茎柔鱼角质颚形态及生长特征分析. 海洋渔业, 2018, 40(4): 385–393]
- LI S L, CHEN X J, LIU B L, *et al.* Morphological analysis on population structure of Neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2010, 40(3): 43–48 [李思亮, 陈新军, 刘必林, 等. 基于形态法的西北太平洋柔鱼种群结构研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(3): 43–48]
- LIN T, ZHAO C. Nearest neighbor optimization *K*-means clustering algorithm. *Computer Science*, 2019, 46(11A): 216–219 [林涛, 赵臻. 最近邻优化的 *K*-means 聚类算法. 计算机科学, 2019, 46(11A): 216–219]
- LIU B L, CHEN X J, FANG Z, *et al.* Species identification of cephalopods based on beak morphometric variables. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(6): 1365–1372 [刘必林, 陈新军, 方舟, 等. 基于角质颚长度的头足类种类判别. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1365–1372]
- LIU B L, CHEN X J, WANG X H, *et al.* Geographic, intraspecific and sexual variation in beak morphology of purple back flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) throughout its distribution range. *Marine and Freshwater Research*, 2019, 70(3): 417–425
- LIU B L, CHEN X J. Beak length analysis of the purpleback flying squid *Sthenoteuthis oualaniensis* in northwest Indian Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 8–14 [刘必林, 陈新军. 印度洋西北海域鸢乌贼角质颚长度分析. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 8–14]
- LIU B L, CHEN X J. Review on the research development of beaks in Cephalopoda. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 157–164 [刘必林, 陈新军. 头足类角质颚的研究进展. 水产学报, 2009, 33(1): 157–164]
- LIU H J, WANG C J, CHEN X J. Preliminary study on the biological characteristics of *Sthenoteuthis oualaniensis* in the high seas nearby the equator of eastern Pacific during April to June. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(3): 441–447 [陆化杰, 王从军, 陈新军. 4–6月东太平洋赤道公海鸢乌贼生物学特性初步研究. 上海海洋大学学报, 2014, 23(3): 441–447]
- MA D. Species identification of common inshore cephalopods in the East China Sea and the Yellow Sea based on beak. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [马迪. 基于角质颚的东黄海常见头足类鉴定与分类. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- MA K Q, YANG Y J, QIN H W, *et al.* *K*-means clustering algorithm combining max-min distance and weighted density. *Computer Engineering and Applications*, 2020, 56(16): 50–54 [马克勤, 杨延娇, 秦红武, 等. 结合最大最小距离和加权密度的 *K*-means 聚类算法. 计算机工程与应用, 2020, 56(16): 50–54]
- QU J Y, LI J H, CHEN P, *et al.* The morphology and growth characteristics of beaks of European common cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the coast of West Africa. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 164–170 [瞿俊跃, 李建华, 陈芑, 等. 西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 164–170]
- VEGA M A, ROCHA F J, GUERRA A, *et al.* Morphological differences between the Patagonian squid *Loligo gahi* populations from the Pacific and Atlantic Oceans. *Bulletin of Marine Science*, 2002, 71(2): 903–913
- WANG S S, ZHANG J L, CHEN C, *et al.* Optimization of *K*-means based on variance statistics and improved swarm intelligent algorithm. *Journal of Systems Science and Mathematical Sciences*, 2018, 38(10): 1117–1127 [王丝丝, 张敬磊, 陈慈, 等. 基于方差与改进群智能算法的 *K*-means 聚类优化. 系统科学与数学, 2018, 38(10): 1117–1127]
- WANG T X, GUO J J, WANG Q. The recognition of soil sample based on the *K*-means dynamic clustering analysis. *Building Science*, 2010, 26(7): 52–56, 71 [王同兴, 郭骏杰, 王强. 基于 *K* 均值动态聚类分析的土样识别. 建筑科学, 2010, 26(7): 52–56, 71]
- XU Y J, ZHU J M, DING Q Y, *et al.* Outlier fraud user detection algorithm for crowdsourcing competition. *Statistics and Information Forum*, 2019, 34(10): 20–26 [许艳静, 朱建明, 丁庆洋, 等. 众包竞赛的离群点欺诈用户检测算法研究. 统计与信息论坛, 2019, 34(10): 20–26]
- YANG J C, ZHAO C. Survey on *K*-means clustering algorithm. *Computer Engineering and Applications*, 2019, 55(23): 7–14, 63 [杨俊闯, 赵超. *K*-Means 聚类算法研究综述. 计算机工程与应用, 2019, 55(23): 7–14, 63]
- ZENG J. Analysis of partition-based data mining *K*-means clustering algorithm. *Modern Electronics Technique*, 2020, 43(3): 14–17 [曾俊. 基于划分的数据挖掘 *K*-means 聚类算法分析. 现代电子技术, 2020, 43(3): 14–17]
- ZHU K, WANG X H, ZHANG P, *et al.* A study on morphological variations and discrimination of medium and dwarf forms of purple flying squid *Sthenoteuthis oualaniensis* in the southern South China Sea. *Journal of Tropical Oceanography*, 2016, 35(6): 82–88 [朱凯, 王雪辉, 张鹏,

等. 南海南部鸢乌贼中型群与微型群形态学差异及其判别分析. 热带海洋学报, 2016, 35(6): 82–88]
 ZHU K, ZHANG L C, XIAO C Y, *et al.* Characterizing fecundity of dwarf form of female purple flying squid (*Sthenoteuthis*

oualaniensis) in the South China Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 140–148 [朱凯, 张立川, 肖楚源, 等. 南海鸢乌贼微型群雌性个体繁殖力研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 140–148]

(编辑 马瑾艳)

Pattern of Recognition Beaks in *Sthenoteuthis oualaniensis* Based on *K*-Means Dynamic Clustering

ZHENG Xinyu¹, LIU Bilin^{1,2①}, KONG Xianghong¹, WANG Xuehui³

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

2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, National Distant-Water Fisheries Engineering Research Center, Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;

3. South China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510300, China)

Abstract Cluster analysis has been widely used for pattern recognition, machine learning, and in other fields. The *K*-means dynamic clustering algorithm is simple and efficient, which is why it is one of the most commonly used methods of cluster analysis. The beak of cephalopods, comprising hard tissue, has been widely used to determine species and identify populations owing to its stable structure, corrosion resistance, easily observed growth lines, and abundant characteristic information, causing it to have great application prospects. In this study, the *K*-means dynamic clustering algorithm was used on 150 pairs of *Sthenoteuthis oualaniensis* beaks within the mantle length range of 120~200 mm. Samples were collected from the northwest Indian Ocean, the tropical eastern Pacific Ocean and the South China Sea from 2014 to 2019. The results showed that *S. oualaniensis* from the northwest Indian Ocean had the largest beaks, followed by the tropical eastern Pacific Ocean, and those in the South China Sea. The *K*-means dynamic clustering algorithm showed that *S. oualaniensis* from the three areas can be well distinguished. We used z-scores to normalize the data the created a 2D beak morphological parameter matrix to randomize the data before we conducted a *K*-means dynamic clustering analysis with Manhattan distance and Euclidean distance. The total correct discrimination rate was 86.7% and 88.7%, respectively. This study also identified that the geographic regional differences in beak morphology are unlikely to be due to sampling bias. From the location of the clustering center, we concluded that the Manhattan and Euclidean distance algorithms and outlying points will generate deviations from the clustering center. The *K*-means dynamic clustering algorithm for beaks of the *S. oualaniensis* has great reference value. We identified improvements that optimize the *K*-means algorithm to expand capability for universal use. These improvements and a retrieval system will improve our capabilities to identify *S. oualaniensis* species.

Key words *Sthenoteuthis oualaniensis*; Beak; Pattern of recognition; Manhattan distance; Euclidean distance

① Corresponding author: LIU Bilin, E-mail: bl-liu@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200110001

http://www.yykxjz.cn/

钱辰颖, 郑国栋, 陈杰, 邹曙明. 溶解氧对团头鲂耐低氧新品系 F₅ 代的鳃组织形态及各组织酶活性的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 73–81

QIAN C Y, ZHENG G D, CHEN J, ZOU S M. Effects of oxygen on the gill tissue and enzyme activities of each tissue in a hypoxia-tolerant new strain F₅ of *Megalobrama amblycephala*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 73–81

溶解氧对团头鲂耐低氧新品系 F₅ 代的 鳃组织形态及各组织酶活性的影响*



钱辰颖 郑国栋 陈杰 邹曙明^①

(上海海洋大学 农业农村部团头鲂遗传育种中心 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室
水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 为研究不同浓度溶解氧(DO)对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)耐低氧新品系 F₅ 代鳃组织形态以及各组织酶活性的影响,本研究将团头鲂在低氧[DO 为(1.7±0.2) mg/L]和高氧[DO 为(19.3±0.5) mg/L]条件下分别处理 0、4 和 7 d, 恢复常氧[DO 为(7.8±0.3) mg/L] 7 d 后, 通过石蜡切片观察鳃组织的形态, 并测定了鳃、肝胰腺、肠道、肌肉中过氧化氢酶(CAT)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)含量。石蜡切片结果显示, 随着低氧处理时间的延长, 团头鲂新品系鳃丝的层间细胞团体积减小, 鳃小片表面积增加, 恢复常氧 7 d 后又有所恢复。高氧条件下, 层间细胞团体积增大, 鳃小片表面积减小, 恢复常氧 7 d 后也会恢复。酶活性检测结果显示, 在低氧和高氧 2 种条件下, 随着处理时间的延长, CAT 活性和 MDA 含量在各组织中的变化无明显规律, 但均有显著差异($P<0.05$)。低氧条件下, LDH 活性显著增高, SDH 活性显著降低($P<0.05$)。高氧条件下, LDH 活性显著降低, SDH 活性显著增高($P<0.05$)。本研究可为溶解氧对团头鲂的鳃组织以及各组织酶活性的影响提供基础资料, 并为团头鲂新品系的养殖与选育奠定基础。

关键词 团头鲂; 溶解氧; 鳃组织; 酶活性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0073-09

通常在天然或养殖水体中的溶解氧(dissolved oxygen, DO)含量丰富, 鱼类的摄食量大、生长速度快。一般情况下, 天然水体中的溶氧含量接近饱和状态, 但由于物理、化学或生物等因素的季节性或突发性改变, 引起水体中溶解氧降低甚至缺氧。近年来, 集约化养殖采用高密度和高投饵模式, 常常引起养殖水体中溶解氧浓度的剧烈波动。溶解氧是影响水产动

物生长代谢、诱发各类鱼病的不可忽视的主要环境因子之一(况新宇, 2016; Kennish, 2002)。刘旭佳等(2005)研究发现, 水中溶解氧含量降低, 导致鲮(*Mugil cephalus*)幼鱼的摄食量下降, 生长缓慢。杨凯等(2010)研究发现, 低溶解氧条件下, 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)稚鱼常保持静止状态, 摄食时间短, 游泳缓慢。吴垠等(2007)研究表明, 在一定程度上提高水

* 国家自然科学基金项目(31272633; 31572220)、国家科技支撑计划(2012BAD26B02)和上海市高校知识服务平台(ZF1206)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31272633; 31572220), Key Technologies Research and Development Program of China (2012BAD26B02), and Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206)] 钱辰颖, E-mail: qiancy19950120@163.com

^① 通讯作者: 邹曙明, 教授, E-mail: smzou@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-01-10, 收修改稿日期: 2020-03-21

中溶解氧含量能够提高工厂化养殖虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的代谢率。Person-Le Ruyet 等(2002)研究指出,与溶解氧含量为 91%时相比,大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)在溶解氧含量达 135%时,活动加快、摄食量增大。程香菊等(2019)研究发现,在一定范围内,随着溶解氧浓度的增加,室内曝气推流循环水养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的食物转化效率和生长速度加快。也有人提出,溶解氧浓度过高并不会影响鱼类的生长,但会增加鱼类的生存压力(张钊等, 2014; Ritola *et al.*, 2002)。由此可见,探讨不同溶解氧浓度对鱼类生长和代谢产生的影响具有重要意义。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*), 又名武昌鱼, 属草食性鱼类, 病害少、易捕捞、生长速度快、养殖成本低、管理简便, 在人工养殖条件下, 第 2 年即可达到商品规格, 养殖效益较好(刘国信, 2008)。近年来, 关于团头鲂的低氧研究颇多, 主要集中在对低氧相关基因 *HIF*、*(HO)2*、*PHD2*、*EPO*, 低氧引起的相关生理生化指标变化, 低氧时团头鲂鳃组织形态学分析等研究(吴成宾, 2016; 沈睿杰, 2011; Wang *et al.*, 2015; 田玉梅, 2012; 张雪丽, 2017), 而对高氧胁迫尚未见相关研究。本实验研究了在高氧和低氧 2 种条件下团头鲂耐低氧新品系 F_5 代鳃形态以及各组织酶活性的变化, 探讨团头鲂对溶解氧的适应性, 以期为提高团头鲂集约化养殖水平、促进团头鲂耐低氧选育以及健康养殖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验组为团头鲂耐低氧新品系 F_5 代, 来自上海海洋大学农业农村部团头鲂遗传育种中心。挑选健康的实验鱼, 共 24 尾[体重: 低氧组为(27.3±1.2) g, 高氧组为(23.1±1.4) g], 在室内恒温循环水中(水温约为 26℃, pH 为 7.1~7.5, 盐度约为 3.56)饲养 1 周, 适应新环境后再进行实验。期间每天投喂 2 次, 经常检查鱼的活动情况并清除粪便。

1.2 低氧与高氧胁迫

设置 2 个处理组(低氧组和高氧组), 每个处理设 3 个重复组。每组捞取 12 尾幼鱼(20~30 g), 分别置于体积为 20 L 的盛有曝气 72 h 自来水的玻璃缸中(水温为 26℃左右)。每天使用溶解氧仪(YSL)监测溶解氧。低氧组采用与 N_2 一起充气的方法, 使水体中的溶解氧含量维持在(1.7±0.2) mg/L。高氧组只充入少量

O_2 , 使水中的溶解氧含量维持在(19.3±0.5) mg/L。在开始处理前(0 d)、处理 4 d 和处理 7 d 时, 从每个处理中取样 3 尾鱼。此后, 剩下的 3 尾鱼在常氧条件下[DO 为(7.8±0.3) mg/L]恢复 1 周后取样。

1.3 石蜡切片与光学显微镜(LM)

用 0.5 g/L MS-222 麻醉后活体冰上解剖。从每条鱼的左侧取下第 3 片鳃, 沿鳃丝修成若干小块后将鳃组织固定于波恩氏溶液中 24 h。固定好的样品经过酒精梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片, 切片厚约为 5 μ m, 用苏木精-伊红(HE)染色, 中性树脂封片, 并在光学显微镜下观察并拍照(杨明等, 2019)。

1.4 酶活性测定

从 1.3 麻醉后的鱼中取下右侧第 3 片鳃、肌肉、肠道、胰腺腺样本各 0.1 g, 按质量体积比 1:9 加入 0.86% 的生理盐水, 将其制成 10% 的组织匀浆液。3000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定酶活性。采用南京建成生物工程研究所的检测试剂盒测定各组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、过氧化氢酶(catalase, CAT)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的活性和总蛋白的含量(吴萌, 2017)。

1.5 数据测量及分析

采用 Image J 软件对各组鳃丝进行测量, 记录鳃小片长度、宽度和间距。酶活性测定实验重复 3 次, 取测量平均值, 用 Excel 2010 软件制作直方图。采用 SPSS 22.0 分析数据, 实验结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 不同处理组数据间的差异采用方差分析, $P<0.05$ 为显著性差异(吴小嫚等, 2020)。

2 结果

2.1 缺氧对鳃组织形态的影响

由图 1 和表 1 可见, 随着低氧时间的增加, 团头鲂耐低氧新品系 F_5 的鳃小片之间的层间细胞团(ILCM)逐渐变少, 鳃小片平均间隔在缺氧 4 d 和 7 d 后分别为(31.80±1.00)和(35.75±2.11) μ m, 显著大于常氧组[(13.95±3.63) μ m]($P<0.05$)。同样, 鳃小片长度在低氧状态下更加向外延伸, 在低氧 4 d 和 7 d 之后分别为(122.69±5.81)和(132.69±2.86) μ m, 显著大于常氧组鳃小片的长度[(108.53±4.43) μ m]($P<0.05$)。另外, 鳃小片宽度在低氧 4 d 后为(13.61±0.84) μ m, 显著小于常氧组[(22.06±0.74) μ m]($P<0.05$)。低氧 7 d 后, 鳃小片

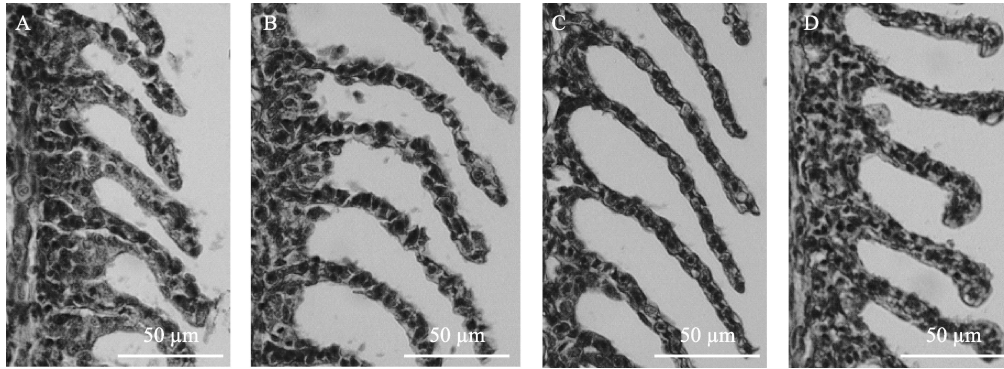


图 1 团头鲂耐低氧新品系 F₅ 在低氧条件下[DO 为(1.7±0.2) mg/L]鳃丝的组织切片
Fig.1 Histological section of hypoxia-tolerant new strain of *M. amblycephala* under hypoxic conditions [DO: (1.7±0.2) mg/L]

A: 低氧处理前; B: 低氧 4 d; C: 低氧 7 d; D: 恢复常氧 7 d
A: Before treatment; B: Hypoxia for 4 days; C: Hypoxia for 7 days; D: Recovery for 7 days

表 1 低氧处理 0、4、7 d 以及恢复 7 d 之后鳃小片各项数值
Tab.1 Data of gill lamella after hypoxic treatment for 0, 4, 7 days and recovery for 7 days

处理方法和时间 Treatment and time	鳃小片间距 Intervals of gill lamella/ μm	鳃小片宽度 Breadth of gill lamella/ μm	鳃小片长度 Length of gill lamella/ μm
低氧 Hypoxic 0 d	13.95±3.63 ^a	22.06±0.74 ^d	108.53±4.43 ^a
低氧 Hypoxic 4 d	31.80±1.00 ^b	13.61±0.84 ^b	122.69±5.81 ^b
低氧 Hypoxic 7 d	35.75±2.11 ^b	9.80±0.28 ^a	132.69±2.86 ^b
恢复 Recovery 7 d	14.98±1.48 ^a	18.72±2.55 ^c	100.64±4.25 ^a

注: 同列数据不同上标字母表示组间差异显著($P<0.05$), 下同

Note: Different superscripts in same column indicate significant differences between groups ($P<0.05$). The same as below

宽度为(9.80±0.28) μm , 显著小于低氧 4 d ($P<0.05$)。经过 1 周的常氧恢复, 团头鲂耐低氧新品系 F₅ 鳃组织基本恢复到正常形态, 各项数据均有所恢复, 但与处理前相比也存在明显差异。

2.2 高氧对鳃组织形态的影响

由图 2 和表 2 可见, 鳃小片之间的 ILCM 随着高氧处理时间的增加而增加, 鳃小片之间的平均间隔在

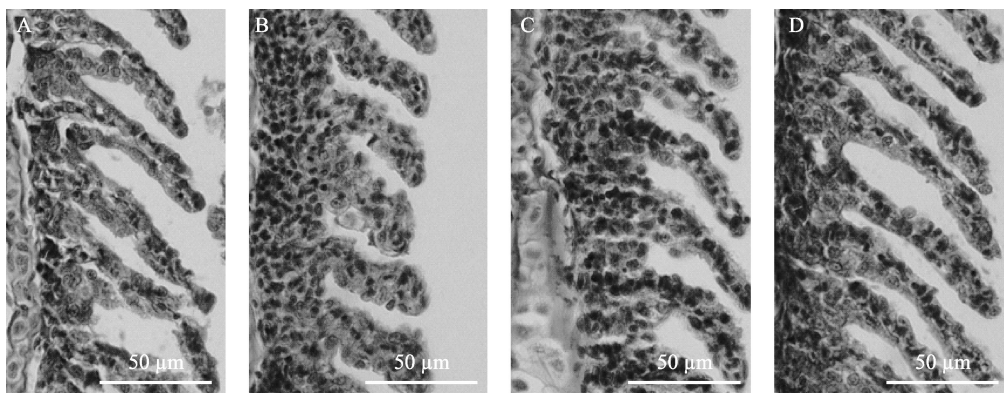


图 2 团头鲂耐低氧新品系 F₅ 在高氧条件下[DO 为(19.3±0.5) mg/L]鳃丝的组织切片
Fig.2 Histological section of hypoxia-tolerant new strain of *M. amblycephala* under hyperoxic conditions [DO: (19.3±0.5) mg/L]

A: 高氧处理前; B: 高氧 4 d; C: 高氧 7 d; D: 恢复常氧 7 d
A: Before treatment; B: Hyperoxia for 4 days; C: Hyperoxia for 7 days; D: Recovery for 7 days

表2 高氧处理0、4、7 d 以及恢复7 d 之后鳃小片各项数值
Tab.2 Data of gill lamella after hyperoxic treatment for 0, 4, 7 days and recovery for 7 days

处理方法和时间 Treatment and time	鳃小片间距 Intervals of gill lamella/ μm	鳃小片宽度 Breadth of gill lamella/ μm	鳃小片长度 Length of gill lamella/ μm
高氧 Hyperoxic 0 d	11.43 \pm 1.17 ^b	18.76 \pm 2.24 ^b	91.92 \pm 6.63 ^c
高氧 Hyperoxic 4 d	9.87 \pm 0.16 ^b	23.51 \pm 1.35 ^c	71.00 \pm 6.57 ^b
高氧 Hyperoxic 7 d	6.81 \pm 1.38 ^a	26.37 \pm 1.51 ^d	54.30 \pm 3.92 ^a
恢复 Recovery 7 d	14.93 \pm 0.46 ^c	15.01 \pm 0.30 ^a	87.96 \pm 6.64 ^c

高氧处理 4 d 后为(9.87 \pm 0.16) μm ，显著小于常氧组 [(11.43 \pm 1.17 μm) ($P < 0.05$)。高氧处理 7 d 后，鳃小片间距为(6.81 \pm 1.38) μm ，显著小于高氧处理 4 d ($P < 0.05$)。鳃小片宽度在高氧状态下逐渐增加，在高氧处理 4 d 和 7 d 的之后分别为(23.51 \pm 1.35) μm 和(26.37 \pm 1.51) μm ，均显著大于常氧组鳃小片的宽度[(18.76 \pm 2.24) μm] ($P < 0.05$)。在正常氧浓度的条件下，鳃小片长度为(91.92 \pm 6.63) μm ，高氧处理 4 d 和 7 d 后，分别显著减少至(71.00 \pm 6.57) μm 与(54.30 \pm 3.92) μm ($P < 0.05$)。在持续 1 周输入正常溶解氧进行恢复后，鳃组织形态恢复，各项数据均有所恢复，但与处理前相比也存在明显差异，其中，鳃小片长度与处理前无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 低氧处理组酶活性的变化

由图 3 可知，随着低氧时间的增加，鳃、肝胰腺和肠道中的 CAT 活性先降低后升高，在肌肉中先升高后降低，各组数据之间均存在显著差异(图 3A)($P < 0.05$)。鳃中的 MDA 含量持续降低，肝胰腺中的 MDA 持续上升，肠道中的 MDA 先降低后升高，肌肉中的 MDA 先升高后降低，各组数据之间均存在显著差异(图 3B)($P < 0.05$)。各组织中的 LDH 活性持续升高，低氧 7 d 时显著高于正常值；SDH 活性持续降低，且处理 7 d 时的数值均显著低于正常值(图 3C、图 3D)($P < 0.05$)。经过 1 周的常氧恢复后，不同酶活性在各组织中均有所恢复，但仍与常氧组存在显著差异($P < 0.05$)。

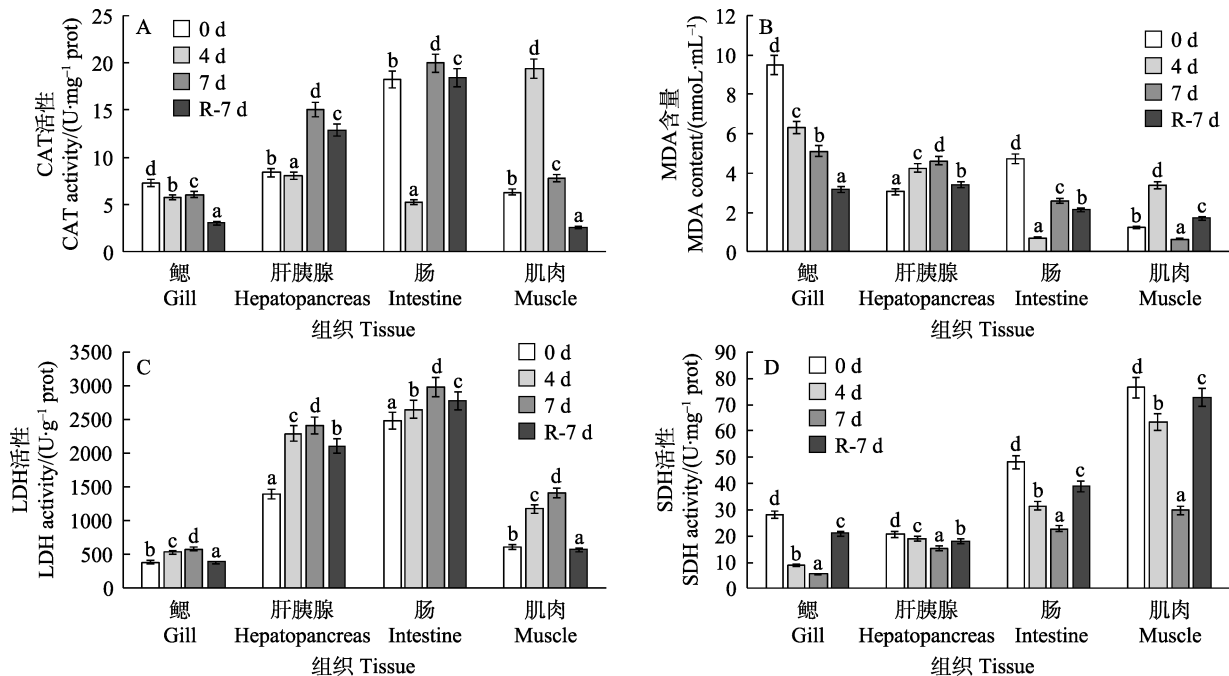


图3 团头鲂耐低氧新品系 F₅ 在低氧条件下各组织中 CAT (A)、MDA (B)、SDH (C)和 LDH (D)的变化

Fig.3 Changes of CAT (A), MDA (B), SDH (C) and LDH (D) in hypoxia-tolerant new strain of *M. amblycephala* under hypoxic conditions

0 d、4 d、7 d、R-7 d 分别表示低氧处理前、低氧处理 4 d、低氧处理 7 d、恢复常氧 7 d。

柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)，下同

0 d, 4 d, 7 d and R-7 d represent before treatment, hypoxic for 4 days, hypoxic for 7 days and recovery for 7 days, respectively. Different letters on the column indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.4 高氧处理组酶活性的变化

由图4可知,随着高氧处理时间的增加,鳃和肠道中的CAT活性持续下降,肝胰腺中的CAT活性持续上升,肌肉中的CAT活性先升高后下降,各组数据之间均存在显著差异(图4A)($P < 0.05$)。鳃和肌肉中的MDA含量先降低后升高,肝胰腺中的MDA含量持续上升,肠道中的MDA含量持续下降,各组数据之间均存在显著差异(图4B)($P < 0.05$)。各组织中的LDH活性持续降低,高氧7 d时,LDH活性显著低于正常值;SDH活性持续升高,且处理7 d时的SDH活性均显著高于正常值(图4C、图4D)($P < 0.05$)。经过1周的常氧恢复后,不同酶活性在各组织中均有恢复,但仍与常氧组存在显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 溶解氧对团头鲂新品系鳃组织的影响

鳃是鱼类的呼吸器官,主要承担气体交换任务,并且具有代谢产物排泄、渗透调节等功能。鱼类的鳃与其生活的水环境直接接触,所以对水体环境的变化尤其敏感(吴玲玲等,2007)。研究表明,水中的许多因素均会对鱼类组织尤其是鳃产生不利影响,进而威胁鱼类生存。如急性镉暴露对早期斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎发育具有较强的毒性作用,并且会造成严重的氧

化损伤(杨瑞瑞等,2019)。高水平氨氮和亚硝氮对红剑鱼(*Xiphophorus hellerii*)和孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)的鳃组织造成不利影响(张蓉等,2019)。低浓度和高浓度的铜都会使尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的鳃组织产生不同程度的变化(Monteiro *et al*, 2009)。高盐度的水环境和较大的盐度变化会引起花鲈(*Lateolabrax maculatus*)幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构变化,对花鲈幼鱼的生长发育产生不利影响(温久福等,2020)。溶解氧浓度是水生生物生存和生长重要因素之一,当水中溶解氧浓度发生变化时,鱼类也会通过一些行为来适应这种变化。Sollid 等(2003)研究发现,当溶解氧降至极低水平时,鲫鱼(*Carassius auratus*)的鳃出现鳃间质凋零、鳃丝延长等变化,使鱼体从水环境中获取更多的溶解氧,当溶解氧恢复正常后,其鳃结构也逐渐恢复正常。在面对低氧环境时,花罗汉鱼(*Cichlasoma spp.*)会减少运动量及食物的摄入来降低其新陈代谢(Kupittayanant *et al*, 2011)。吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在低氧条件下摄食量少、生长缓慢;而在高氧条件下生长速率明显加快(陈德举等,2019)。在溶解氧过饱和的水体中,胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)发生酸中毒,其鳃盖和鳍条下充满气泡,并且出现狂游等异常行为活动(吴湘香等,2014)。本研究发现,团头鲂 F₅ 代在低氧条件下,通过减少鳃小片 ICLM,增加鳃小片长度,使鳃小片与氧气接触面积增大,增加了

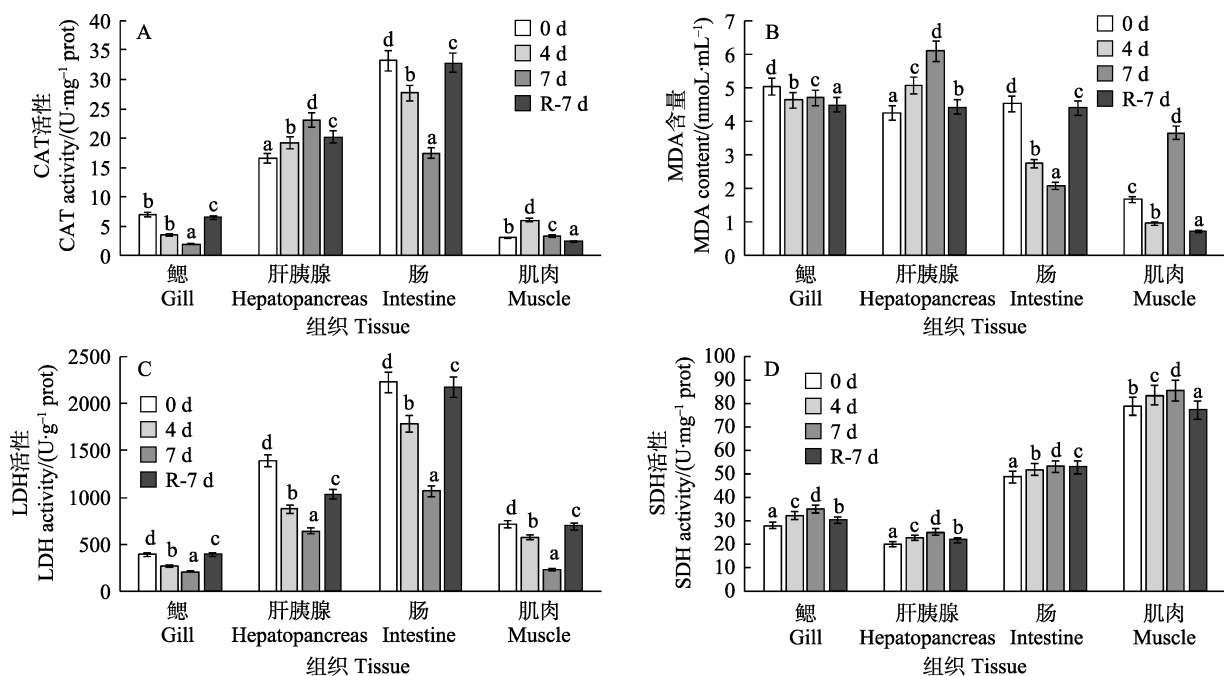


图4 团头鲂耐低氧新品系 F₅ 在高氧条件下各组织中 CAT (A)、MDA (B)、SDH (C) 和 LDH (D) 的变化

Fig.4 Changes of CAT (A), MDA (B), SDH (C) and LDH (D) in hypoxia-tolerant new strain of *M. amblycephala* under hyperoxic conditions

吸收氧气的的能力,满足其对氧气消耗的需要,由此可以说明,团头鲂 F₅对低氧环境具有较好的适应性(Wu *et al.*, 2017)。当溶氧恢复时,其组织结构形态显著恢复,这一结果与低氧胁迫下日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、虹鳟等鳃组织结构变化的规律一致(Matey *et al.*, 2011; 杨明等, 2019)。在高氧条件下,鳃小片 ILCM 随着处理时间的延长而增大,鳃小片宽度增加,使其暴露在水中的呼吸面积减少,可能是溶解氧浓度过高,其结构产生变化,减少氧气的输入来防止溶解氧过饱和和引起的一系列疾病,这一结果与西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)的鳃组织在高氧胁迫时无明显变化的结果不同(况新宇, 2016)。当溶解氧恢复时,其组织结构形态显著恢复。

3.2 溶解氧对团头鲂新品系各组织酶活性的影响

CAT 是抗氧化系统中的关键酶之一,当鱼类受到氧化胁迫时,鱼体中 CAT 的活性会上升(Lushchak *et al.*, 2001),这种过氧化胁迫一般是由于体内过多的氧自由基导致的。本研究发现,CAT 活性变化没有明显规律,低氧条件下,鳃和肠组织中的 CAT 活性先降低后升高;高氧条件下,肠组织中的 CAT 活性同样先降低后升高,可能与组织特异性相关,也可能与机体中其他抗氧化物质相关,这个结果与花鲈幼鱼各组织中 CAT 活性在低氧胁迫下的变化不尽相同,与大菱鲆幼鱼在低氧和高氧下 CAT 活性并未表现出明显规律的结果相似(吴志昊等, 2011; 常志成等, 2018)。MDA 是过氧化产物的标志性物质,反映细胞受自由基攻击的严重程度(Rio *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2005; 吴鑫杰等, 2016)。本研究发现,在低氧和高氧 2 种条件下,胰腺中的 MDA 含量均显著上升,在低氧 4 d 和高氧 7 d 时,肌肉组织中的 MDA 含量也显著高于处理前,氧化损伤严重,这一结果与低氧胁迫下鳊幼鱼肝脏组织、褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼肌肉组织中的 MDA 含量显著上升相似(熊向英等, 2016; 李洁等, 2015)。Ritola 等(2002)研究发现,过饱和溶解氧使虹鳟的鳃及其他组织细胞受到氧化损伤,进而影响呼吸和生长代谢。由此证明,过高或过低的溶解氧含量均会造成团头鲂体内产生过多的活性氧自由基,使脂质过氧化物增多,机体表现出氧化损伤,给养殖带来消极影响。在低氧和高氧条件处理 7 d 时,鳃和肠组织中的 MDA 含量均显著低于处理前,可能是因为体内积累的过量氧自由基,导致体内的抗氧化系统发挥作用,从而减轻了脂质过氧化程度(徐军等, 2004)。

SDH 参与柠檬酸循环及呼吸电子的传递,是有氧代谢中的一种标志酶,其活性能大致反映有氧代谢

的水平,所以,通常被用作衡量机体有氧呼吸能力大小的重要指标(Cohen *et al.*, 2001)。LDH 能够催化丙酮酸和乳酸相互转化,是无氧代谢中非常重要的酶,其活性通常能反映无氧代谢的水平,故常被用作反映无氧代谢能力大小的重要指标(Rutter *et al.*, 2010)。在本研究中,低氧 7 d 时,实验鱼各组织中的 SDH 活性显著低于常氧状态,而 LDH 活性显著高于常氧状态,证明溶解氧浓度的降低影响团头鲂耐低氧新品系 F₅对氧气的摄取和运输,进而导致有氧呼吸的减弱和无氧呼吸的增强,并以此来应对低氧胁迫。本结果与低氧环境导致青海沙蜥(*Phrynocephalus vlangalii*)和日本沼虾组织中的 SDH 活性降低、LDH 活性增强的研究结果相同(He *et al.*, 2013; 管越强等, 2010)。在高氧条件下,团头鲂的 SDH 活性显著升高,LDH 活性显著降低,表明团头鲂在面对高氧胁迫时也能调节自身的呼吸作用酶来保证其正常活动。

参 考 文 献

- CHANG Z C, WEN H S, ZHANG M Z, *et al.* Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(7): 20–28 [常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(7): 20–28]
- CHEN D J, QIANG J, TAO Y F, *et al.* Effects of different dissolved oxygen levels on the growth, blood biochemistry, fatty acid composition and against *Streptococcus iniae* infection of GIFT juvenile (*Oreochromis niloticus*). *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(4): 89–95 [陈德举, 强俊, 陶易凡, 等. 不同溶氧水平对吉富罗非鱼幼鱼生长、血液生化、脂肪酸组成及其抗海豚链球菌病的影响. *淡水渔业*, 2019, 49(4): 89–95]
- CHENG X J, JU J Q, HU J C, *et al.* Response model construction of fish growth to water environmental factors in recirculating aquaculture mode. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(11): 188–194 [程香菊, 具家琪, 胡佳纯, 等. 循环水养殖模式下鱼生长对水环境因子的响应模型构建. *农业工程学报*, 2019, 35(11): 188–194]
- COHEN A, NUGEGODA D, GAGNON M M. Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 48(3): 306–310
- FILHO D W, TORRES M A, ZANIBONI-FILHO E, *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus*

- (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 2005, 244(1/2/3/4): 349–357
- GUAN Y Q, LI L, WANG H C, *et al.* Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Hebei University (Natural Science)*, 2010, 30(3): 301–306 [管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响. *河北大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(3): 301–306]
- HE J Z, XIU M H, TANG X L, *et al.* The different mechanisms of hypoxic acclimatization and adaptation in lizard *Phrynocephalus vlangalii* living on Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2013, 319(3): 117–123
- KENNISH M J. Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation*, 2002, 29(1): 78–107
- KUANG X Y. Effects of high dissolved oxygen on growth, oxidative stress, and immune capacity of *Acipenser baerii* and hybrid sturgeon. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 [况新宇. 高溶氧量对西伯利亚鲟、杂交鲟生长、氧化应激及免疫功能的影响. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- KUPITTAYANANT P, KINCHAREON W. Hematological and biochemical responses of the flowerhorn fish to hypoxia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011, 10(20): 2631–2638
- LI J, TANG X, ZHANG L Y, *et al.* Study on the energy metabolism and oxidative stress of juvenile brown flounder, *Paralichthys olivaceus* in dissolved oxygen content descending water. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2015, 31(1): 22–27 [李洁, 唐夏, 张灵燕, 等. 溶解氧水平对褐牙鲈幼鱼能量代谢和氧化应激的影响研究. *广西科学院学报*, 2015, 31(1): 22–27]
- LIU G X. Breeding technology of *Megalobrama amblycephala*. *Shandong Fisheries*, 2008, 25(2): 31–32 [刘国信. 团头鲂养殖技术. *齐鲁渔业*, 2008, 25(2): 31–32]
- LIU X J, HUANG G Q, PENG Y H. Effect of different dissolved oxygen levels on growth, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*. *South China Fisheries Science*, 2005, 11(4): 88–94 [刘旭佳, 黄国强, 彭银辉. 不同溶解氧水平对鲮生长、能量代谢和氧化应激的影响. *南方水产科学*, 2005, 11(4): 88–94]
- LUSHCHAK V I, LUSHCHAK L P, MOTA A A, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 280(1): 100–107
- MATEY V, FATHIMA I I, DE BOECK G, *et al.* Gill morphology and acute hypoxia: Responses of mitochondria-rich, pavement, and mucous cells in the Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), two species with very different approaches to the osmo-respiratory compromise. *Canadian Journal of Zoology*, 2011, 89(4): 307–324
- MONTEIRO S M, ROCHA E, MANCERA J M, *et al.* A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(1): 213–223
- PERSON-LE RUYET J, PICHAVANT K, VACHER C, *et al.* Effects of O₂ supersaturation on metabolism and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 2002, 205(3/4): 373–383
- RIO D D, STEWART A J, PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2005, 15(4): 316–328
- RITOLA O, LIVINGSTONE D R, PETERS L D, *et al.* Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*, 2002, 210(1/2/3/4): 1–19
- RUTTER J, WINGE D R, SCHIFFMAN J D. Succinate dehydrogenase — Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, 2010, 10(4): 393–401
- SHEN R J. Structural and functional studies of hypoxia inducible factors in *Megalobrama amblycephala*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [沈睿杰. 团头鲂缺氧诱导因子的结构和功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- SOLLID J, DE ANGELIS P, GUNDERSEN K, *et al.* Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological change in crucian carp gills. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 20): 3667–3673
- TIAN Y M. Molecular structure and functional mechanisms of hypoxia response genes in *Megalobrama amblycephala*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [田玉梅. 团头鲂缺氧应答相关基因的分子调控机制的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- WANG H J, HUANG C X, CHEN N, *et al.* Molecular characterization and mRNA expression of HIF-prolyl hydroxylase-2 (*phd2*) in hypoxia-sensing pathways from *Megalobrama amblycephala*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 186: 28–35
- WEN J F, LAN J N, CAO M, *et al.* Effects of salinity on histological structure of gills, spleen and muscle in *Lateolabrax maculatus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 112–118 [温久福, 蓝军南, 曹明, 等. 盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 112–118]
- WU C B, LIU Z Y, LI F G, *et al.* Gill remodeling in response to hypoxia and temperature occurs in the hypoxia sensitive blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture*, 2017, 479: 479–486

- WU C B. Karyotype analysis of *Parabramis* and *Megalobrama* and the studies on hypoxia adaptive in gills of *Megalobrama amblycephala*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [吴成宾. 鳊鲂鱼类染色体核型特征分析及团头鲂鳃低氧适应性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- WU L L, CHEN L, ZHANG Y L, *et al.* Effects of phenanthrene toxicity on histopathology of *Brachydanio rerio* gill and liver. Chinese Journal of Ecology, 2007, 26(5): 688–692 [吴玲玲, 陈玲, 张亚雷, 等. 菲对斑马鱼鳃和肝组织结构的影响. 生物学杂志, 2007, 26(5): 688–692]
- WU M. Effect of low temperature stress on respiratory performance and antioxidant capacity of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 [吴萌. 低温胁迫对凡纳滨对虾呼吸性能及抗氧化能力的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WU X J, CHEN N, HUANG C X, *et al.* Effects of hypoxia on cardiomyocyte apoptosis and activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* heart. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(3): 108–113 [吴鑫杰, 陈楠, 黄春筱, 等. 低氧对团头鲂心肌细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 108–113]
- WU X M, HU Y Q. Study on preparation and *in vitro* digestive characteristics of *Lactobacillus acidophilus*-*Bifidobacterium* probiotics microcapsules feed by composite method. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(1): 372–381 [吴小嫚, 胡乐琴. 复合法制备嗜酸乳杆菌-双歧杆菌益生菌微胶囊饲料工艺及体外消化特性研究. 动物营养学报, 2020, 32(1): 372–381]
- WU X X, LI Y F, ZHANG Y, *et al.* The preliminary study on the effects of dissolved gas supersaturation in water on the acid-base balance in *Myxocyprinus asiaticus*. Freshwater Fisheries, 2014, 44(6): 55–57, 64 [吴湘香, 李云峰, 张燕, 等. 溶解气体过饱和和水体对胭脂鱼血气平衡影响初步研究. 淡水渔业, 2014, 44(6): 55–57, 64]
- WU Y, ZHANG H, ZHAO H H, *et al.* Effects of different dissolved oxygen concentration on metabolic level of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the recirculating systems. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(5): 437–442 [吴垠, 张洪, 赵慧慧, 等. 在循环养殖系统中不同溶氧量对虹鳟幼鱼代谢水平的影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(5): 437–442]
- WU Z H, YOU F, WANG Y F, *et al.* The effects of hypoxia and hyperoxia on nucleus anomaly, SOD, CAT activities and MDA content in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(6): 808–813 [吴志昊, 尤锋, 王英芳, 等. 低氧和高氧对大菱鲂幼鱼红细胞核异常及氧化抗氧化平衡的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(6): 808–813]
- XIONG X Y, HUANG G Q, PENG Y H, *et al.* Effect of hypoxia on growth performance, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*. Journal of fisheries of China, 2016, 40(1): 73–82 [熊向英, 黄国强, 彭银辉, 等. 低氧胁迫对鲢幼鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响. 水产学报, 2016, 40(1): 73–82]
- XU J, MA G Z. Effects of ozone on GPX activity and content of GSH and MDA in blood of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*) fingerling. Journal of South China Normal University (Natural Science), 2004(2): 110–113 [徐军, 马广智. 臭氧对草鱼种血液 MDA、GSH 浓度以及 GPX 活性的影响. 华南师范大学学报(自然科学版), 2004(2): 110–113]
- YANG K, FAN Q X, ZHANG L, *et al.* Effects of dissolved oxygen on feed intake, growth and respiratory metabolism of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco* R. Freshwater Fisheries, 2010, 40(2): 24–29 [杨凯, 樊启学, 张磊, 等. 溶氧水平对黄颡鱼稚鱼摄食、生长及呼吸代谢的影响. 淡水渔业, 2010, 40(2): 24–29]
- YANG M, SUN S M, FU H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 493–503 [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响. 中国水产科学, 2019, 26(3): 493–503]
- YANG R R, WANG L, SUN M, *et al.* Toxic effects of acute cadmium exposure on early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(3): 351–356 [杨瑞瑞, 王兰, 孙敏, 等. 急性镉暴露对斑马鱼早期胚胎发育的毒性效应. 山西农业科学, 2019, 47(3): 351–356]
- ZHANG R, WANG X W, LIU L L, *et al.* Effects on toxicity and antioxidant indices in *Xiphophorus hellerii* and *Poecilia reticulata*: Ammonia and nitrite. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(24): 150–155 [张蓉, 王晓雯, 刘丽丽, 等. 氨氮和亚硝氮对红剑和孔雀鱼毒性及抗氧化指标的影响. 中国农学通报, 2019, 35(24): 150–155]
- ZHANG X L. Hypoxia response analysis of *Heme Oxygenase (HO)2* repeated gene in *Megalobrama amblycephala* and insertion mutagenesis of *PB-Tgf2* transposition systems. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [张雪丽. 团头鲂血红素加氧酶(HO)2 重复基因低氧应答分析及 *PB-Tgf2* 复合转座元件的插入诱变研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG Z, LI R, GUO H, *et al.* Effects of dissolved oxygen levels on growth and biochemical composition in turbot intensively cultured. Fisheries Science, 2014, 33(8): 516–519 [张钊, 李荣, 郭惠, 等. 不同溶解氧水平对工厂化养殖大菱鲂生长及肌肉生化组分的影响. 水产科学, 2014, 33(8): 516–519]

Effects of Oxygen on the Gill Tissue and Enzyme Activities of Each Tissue in a Hypoxia-Tolerant New Strain F₅ of *Megalobrama amblycephala*

QIAN Chenying, ZHENG Guodong, CHEN Jie, ZOU Shumin^①

(Shanghai Ocean University, Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306, China)

Abstract To study the effect of different dissolved oxygen (DO) concentrations on the gill morphology and enzyme activity of a hypoxia-tolerant new strain F₅ of *Megalobrama amblycephala*, we placed the new strain in fish tanks with low oxygen [DO: (1.7±0.2) mg/L] and high oxygen [DO: (19.3±0.5) mg/L] concentrations for 0 d, 4 d, 7 d, and recovery [DO: (7.8±0.3) mg/L]. The morphology of the gill tissue was observed from paraffin sections and malondialdehyde (MDA) content, catalase (CAT), succinate dehydrogenase (SDH), and lactate dehydrogenase (LDH) activities in the gills, hepatopancreas, intestines, and muscle were determined. The results of the paraffin sections showed that with longer hypoxia time, the interlamellar cell mass of the branchial filaments of the new strain decreased, whereas the surface area of the branchial filaments increased and recovered after 7 days of constant oxygen. Under hyperoxic conditions, the substratum intercellular mass increased and the surface area of the branchial patches decreased. The results of the enzyme activity test showed that the changes of CAT activity and MDA content in different tissues had no obvious regularity with the extension of treatment time under both hypoxic and hyperoxic conditions; however, there were significant differences ($P<0.05$). LDH activity increased significantly and SDH activity decreased significantly under hypoxic conditions ($P<0.05$), whereas LDH activity decreased and SDH increased significantly under hyperoxic conditions ($P<0.05$). This study provided baseline data on the effect of DO on the gill tissue and enzyme activity of different tissues and laid the foundation for the breeding of new strains of *M. amblycephala*.

Key words *Megalobrama amblycephala*; Dissolved oxygen; Gill tissue; Enzyme activity

^① Corresponding author: ZOU Shuming, E-mail: smzou@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200224002

http://www.yykxjz.cn/

秦少宗, 冷小茜, 罗江, 杜浩, 刘志刚, 乔新美, 熊伟, 危起伟. 中华鲟幼鱼渗透调节器官组织结构在海水条件下的适应性调整. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 82–89

QIN S Z, LENG X Q, LUO J, DU H, LIU Z G, QIAO X M, XIONG W, WEI Q W. Adaptive adjustment of osmotic organ structure of juvenile Chinese sturgeon in seawater conditions. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 82–89

中华鲟幼鱼渗透调节器官组织结构 在海水条件下的适应性调整*



秦少宗^{1,2} 冷小茜² 罗江² 杜浩²
刘志刚² 乔新美² 熊伟² 危起伟^{1,2①}

(1. 西南大学生命科学学院 重庆 400715; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所
农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室 湖北 武汉 430223)

摘要 本研究以淡水养殖中华鲟(*Acipenser sinensis*)幼鱼为研究对象,采用连续升盐的方式实施海水驯化实验,对驯化过程中不同盐度下中华鲟幼鱼渗透调节器官鳃、肾和肠组织结构进行比较研究,以期了解各器官在渗透调节过程中的适应性变化。结果显示,中华鲟幼鱼在海水条件下存活率达100%;海水驯化过程中,随着盐度的升高,中华鲟幼鱼鳃小片宽度显著减小($P<0.05$),相邻鳃小片间距、泌氯细胞直径显著增加($P<0.05$),表明中华鲟幼鱼从淡水环境逐渐向海水环境适应过程中,通过改变鳃小片宽度及相邻间距,加快机体与外界水氧交换量,增加泌氯细胞大小,提高细胞代谢水平,以应对海水环境的高渗透压。同时,中华鲟幼鱼肾小球长径在海水驯化过程中显著减小($P<0.05$),同时数量也略有减少,表明中华鲟幼鱼通过降低肾脏的滤过功能减少机体水分丧失,以适应外界环境渗透压的变化。肠道组织结构未观察到明显变化。研究表明,中华鲟幼鱼具有较强的海水适应能力,渗透调节器官主要通过改变鳃小片宽度和间距、泌氯细胞大小及肾小球大小和数量来适应海水盐度变化。

关键词 中华鲟; 渗透调节; 组织结构; 海水条件

中图分类号 Q174 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0082-08

中华鲟(*Acipenser sinensis*)是一种典型的大型溯河生殖洄游型鱼类,国家一级保护动物(Wei *et al.*, 1997; 庄平等, 1999; 李罗新等, 2011)。受人类活动的影响,20世纪后期,中华鲟自然种群规模急剧缩小,并连续多年出现繁殖中断的现象(吴金明等, 2017)。在自然生态环境短期改善困难的前提下,迁地保护成为中华鲟物种资源延续的主要途径。中华鲟的养殖以及全人工繁殖技术的突破,实现了淡水人工环境下中

华鲟种群的自我维持(郭柏福等, 2011; 危起伟等, 2013)。目前,中华鲟的保种养殖均以淡水为主,长期的淡水环境使中华鲟面临性成熟个体比例低、繁殖力下降和后代患病比例升高等诸多问题(危起伟等, 2013; 张书环等, 2017; 罗江等, 2020)。为避免纯淡水圈养环境中中华鲟长期保种的不利影响,探索中华鲟“陆—海—陆”养殖模式成为国家新的重要决策。

水体盐度对鱼类,尤其是海洋鱼类和洄游鱼类的

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZD03; 2020TD08) [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD03; 2020TD08)]. 秦少宗, E-mail: qinshaoz691@126.com

① 通讯作者: 危起伟, 研究员, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

收稿日期: 2020-02-24, 收修改稿日期: 2020-04-10

影响不容忽视(Bœuf *et al.*, 2001)。水体盐度的改变迫使鱼类自身通过一系列生理变化来调节体内外的渗透压平衡, 进而影响鱼类的存活、生长和繁殖(Hirose *et al.*, 2003)。鱼类渗透调节主要通过鳃、肾、肠等器官来完成(McCormick *et al.*, 2006), 是一个牵扯到组织(鳃、肾、肠)、细胞(泌氯细胞)、酶(Na^+ - K^+ -ATPase)、激素(皮质醇、生长激素、催乳素等)和相关基因(胰岛素样生长因子 I 和催乳素 I 等)等协同作用的复杂过程(何绪刚, 2008; 刘珊等, 2011; 张晨捷等, 2013)。无论是淡水硬骨鱼的高渗调节还是海水硬骨鱼的低渗调节, 鳃和肾在对 Na^+ 和 Cl^- 进行着不断的吸收或排出, 从而维持机体的水盐平衡, 使机体处于稳态。除了鳃和肾脏外, 某些鱼类的肠具有泌盐功能(林浩然, 2011)。对鱼类渗透调节过程中生理生化的研究, 主要是观察鳃(鳃丝和泌氯细胞)和肾脏等渗透调节器官的形态变化、 Na^+ / K^+ -ATPase 活性和血清(浆)的渗透压、离子浓度和激素浓度的变化(崔文晓等, 2017)。

目前, 关于中华鲟幼鱼渗透调节器官的组织结构变化特点的研究主要集中于特定盐度下鳃上皮泌氯细胞的特征(吴贝贝, 2014; 李伟, 2014; 刘娟娟等, 2015; 赵峰等, 2016)。本研究利用海水驯化阶段的不同盐度条件, 分析中华鲟幼鱼鳃、肾和肠等渗透调节器官组织结构的适应性调整, 旨在为中华鲟海水适应过程渗透调节机制的研究提供更多的组织学资料, 为中华鲟的海水保种养殖积累基础生物学数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与条件

实验鱼来源于中国水产科学研究院长江水产研究所荆州太湖中华鲟繁育基地提供的2017年人工繁殖的150尾中华鲟子二代幼鱼。实验在浙江省舟山市水产研究所基地进行。挑选摄食正常、健壮活泼、规格均匀的个体, 平均体重为(5.1±1.1) kg/尾, 平均全长为(100.6±6.5) cm/尾的中华鲟幼鱼进行实验。实验养殖前, 将中华鲟幼鱼放至6.0 m×6.0 m×1.5 m的混凝土水池中驯化1周。实验期间, 每天的换水量不低于总水量的50%。连续曝气, 溶解氧为8.5~9.5 mg/L, 水温为17.0℃~18.2℃。实验所用饲料为天马牌中华鲟专用配合饲料。实验期间每天08:00和18:00按照体重的0.5%进行投喂, 投喂结束后, 将残饵及时捞出。

1.2 实验方法

将实验鱼随机分为2组(淡水组和海水组), 每组3个重复, 每个重复25尾鱼, 放至混凝土水池中养

殖。当地的海水盐度为25, 根据中华鲟在盐度为0~25均能长时间生存的报道(Zhao *et al.*, 2011), 本研究海水组养殖水体海化过程按照盐度每天升高1, 盐度从0升至25, 当升至9、17、25三个盐度时各稳定5 d。

每组分别在0、9、17、25四个盐度稳定期随机抽取3尾实验鱼, 取其鳃、肾和肠组织, 用中性组织固定液(4%多聚甲醛)进行固定, 12 h后换1次固定液, 固定24 h后转入70%的酒精中保存。将组织样品进行梯度酒精脱水, 二甲苯透化, 石蜡包埋, Leica RM2235切片机制片, 厚度为4 μm, 进行苏木精-伊红(HE)染色, 用Leica DM5000 B拍照并进行图像分析。

1.3 数据处理

每次取样前统计每组死亡鱼尾数, 计算存活率。使用Leica Application Suite Version 4.12.0图像软件对鳃丝显微结构中的鳃小片宽度、鳃小片间距、泌氯细胞直径和肾小球长径进行测量。使用Excel 2010软件对数据进行统计分析, 采用SPSS 19.0软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 使用Duncan法进行组间多重比较, 显著性水平设为0.05, 实验结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果

2.1 盐度适应过程中中华鲟幼鱼的存活率

如表1所示, 海水组中华鲟在4个盐度采样点采样前均未出现死亡, 存活率为100%; 淡水组除在盐度为9时1尾鱼死亡(体型过瘦), 其他采样点均未出现死亡现象。

表1 不同盐度下中华鲟幼鱼的存活率
Tab.1 Survival rate of juvenile *A. sinensis* at different salinities

盐度 Salinity	存活率 Survival rate/%	
	海水组 Seawater group	淡水组 Freshwater group
0	100	100
9	100	99
17	100	100
25	100	100

2.2 盐度对中华鲟幼鱼鳃丝组织结构的影响

由图1可见, 中华鲟幼鱼鳃丝布满扁平的鳃小片。鳃小片由扁平细胞、柱细胞、血细胞和泌氯细胞组成, 细胞饱满, 排列紧密。扁平细胞位于鳃小片外侧, 呈上、下2层分布。柱细胞位于呼吸细胞之间起

支持作用。泌氯细胞主要分布在鳃小片基部和瓣间区域,少量分布在鳃小片上。由表2可知,随着盐度的升高,鳃小片宽度逐渐变小。0盐度组鳃小片宽度最大,且显著大于其他盐度组($P<0.05$);相邻鳃小片间距随盐度的升高逐渐变大,0盐度组鳃小片间距最小,且显著小于其他盐度组($P<0.05$)。鳃小片基部为复层上皮,其间分布有黏液细胞和泌氯细胞。泌氯细胞呈圆形或椭圆形,细胞核位于中央。泌氯细胞主要分布在鳃丝上,鳃小片上也有少量分布。随盐度升高,泌氯细胞直径变大,数量也略有增多,其中,25盐度组泌氯细胞直径最大,显著大于其他盐度组($P<0.05$)。

2.3 盐度对中华鲟幼鱼肾组织结构的影响

由图2可知,中华鲟幼鱼肾组织主要由许多肾小体和肾小管组成,肾小体由外侧的肾小囊和内部毛细血管盘曲而成的肾小球组成。与25盐度组相比,0盐度组肾组织结构充实,肾小管粗壮,而25盐度组肾小管数量减少,管径也略有缩小,但无显著差异。由表3可知,随盐度的升高,肾小球长径逐渐变小,同时数量也略有减少;0盐度组的肾小球长径最大,且显著大于其他盐度组($P<0.05$);25盐度组的肾小球长径最小,且显著小于其他盐度组($P<0.05$)。

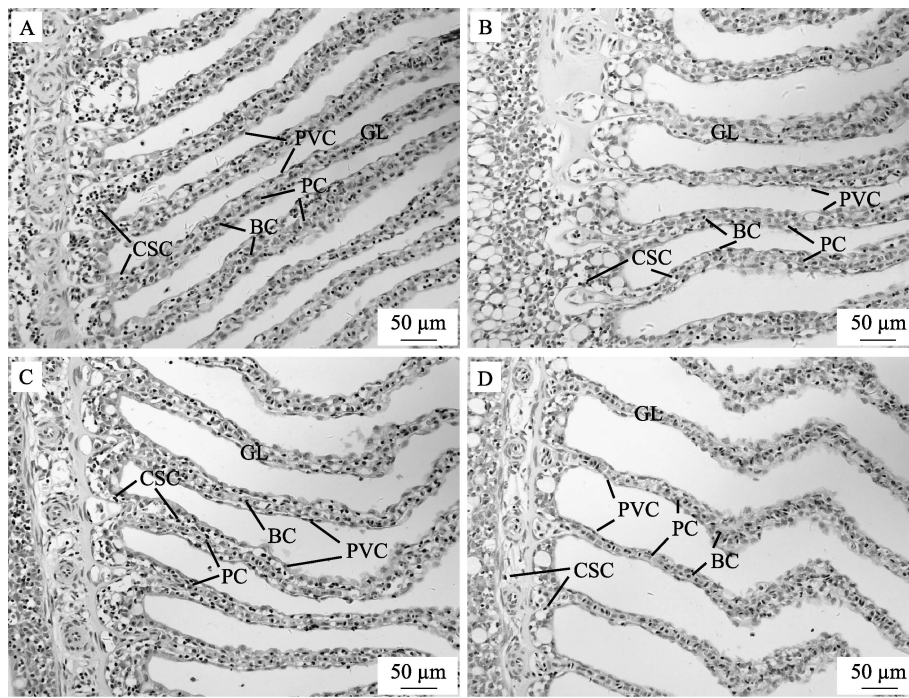


图1 不同盐度下中华鲟幼鱼鳃丝组织切片(HE)

Fig.1 Histologic section of gill filaments of juvenile *A. sinensis* at different salinities

A: 盐度0; B: 盐度9; C: 盐度17; D: 盐度25

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

A: 0 salinity; B: 9 salinity; C: 17 salinity; D: 25 salinity

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

表2 不同盐度对中华鲟幼鱼鳃丝显微结构的影响

Tab.2 Effects of different salinities on microstructure of gill in juvenile *A. sinensis*

盐度 Salinity	鳃小片宽度 Breadth of gill lamella/ μm	鳃小片间距 Spacing of gill lamella/ μm	泌氯细胞直径 Chloride cells diameter/ μm
0	41.97 \pm 8.67 ^a	33.65 \pm 9.60 ^a	5.86 \pm 0.67 ^a
9	33.65 \pm 9.29 ^b	41.45 \pm 11.71 ^b	5.91 \pm 0.74 ^a
17	31.87 \pm 6.43 ^{bc}	42.94 \pm 6.87 ^b	6.04 \pm 0.79 ^a
25	28.61 \pm 4.96 ^c	43.75 \pm 9.13 ^b	6.63 \pm 0.79 ^b

注: 同列数据不同上标字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Different superscripts in the same column denote significant differences between groups ($P<0.05$). The same as below

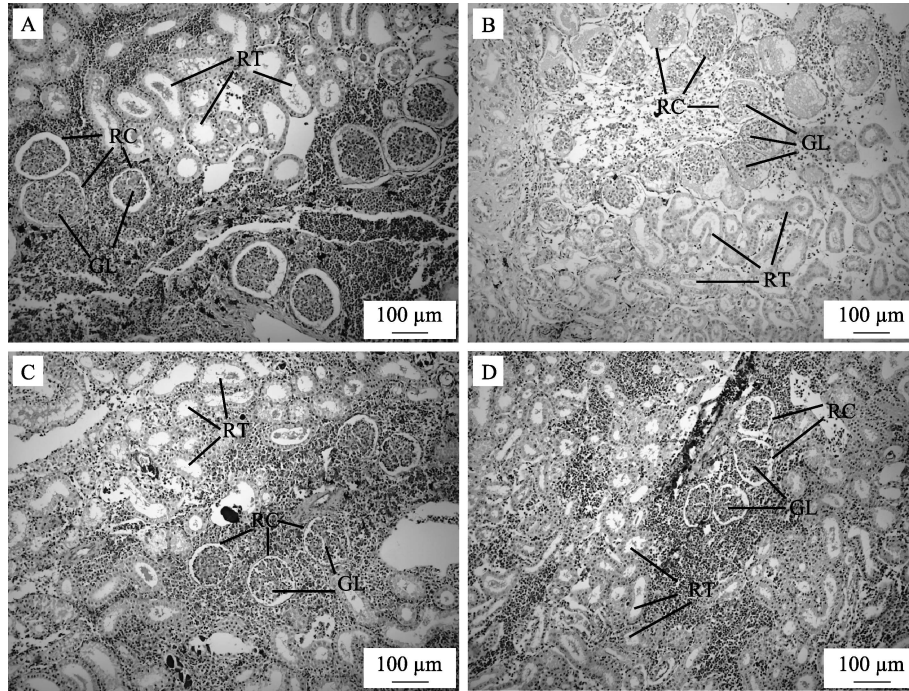


图 2 不同盐度下中华鲟幼鱼肾组织切片(HE)

Fig.2 Kidney histologic sections of juvenile *A. sinensis* at different salinities

A: 0 盐度; B: 9 盐度; C: 17 盐度; D: 25 盐度; GL: 肾小球; RC: 肾小囊; RT: 肾小管
 A: 0 salinity ; B: 9 salinity ; C: 17 salinity ; D: 25 salinity ;
 GL: Glomerulus; RC: Renal capsule; RT: Renal tubule

表 3 不同盐度对中华鲟幼鱼肾小球长径的影响

Tab.3 Effects of different salinities on kidney glomerular long-diameter of juvenile *A. sinensis*

盐度 Salinity	肾小球长径 Glomerular long-diameter/ μm
0	121.03 \pm 21.70 ^a
9	92.27 \pm 14.16 ^b
17	86.26 \pm 15.74 ^b
25	77.78 \pm 14.75 ^c

2.4 盐度对中华鲟幼鱼肠组织结构的影响

由图 3 可见, 中华鲟幼鱼肠道从里到外由黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜组成。黏膜层从里到外由固有层、单层柱状上皮细胞和杯状细胞构成。单层柱状上皮细胞呈条纹状, 从固有层向外延伸。在 0、9、17 和 25 四个盐度时, 肠道内部形状完整, 肠黏膜形态结构未发生明显变化。

3 讨论

3.1 盐度对中华鲟幼鱼耐盐性、存活率和渗透调节的影响

鱼类的生存和生长面临着众多的环境因素, 比如

温度、盐度和饵料等。其中, 盐度是影响鱼类生存生长和生理性能的主要环境因素之一(Bœuf *et al*, 2001; 张梦淇等, 2016; 张春禄等, 2017)。为了解盐度对水产养殖鱼类的影响, 人们进行了许多鱼类海水驯化养殖的研究。研究表明, 众多鱼类具有广泛的耐盐性, 比如, 中华乌塘鳢(*Bostrychus sinensis*)的耐盐性是5~35 (Zhang *et al*, 2017), 金鲷(*Trachinotus ovatus*)的耐盐性是5~35 (Liu *et al*, 2019), 大西洋比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus* L.)的耐盐性是15~32 (Imsland *et al*, 2008)。在本研究中, 中华鲟幼鱼在盐度0~25均能存活, 且存活率为100%, 这和李伟(2014)对于人工繁殖的中华鲟幼鱼仍具有盐度适应性的研究结果一致。此外, 在盐度驯化过程中, 随着盐度的升高, 海水组中华鲟幼鱼血清渗透压和主要离子(Na^+ 和 Cl^-)均出现先升高后保持稳定的现象(未发表), 说明中华鲟幼鱼具有良好的渗透调节能力, 能较好地适应海水变化, 这也与中华鲟的海洋生活史相一致。因此, 确定广盐性鱼类养殖的最佳盐度范围和能承受的盐度波动范围, 对于制定合适的盐度养殖范围非常重要。

3.2 盐度对中华鲟幼鱼鳃组织结构的影响

鳃是鱼类的第一道渗透调节线, 它确保机体进行等渗调节, 在应对外界环境变化中发挥着重要的作用

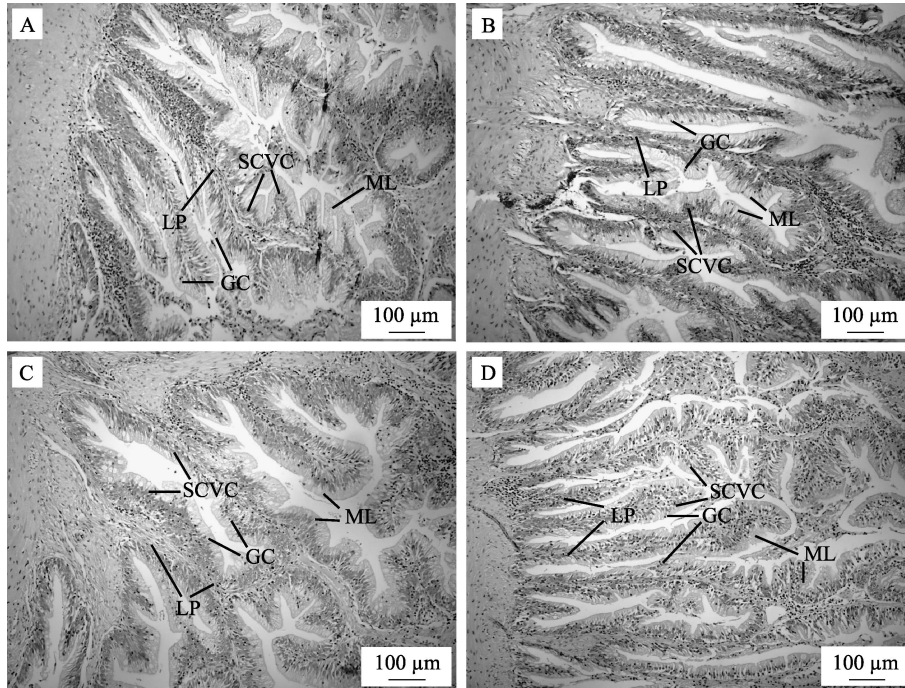


图3 不同盐度下中华鲟幼鱼肠组织切片(HE)

Fig.3 Intestinal histologic sections of juvenile *A. sinensis* at different salinities

A: 0 盐度; B: 9 盐度; C: 17 盐度; D: 25 盐度;

GC: 杯状细胞; LP: 固有层; ML: 黏膜层; SCVC: 单层柱状上皮细胞

A: 0 salinity; B: 9 salinity; C: 17 salinity; D: 25 salinity;

GC: Goblet cells; LP: Lamina propria; ML: Mucous layer; SCVC: Simple columnar epithelial cell

(El-Leithy *et al.*, 2019)。在本研究中,中华鲟幼鱼在淡水和低盐度组,鳃小叶较宽,这可能有利于增大与水体的接触面积,便于从水中吸收无机盐离子来适应低渗环境(温久福等, 2020);在高盐度组,鳃小叶变窄且相邻间距变宽,这可能是由于外界水环境的渗透压升高,鱼体渗透调节所消耗的能量、耗氧量均增加,间距变宽有利于经过鳃丝的水量增加,从而使机体与外界的水氧交换加快(刘龙龙等, 2019)。这与姜明等(1998)对于蓝非鲫[*Oreochromis Aureus (Steindachner)*]的研究结果相似。本研究中,从0~9盐度组,无论是鳃小叶宽度还是鳃小叶间距都出现了显著差异,而从9~25盐度组,二者均有变化但差异不显著,这与中华鲟幼鱼从淡水转移到高盐度环境适应过程中血清渗透压和主要离子(Na^+ 和 Cl^-)会出现迅速的调整期和稳定期的报道相一致(Zhao *et al.*, 2011)。在硬骨鱼类中,鳃上皮泌氯细胞在渗透调节过程中起重要作用,其内部含丰富的线粒体和大量的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$,为离子的跨膜主动运输提供能量(刘珊等, 2011),泌氯细胞的数量、分布、形态及参与盐分泌的离子转运蛋白的表达水平可随水体盐度做出适应性改变(Amiri *et al.*, 2018)。吴贝贝(2014)研究表明,20盐度组中华

鲟幼鱼鳃丝和鳃小片上的泌氯细胞数量相对于淡水组均有所增加,同时盐度组泌氯细胞的面积也大于淡水组。另外,在史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)(侯俊利等, 2006)和纳氏鲟(*Acipenser naccarii*)(Carmona *et al.*, 2004)也观察到相似的结果。本研究中,随着盐度的增加,中华鲟幼鱼泌氯细胞也出现了直径变大、数量也略有增加的现象,可能是外界渗透压升高导致泌氯细胞的功能加强、细胞代谢水平也得到提高(姜明等, 1998)。本研究中,中华鲟幼鱼从淡水环境转移到海水环境,鳃为最先做出反应的器官。在低盐度时,无论是鳃小叶宽度还是其间距均做出了显著的适应性变化;在高盐度时,只进行了稳定性调整,说明中华鲟的渗透调节机制在低盐度时就被激活,体现了中华鲟对海水变化具有极强的适应能力。

3.3 盐度对中华鲟幼鱼肾脏组织结构的影响

肾脏是鱼类第二重要的渗透调节器官,参与维持渗透稳态,并在排出和消除二价离子和过量离子中起着积极的作用(El-Leithy *et al.*, 2019)。鱼类机体面临的外界盐度从淡水、低盐度到高盐度所出现的结构变化,主要与水体的渗透压密切相关(于娜等, 2012)。

当外界水体盐度发生变化, 鱼类面临着低渗或者高渗环境时, 鱼体为维持机体内的水盐稳态平衡, 必须进行相应的渗透调节, 并能在组织结构上观察到与之相应的变化。Krayushkina 等(2001)对溯河洄游型海洋鲟鱼渗透调节的研究中发现, 随着外界环境中盐度的升高, 短吻鲟(*Acipenser brevirostrum*)和大西洋鲟(*Acipenser oxyrinchus*)肾脏的肾小球长径逐渐变小。本研究结果与之前的研究相似, 在淡水和低盐度环境中, 因鱼体渗透压高于外界水体渗透压, 进入到鱼体内的大量水分需要通过肾脏排出, 因而肾组织较发达, 肾小体数目多。高盐度则相反, 外界水体的渗透压高于鱼体, 鱼体出现失水现象, 需要大量吞咽海水补充水分, 过多的 NaCl 通过鳃排出体外, 肾组织机能负担减少, 肾脏的滤过率降低, 长此以往, 肾脏开始退化, 肾小球开始变小、数量减少, 肾小管也出现减少的现象。当盐度变化超过鱼类自身的渗透调节范围时, 便可能产生器质性或功能性损伤(王晓杰等, 2006)。而中华鲟幼鱼在海水适应过程中, 肾组织结构的相应变化并未产生结构性损伤, 可能和自身的洄游性相关。

3.4 盐度对中华鲟幼鱼肠组织结构的影响

鳃和肾脏作为主要的渗透调节器官, 参与鱼类机体的渗透调节过程, 不同鱼类肠道参与渗透调节的程度也不一样。广盐性鱼类进入海水后, 大量吞饮海水时吸收的 NaCl 主要通过鳃上皮的泌氯细胞排出体外(林浩然, 2011), 加之肾脏对 Na^+ 和 Cl^- 的重吸收, 肠道的参与程度大大降低。但某些鱼类的肠道明显参与到渗透调节过程中。低盐度时, 肠道对于 Na^+ 和 Cl^- 的吸收处于可调节范围内; 当处于高盐度时, 由于超过了鳃和肾脏自身的调节能力, 大量的 Na^+ 和 Cl^- 进入肠道中, 超出肠道的吸收范围, 高盐度就会对肠道组织产生结构性的影响。Rodríguez 等(2002)对西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)渗透调节的研究中发现, 暴露于高盐度时, 肠黏膜出现脱落, 核上细胞质空泡化。本研究中, 随着盐度的升高, 中华鲟幼鱼肠组织结构未观察到明显变化, 说明肠道在中华鲟幼鱼渗透调节过程中的参与程度较低, 但在高盐条件下仍能保持正常的组织结构, 进一步说明了中华鲟幼鱼对海水变化具有较强的适应能力。本研究表明, 淡水养殖中华鲟幼鱼具有较强的海水适应能力, 渗透调节器官主要通过改变鳃小片宽度和间距、泌氯细胞大小及肾小球大小和数量来适应海水盐度变化, 进而保证在海水环境中的生存能力。研究结果可为深入研究中华鲟海水适应渗透调节机制提供组织学资料。

参 考 文 献

- AMIRI B M, XU E G, KUPSCO A, *et al.* The effect of chlorpyrifos on salinity acclimation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 2018, 195: 97–102
- BŒUF G, PAYAN P. Review: How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2001, 130(4): 411–423
- CARMONA R, GARCÍA-GALLEGO M, SANZ A, *et al.* Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: Ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. *Journal of Fish Biology*, 2004, 64(2): 553–566
- CUI W X, MA A J, HUANG Z H, *et al.* Effects of salinity stress on the mRNA expression of PRL and Na^+ - K^+ -ATPase $\alpha 1$ of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 32–40 [崔文晓, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) PRL 基因、 Na^+ - K^+ -ATPase $\alpha 1$ 基因对盐度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 32–40]
- EL-LEITHY A A A, HEMEDA S A, NABY W S H A E, *et al.* Optimum salinity for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and mRNA transcripts of ion-regulation, inflammatory, stress- and immune-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 1217–1232
- GUO B F, CHANG J B, XIAO H, *et al.* The reproductive biology of first filial generation of *Acipenser sinensis* growing up in the freshwater environment. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(6): 940–945 [郭柏福, 常剑波, 肖慧, 等. 中华鲟初次全人工繁殖的特性研究. *水生生物学报*, 2011, 35(6): 940–945]
- HE X G. Study on the osmotic physiology and salinity preference of Chinese sturgeon during seawater adaptation. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2008, 4–13 [何绪刚. 中华鲟海水适应过程中生理变化及盐度选择行为研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2008, 4–13]
- HIROSE S, KANEKO T, NAITO N, *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 593–620
- HOU J L, CHEN L Q, ZHUANG P, *et al.* Structural changes of chloride cells in gills epithelia of juvenile *Acipenser schrenckii* acclimated to various salinities. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(3): 316–322 [侯俊利, 陈立桥, 庄平, 等. 不同盐度驯化下施氏鲟幼鱼鳃泌氯细胞结构的变化. *水产学报*, 2006, 30(3): 316–322]
- IMSLAND A K, GÚSTAVSSON A, GUNNARSSON S, *et al.* Effects of reduced salinities on growth, feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 2008, 274(2/3/4): 254–259
- JIANG M, RU S G, LIU X Y, *et al.* Preliminary study on the change of structure of chloride cell of gill of *Oreochromis Aureus* (*Steindachner*) under different salinities. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1998, 28(4): 603–608 [姜明, 汝少国, 刘晓云, 等. 不同盐度下蓝非鲫鳃泌氯细胞的结

- 构变化. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(4): 603–608]
- KRAYUSHKINA L S, GERASIMOV A A, SMIRNOV A V. Hypoosmotic regulation in anadromous marine sturgeon, with special reference to the structure and function of their kidneys and gill chloride cells. *Doklady Biological Sciences*, 2001, 378: 201–202
- LI L X, ZHANG H, WEI Q E, *et al.* Occurrence time and amount variation of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* at Xupu, Changshu section of Yangtze River after closure of Three Gorges Dam. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 611–618 [李罗新, 张辉, 危起伟, 等. 长江常熟溆浦段中华鲟幼鱼出现时间与数量变动. 中国水产科学, 2011, 18(3): 611–618]
- LI W. Mechanisms of salinity effects on growth performance and isosmotic point calculation in anadromous fish, Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2014, 23–36 [李伟. 盐度对中华鲟生长的影响机制及中华鲟的等渗点分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2014, 23–36]
- LIN H R. Fish physiology. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2011, 193–221 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011, 193–221]
- LIU B, GUO H Y, ZHU K C, *et al.* Growth, physiological, and molecular responses of golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758) reared at different salinities. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45: 1879–1893
- LIU J J, WANG J S, ZHAO X, *et al.* Microstructure changes in the gill epithelia of second filial *Acipenser sinensis* juvenile acclimated to various salinities for different time. *Journal of Hydroecology*, 2015, 26(1): 60–65 [刘娟娟, 王京树, 赵珣, 等. 不同盐度和驯养时间中华鲟子二代幼鱼鳃的显微结构变化. 水生态学杂志, 2015, 26(1): 60–65]
- LIU L L, LUO M, CHEN F X, *et al.* Effects of salinity on growth, and gill and kidney histological structures of juvenile pearl gentian grouper. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 505–510 [刘龙龙, 罗鸣, 陈傅晓, 等. 盐度对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长及鳃肾组织学结构的影响. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 505–510]
- LIU S, LI B, ZHANG C F, *et al.* Research advance on osmoregulation in teleost fish. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(20): 12239–12242, 12245 [刘珊, 李冰, 张成锋, 等. 硬骨鱼类渗透调控的研究进展. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 12239–12242, 12245]
- LUO J, DU H, WEI Q W, *et al.* Reproductive biology of an artificial population of endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 269–276 [罗江, 杜浩, 危起伟, 等. 濒危中华鲟人工群体的繁殖生物学. 中国水产科学, 2020, 27(3): 269–276]
- MCCORMICK S D, BRADSHAW D. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 147(1): 3–8
- RODRÍGUEZ A, GALLARDO M A, GIBERT E, *et al.* Osmoregulation in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(4): 345–354
- WANG X J, ZHANG X M, JIANG M. Salinity stress on the ultrastructure of gill, head kidney and spleen of rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(S): 85–90 [王晓杰, 张秀梅, 姜明. 盐度胁迫对许氏平鲷鳃、头肾、脾脏超微结构的影响. 中国海洋大学学报, 2006, 36(S): 85–90]
- WEI Q W, KE F N, ZHANG J M, *et al.* Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1/2/3/4): 241–255
- WEI Q W, LI L X, DU H, *et al.* Research on technology for controlled propagation of cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 1–11 [危起伟, 李罗新, 杜浩, 等. 中华鲟全人工繁殖技术研究. 中国水产科学, 2013, 20(1): 1–11]
- WEN J F, LAN J N, CAO M, *et al.* Effects of salinity on the histological structure of the gills, spleen, and muscle in *Lateolabrax maculatus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 112–118 [温久福, 蓝军南, 曹明, 等. 盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 112–118]
- WU B B. The morphological structure and variation in salinity adaptability of chloride cells on the gills of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in Yangtze estuary. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 14–21 [吴贝贝. 长江口中华鲟幼鱼鳃氯细胞的形态结构及盐度适应性变化. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 14–21]
- WU J M, WANG C Y, ZHANG S H, *et al.* From continuous to occasional: Small-scale natural reproduction of Chinese sturgeon occurred in the Gezhouba spawning ground, Yichang, China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 425–431 [吴金明, 王成友, 张书环, 等. 从连续到偶发: 中华鲟在葛洲坝下发生小规模自然繁殖. 中国水产科学, 2017, 24(3): 425–431]
- YU N, LI J E, OU Y J, *et al.* Structural changes in gill and kidney of juvenile grey mullet under different salinity. *Ecological Science*, 2012, 31(4): 424–428 [于娜, 李加儿, 区又君, 等. 不同盐度下鲢鱼幼鱼鳃和肾组织结构变化. 生态科学, 2012, 31(4): 424–428]
- ZHANG C J, SHI Z H, WANG J G, *et al.* On salinity-related effects on osmoregulation mechanism in marine teleost. *Marine Fisheries*, 2013, 35(1): 108–116 [张晨捷, 施兆鸿, 王建钢, 等. 盐度影响海水硬骨鱼类渗透压调节机理的研究与展望. 海洋渔业, 2013, 35(1): 108–116]
- ZHANG C L, CHEN C, LI Y L, *et al.* Effects of salinity on the survival and feeding of *Centropristis striata* larvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 77–82 [张春禄, 陈超, 李炎璐, 等. 盐度对条纹锯鲂 (*Centropristis striata*) 仔鱼的活力、开口、摄食的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 77–82]
- ZHANG M Q, CHEN C, LI Y L, *et al.* Effects of salinity on the hatching of the fertilized eggs of *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) and the observation of the morphological development of larvae, juvenile and young fish. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 81–89 [张梦淇, 陈超, 李炎璐, 等. 盐度对云纹石斑鱼 (*Epinephelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus* ♂) 受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 81–89]
- ZHANG S H, NIE P, SHU S W, *et al.* Mycobacteriosis in

- cultured F₂ generation Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and relevant blood physiological and biochemical indices. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 136–145 [张书环, 聂品, 舒少武, 等. 子二代中华鲟分枝杆菌感染及血液生理生化指标的变化. *中国水产科学*, 2017, 24(1): 136–145]
- ZHANG Y T, HUANG S, QIU H T, *et al.* Optimal salinity for rearing Chinese black sleeper (*Bostrychus sinensis*) fry. *Aquaculture*, 2017, 476: 37–43
- ZHAO F, QU L, ZHUANG P, *et al.* Salinity tolerance as well as osmotic and ionic regulation in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* gray, 1835) exposed to different salinities. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(2): 231–234
- ZHAO F, YANG G, ZHANG T, *et al.* Characters of morphology, distribution and quantity of branchial chloride cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated in freshwater and brackish water. *Marine Fisheries*, 2016, 38(1): 35–41 [赵峰, 杨刚, 张涛, 等. 淡水和半咸水条件下中华鲟幼鱼鳃上皮泌氯细胞的形态特征与数量分布. *海洋渔业*, 2016, 38(1): 35–41]
- ZHUANG P, ZHANG L Z, ZHANG T, *et al.* Effects of delaying first feeding time on the survival and growth of larval Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 560–565 [庄平, 章龙珍, 张涛, 等. 中华鲟鱼仔鱼初次摄食时间与存活及生长的关系. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 560–565]

(编辑 马瑾艳)

Adaptive Adjustment of Osmotic Organ Structure of Juvenile Chinese Sturgeon in Seawater Conditions

QIN Shaozong^{1,2}, LENG Xiaoqian², LUO Jiang², DU Hao²,
LIU Zhigang², QIAO Xinmei², XIONG Wei², WEI Qiwei^{1,2}①

(1. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei 430223, China)

Abstract The “land-sea-land” breeding pattern has become an important strategy for the rearing of Chinese sturgeon. In this study, juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in freshwater culture were utilized as the research object and an acclimation experiment was performed using continuous saltwater rearing conditions. To understand the adaptability changes of organs during osmoregulation, a comparative study was conducted on the structure of the gills, kidneys, and intestinal tissues of juvenile Chinese sturgeon grown in different salinities during seawater acclimation. The results showed that the survival rate of juvenile Chinese sturgeon in the seawater was 100%. During seawater acclimation, the breadth of the gill lamella significantly decreased ($P<0.05$), whereas the spacing of the gill lamella and chloride cell diameter significantly increased ($P<0.05$), suggesting that these juvenile Chinese sturgeon from a freshwater environment gradually adapted to a seawater environment by changing their gill lamella breadth and the space between the adjacent gill lamella, sped up their body and oxygen exchange capacity with the outside water conditions, and increased the chloride secretory cell sizes to improve the level of cell metabolism to cope in a water environment with high osmotic pressure. The glomerular diameter of the juvenile Chinese sturgeon decreased during seawater acclimation ($P<0.05$), and the number of glomerular decreased slightly; therefore, the juvenile Chinese sturgeon decreased the loss of body water by reducing the filtration function of their kidneys to adapt to the changes in osmotic pressure of the external environment. However, no obvious changes were observed in the intestinal tissue structure. The results showed that the juvenile Chinese sturgeon had strong seawater adaptability and osmotic adjustment of organs that adapted to the changes in seawater salinity by changing the breadth and spacing of their gill lamella, the size of the chlorine secretory cells, and the size and number of the glomerular.

Key words Chinese sturgeon; Osmoregulation; Organization structure; Seawater conditions

① Corresponding author: WEI Qiwei, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200115002

http://www.yykxjz.cn/

徐娟娟, 王卓群, 舒秀君, 程波, 任源远, 张欣, 王赛赛, 韩刚, 穆迎春, 宋怿. 吉富罗非鱼成鱼脏器系数的研究. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 90-97

XU J J, WANG Z Q, SHU X J, CHENG B, REN Y Y, ZHANG X, WANG S S, HAN G, MU Y C, SONG Y. Inverstation of organ coefficients of adult GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 90-97

吉富罗非鱼成鱼脏器系数的研究*



徐娟娟^{1,3} 王卓群^{2,3} 舒秀君^{2,3} 程波^{3①} 任源远³
张欣⁴ 王赛赛⁴ 韩刚³ 穆迎春³ 宋怿³

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
3. 中国水产科学研究院质量与标准研究中心 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室 北京 100141;
4. 北京市水产科学研究所 北京 100068)

摘要 为研究罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)组织脏器重量与体重的关系, 获得脏器系数。本研究随机选取 40 尾体重为 600~900 g 雄性吉富罗非鱼(GIFT)成鱼, 进行体重、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃、皮肤、胆囊、鳞片、肌肉及其他组织(鱼头、鱼鳍和鱼骨等)重量的测定, 对体重与各组织脏器重量进行相关性分析, 建立最优回归模型, 并采用体重约为 500 g 雄性吉富罗非鱼对各组织脏器重量进行模型外推验证。结果显示, 雄性吉富罗非鱼成鱼心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃、皮肤、胆囊、鳞片、肌肉和其他组织(鱼头、鱼鳍和鱼骨等)的脏器系数(%)分别为 0.12±0.02、1.22±0.20、0.11±0.03、0.13±0.05、1.58±0.30、2.85±0.17、3.31±0.38、1.05±0.24、2.89±0.41、51.60±2.09 和 29.66±2.00, 所有测定 11 个组织脏器重量与体重均呈显著正相关($P<0.001$), 符合一元线性回归模型($y=bx$), 所建立模型对体重为 500 g 雄性吉富罗非鱼心脏、肝脏、肾脏、脾脏、皮肤和肌肉重量预测误差均在 8% 以内。研究结果填补了罗非鱼脏器系数的空白, 并为鱼类生理学、毒理学及构建鱼类生理药代动力学(physiologically based pharmacokinetics, PBPK)模型提供了基础数据。

关键词 吉富罗非鱼; 体重; 脏器系数; 相关性分析; 回归模型

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0090-08

脏器系数是动物某组织器官的重量与其体重的比值, 它是直接描述动物体征的主要解剖数据群之一(赵丽丽等, 2018)。脏器系数是一个物种生物学标准化的依据, 是动物的基本生物学特征, 与动物的生理代谢过程密切相关。因其能反映动物的生理功能状态, 目前已成为动物生理学和毒理学研究常用的基础数据和重要评价指标(练有文等, 2006)。在动物毒理

学研究中, 脏器系数通常作为一种常用的生理指标, 通过受损脏器重量发生的变化, 反应化学物质的毒性大小和效应(赵丽丽等, 2018)。在新药临床毒理学研究、药品安全性评价和药效学实验中, 脏器系数是评价受试物毒性作用的重要指标, 对确认药物毒性作用的靶器官具有重要参考价值(董延生等, 2012; Nord, 1993)。在水产品质量安全研究中, 脏器系数是

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2019ZD0904)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD0904), and China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 徐娟娟, E-mail: 1418646441@qq.com

① 通讯作者: 程波, 副研究员, E-mail: chengb@cafs.ac.cn

收稿日期: 2020-01-15, 收修改稿日期: 2020-03-19

构建鱼类生理药代动力学 (physiologically based pharmacokinetics, PBPK) 模型最直接、最基础的数据(程波等, 2017)。

近年来, 测定实验动物脏器重量和脏器系数的研究较多, 但主要针对畜禽类和实验用小鼠等动物, 涉及品种包括猪(角建林等, 2013; 闵凡贵等, 2009)、羊(钱成等, 2015)、鸡(赵丽丽等, 2018)、犬(黄玲等, 2000)、小鼠(刘科等, 2018)和驴(肖海霞等, 2014)等。对于水产养殖动物, 多见于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)出肉率与体长、体高等可量性状(董在杰等, 2010)、瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio var. color*)形态性状与体重相关性(陈红林等, 2019)、翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)形态性状与体重和性别关系(董浚键等, 2018)、刺参(*Apostichopus japonicas*)体重与疣足数量关系等类似研究(Zhan *et al.*, 2019)。鱼类脏器重量和脏器系数最早可追溯至 60 年前, 美国学者 Robinson 等(1960)和 Wilber 等(1967)分别对鳙鱼(*Opsanus tau*)和河豚鱼(*Sphaeroides maculatus*)有过研究; Law 等(1991)研究虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)药物代谢残留模型中, 对其部分脏器系数进行了报道。时至今日, 鲜有其他相关报道和研究。

罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)是联合国粮食及农业组织(FAO)向世界推广的主要养殖品种之一, 在解决全球食品蛋白质来源方面发挥着重要作用。同时, 罗非鱼也是我国最主要的养殖品种之一。2018 年我国罗非鱼养殖产量约为 162.45 万 t, 稳居淡水鱼产量第 6 位(农业农村部渔业渔政管理局, 2019)。因此, 本研究以吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为研究对象, 围绕构建鱼类生理药代动力学 PBPK 模型迫切的数据需求, 开展雄性吉富罗非鱼成鱼体重和各组织脏器重量的解剖与测量, 研究其组织脏器重量与体重的关系, 以期为建立鱼类组织脏器解剖与测量技术提供方法参考, 为鱼类生理学和药物代谢残留预测研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验所用雄性吉富罗非鱼为北京市水产研究所小汤山良种繁育基地养殖 2 年的成鱼。其中, 体重为 600~900 g 的鱼体用于组织脏器测量, 500 g 左右鱼体用于回归模型预测功能的验证。实验前, 将吉富罗非鱼于 4 个缸体(1.5 m×1.5 m×1.0 m)的循环水养殖系统中暂养 7 d, 自然光照, 24 h 不间断充气, 每 2 d 更换 1/3 水体。暂养期间, 正常投饵, 观察其摄食情况

和鱼体表面, 去除不正常摄食和表面有损伤、病灶鱼体。实验前 2 d 不投饵, 使其肠胃内的食糜、粪便排空, 实验时分别随机选取 40 尾(600~900 g)和 3 尾(500 g 左右)雄性吉富罗非鱼作为实验对象。

1.2 药品、仪器和工具

肝素钠(H8060, ≥99.0%), MS-222 麻醉剂, 分析天平(精确度为 0.000 1 g), 电子天平(精确度为 0.01 g), 电热锅, 手术剪、手术刀、镊子等常规手术器械。

1.3 实验方法

组织脏器解剖方法参照《鱼类比较解剖》的方法(孟庆闻等, 1987)优化完善后进行。吉富罗非鱼采用 MS-222 麻醉剂麻醉, 吸水纸吸除鱼体表面水分, 称重并记录数据后, 断尾放血。本研究 11 个组织和脏器采集顺序为鳞片、鳃、胆囊、肝脏、脾脏、肠、心脏、肾脏、皮肤、肌肉和其他组织(鱼头、鱼鳍和鱼骨等)。

1.3.1 鳞片 经对比直接测量(测量采集鳞片重量)和间接测量(测定鱼体剔除鳞片前后重量之差)误差, 选取间接测量方法测定鳞片重量, 避免去除鳞片过程中水分蒸发, 以减少湿重误差。

1.3.2 鳃 随后立即取鳃。健康罗非鱼的鳃为鲜红色, 由鳃丝、鳃弓和鳃耙组成, 一侧 4 片, 本研究以获取 4 片鳃片且连接不断开为操作标准。

1.3.3 腹腔 从食道处剪断食道和系膜与内脏的连接组织, 摘取完整的腹腔内脏, 分离胆囊、肝脏、肠、脾脏, 并剖开肠后, 采用吸水纸吸去水分, 腹腔内脂肪归为其他组织。

1.3.4 心脏 先用镊子夹紧固定心脏, 再使用剪刀剪取心脏, 罗非鱼心脏由红色的心房、心室和白色的动脉球组成, 完整采集。

1.3.5 肾脏 剖取肾脏时, 先用手术剪剪开鱼体腹腔与脊椎的隔层, 用镊子沿两侧划开结缔组织, 并剔除结缔组织, 从后端夹住肾脏并轻向前拉, 需注意力度避免破损, 再取皮肤并称重。

1.3.6 肌肉 对于肌肉, 分两步进行重量测算。先进行两侧鱼片状肌肉摘取, 鱼片状肌肉重量记为 G_1 。剩余肌肉通过包含肌肉的骨骼组织前后重量差进行间接测算, 具体为将摘取鱼片后的剩余鱼体分离为头部、鱼鳍(背鳍、胸鳍、腹鳍、尾鳍)和肌肉骨骼混合组织 3 个部分, 肌肉骨骼混合组织称重(重量记为 G_2)后, 使用电热锅将其在开水中煮制 2 min 后剔去肌肉, 鱼骨称重(重量记为 G_3), 肌肉重量 = $G_1 + (G_2 - G_3)$ 。

1.3.7 其他组织 其他组织为头部、鱼鳍、煮制后

鱼骨、腹腔内脂肪和剔下的结缔组织等。所有选定实验鱼均按照上述操作步骤解剖,进行组织脏器分离后称重,其中,鳃、肝脏、肠、胆囊、脾脏、心脏和肾脏采用分析天平称重,鱼体重及其余组织使用电子天平称重。所有解剖和组织脏器分离均为同一人员操作,减少系统误差。脏器系数=脏器重量/体重 \times 100%。

1.4 数据处理

采用 Excel 2016 软件计算实测值的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SE)和脏器系数;用 R 语言(3.5.1 版本)分析各组织脏器重量和体重之间的回归关系和相

关系数,并建立回归模型,使用 3 尾体重约为 500 g 雄性吉富罗非鱼组织脏器重量进行模型预测功能的验证。

2 结果与分析

2.1 解剖操作回收率

本研究所用 40 尾鱼体重分布及解剖损失重量见图 1。从图 1 可以看出,实验用鱼平均体重为(744.35 \pm 66.98) g,解剖后平均体重为(710.00 \pm 70.05) g,解剖损失率在 1.89%~5.37%之间,解剖损失较小。

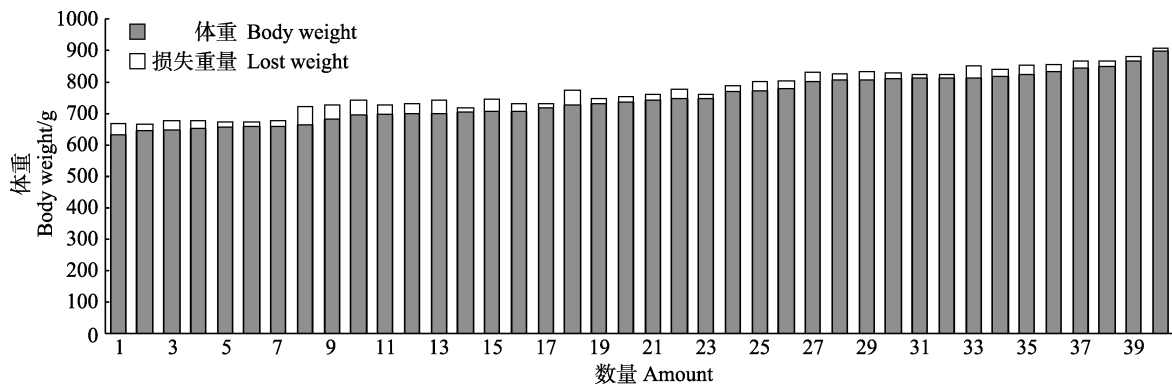


图 1 吉富罗非鱼体重与解剖后损失重量

Fig.1 Weight of GIFT Tilapia and weight loss after being dissected

2.2 各组织脏器重量及脏器系数

吉富罗非鱼各组织脏器的平均重量及脏器系数见表 1。从表 1 可以看出,心脏、肾脏和脾脏 3 种脏器重量相对最轻,在(0.84 \pm 0.26)~(0.96 \pm 0.44) g 之

表 1 吉富罗非鱼体重和组织脏器质量及脏器系数统计结果($n=40$)

Tab.1 Statistical results of body weight, organ and tissue weight, and organ coefficient of GIFT Tilapia ($n=40$)

项目 Items	重量 Weight/g	脏器系数 Organ coefficient /%
心脏 Heart	0.86 \pm 0.17	0.12 \pm 0.02
肝脏 Liver	8.99 \pm 1.84	1.22 \pm 0.21
肾脏 Kidney	0.84 \pm 0.26	0.11 \pm 0.03
脾脏 Spleen	0.96 \pm 0.44	0.13 \pm 0.05
肠 Intestine	11.71 \pm 2.81	1.58 \pm 0.30
鳃 Gill	21.02 \pm 2.29	2.85 \pm 0.17
皮肤 Skin	25.53 \pm 4.29	3.31 \pm 0.38
胆囊 Gallbladder	7.66 \pm 1.62	1.05 \pm 0.24
鳞片 Scales	21.42 \pm 4.14	2.89 \pm 0.41
肌肉 Muscle	380.51 \pm 43.50	51.60 \pm 2.09
其他组织 Carcass	217.84 \pm 19.03	29.66 \pm 2.00

间;肝脏、肠、鳃、皮肤、胆囊、鳞片重量居中,为(7.66 \pm 1.62)~(25.53 \pm 4.29) g;肌肉为(380.51 \pm 43.50) g,所占比例最大,为(51.60 \pm 2.09)%。

2.3 体重和各组织脏器重量之间的相关性分析

应用 R 语言中的线性回归(函数 l m)分析方法,进行体重和各组织脏器重量间的相关性分析。采用回归模型 $y=bx+a$ 的分析结果见表 2,采用回归模型 $y=bx$ 的分析结果见表 3 和图 2。2 种回归模型中,吉富罗非鱼 11 个组织脏器重量与体重之间均差异极显著($P<0.001$),即体重对所测 11 个组织脏器重量均有极显著影响。对于回归模型 $y=bx+a$,相关系数 R^2 仅肌肉达到 0.9,其他各组织脏器多在 0.5 左右,且胆囊的相关系数甚至仅为 0.000 3。对于回归模型 $y=bx$,相关系数 $R^2>0.89$,且肌肉的相关系数高达 0.998,拟合程度更好。从回归系数 b 值(即脏器系数)来看,回归模型 $y=bx$ 分析得到的 b 值几乎与实测脏器系数相等(表 1),而以回归模型 $y=bx+a$ 分析得到的 b 值与实测脏器系数相比偏离较大。综上所述,体重和 11 个组织脏器重量之间的相关性应采用一元线性回归模型 $y=bx$ 。

表 2 吉富罗非鱼体重和组织脏器重量一元线性回归(有截距)结果

Tab.2 Simple linear regression (with intercept) results of body weight and tissue and organ weight of GIFT Tilapia

项目 Items	脏器系数 Organ coefficients/%	回归常数 Regression constant	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient	P 值 P value
心脏 Heart	0.20	-0.615	$y=0.002 0x-0.615$	0.632 0	<0.001
肝脏 Liver	1.51	-2.160	$y=0.015 1x-2.160$	0.305 0	<0.001
肾脏 Kidney	0.25	-0.982	$y=0.002 5x-0.982$	0.405 0	<0.001
脾脏 Spleen	0.47	-2.491	$y=0.004 7x-2.491$	0.509 0	<0.001
肠 Intestine	2.89	-9.593	$y=0.028 9x-9.593$	0.476 0	<0.001
鳃 Gill	2.89	-0.277	$y=0.028 9x-0.277$	0.717 0	<0.001
皮肤 Skin	5.34	-14.758	$y=0.053 4x-14.758$	0.693 0	<0.001
胆囊 Gallbladder	-0.04	7.960	$y=-0.000 4x+7.960$	0.000 3	0.914
鳞片 Scales	4.74	-13.503	$y=0.047 4x-13.503$	0.590 0	<0.001
肌肉 Muscle	61.53	-72.523	$y=0.615 3x-72.523$	0.900 0	<0.001
其他组织 Carcass	20.81	64.660	$y=0.208 1x+64.660$	0.536 0	<0.001

表 3 吉富罗非鱼体重和组织脏器重量一元线性回归(无截距)结果

Tab.3 Simple linear regression (without intercept) results of body weight and tissue and organ weight of GIFT Tilapia

项目 Items	脏器系数 Organ coefficients/%	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient	P 值 P value
心脏 Heart	0.12	$y=0.001 2x$	0.991	<0.001
肝脏 Liver	1.21	$y=0.012 1x$	0.977	<0.001
肾脏 Kidney	0.11	$y=0.001 1x$	0.946	<0.001
脾脏 Spleen	0.13	$y=0.001 3x$	0.889	<0.001
肠 Intestine	1.61	$y=0.016 1x$	0.974	<0.001
鳃 Gill	2.86	$y=0.028 6x$	0.997	<0.001
皮肤 Skin	3.33	$y=0.033 3x$	0.990	<0.001
胆囊 Gallbladder	1.01	$y=0.010 1x$	0.965	<0.001
鳞片 Scales	3.00	$y=0.030 0x$	0.991	<0.001
肌肉 Muscle	51.93	$y=0.519 3x$	0.998	<0.001
其他组织 Carcass	29.55	$y=0.295 5x$	0.996	<0.001

2.4 回归模型预测结果验证

利用所建立的回归模型 $y=bx$ 对 3 尾雄性吉富罗非鱼[平均体重为(512.48±3.68) g]各组织脏器重量进行预测, 样本组织脏器实测值、预测值及预测值上、下限数据见表 4。从表 4 可以看出, 雄性吉富罗非鱼肝脏、肾脏和脾脏 3 种脏器重量预测值与实测值之间误差均在 4% 以内, 非常准确; 皮肤、肌肉和心脏 3 种组织脏器误差均在 6%~8%, 预测较为准确; 肠、鳞片和胆囊 3 种组织脏器误差均在 20% 左右, 误差较大。

3 讨论

3.1 解剖方法的可靠性

脏器系数的测定涉及鱼类解剖操作, 因鱼类相对于畜禽等动物而言, 个体较小, 具有鳞片, 且罗非鱼肾

脏属于弥散性状态等生理结构特征, 导致组织脏器的解剖和分离存在一定困难, 易产生误差。目前, 在水产基础科学中, 《水产动物组织胚胎学实验》(任素莲等, 2009)、《鱼类比较解剖》(孟庆闻等, 1987)、《鱼类学教程》(李承林, 2004)等专业教材虽对鱼类组织脏器进行了较为详细阐述, 但并无鱼类脏器解剖和测定的操作技术规范, 这增加了实验操作误差的不确定性。本研究在上述教材的基础上, 经过反复操作和方法比较, 确定不同组织脏器取样顺序和肌肉测定方法等, 所测解剖后组织脏器回收率在 94.63%~98.11% 之间, 解剖损失较小, 组织脏器测定较为准确, 该解剖方法和步骤具有一定参考和实用价值。

3.2 吉富罗非鱼成鱼体重和各组织脏器重量之间的线性回归模型

本研究表明, 吉富罗非鱼成鱼各组织脏器重量与

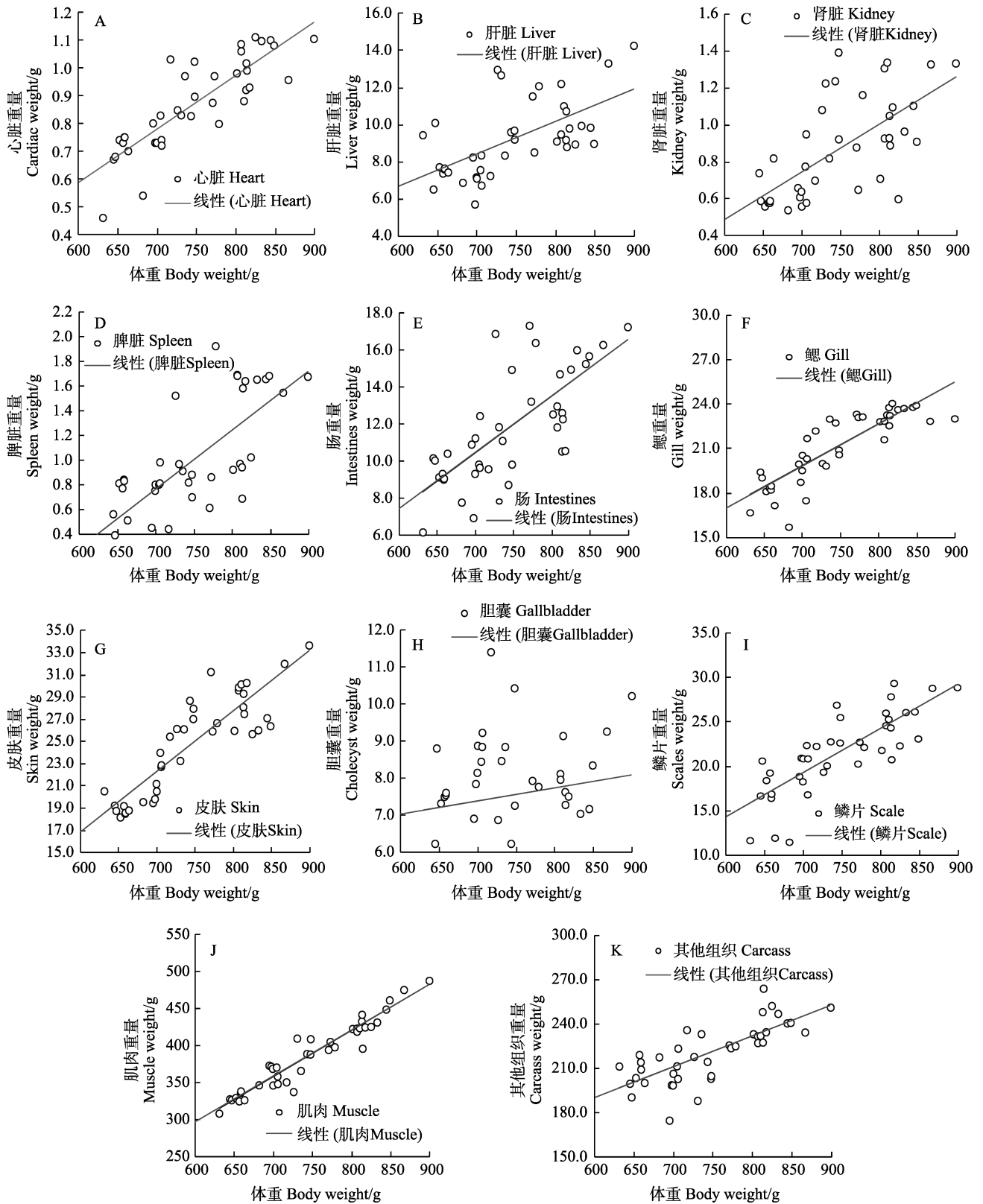


图2 吉富罗非鱼体重与各组织脏器重量的相关性

Fig.2 Correlation between body weight and tissue and organ weight of GIFT Tilapia

A~K 依次为体重与心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃、皮肤、胆囊、鳞片、肌肉和其他组织重量的相关性

A~K are the correlation between body weight and weights of heart, liver, kidney, spleen, intestine, gill, skin, gallbladder, scales, muscle and carcass

表4 实测值与回归模型预测结果
Tab.4 Measured values and prediction results of regression models

项目 Items	实测值 Measured value	预测值 Predicted value	误差值绝对值 Absolute value of error	误差百分比 Error percentage/%	下限值 Lower limit value	上限值 Upper limit value
心脏 Heart	0.65	0.60	0.05	7.66	0.37	0.84
肝脏 Liver	6.04	6.28	0.23	3.84	3.15	9.40
肾脏 Kidney	0.57	0.59	0.02	3.51	0.15	1.04
脾脏 Spleen	0.70	0.68	0.02	2.84	0.09	1.46
肠 Intestine	6.86	8.21	1.35	19.61	3.73	12.69
鳃 Gill	17.71	14.64	3.07	17.31	12.17	17.11
皮肤 Skin	16.16	17.17	1.01	6.23	11.64	22.70
胆囊 Gallbladder	7.45	5.29	2.16	28.94	1.70	8.89
鳞片 Scales	18.82	15.00	3.82	20.31	9.09	20.91
肌肉 Muscle	247.89	265.45	17.57	7.09	234.29	296.61
其他组织 Carcass	166.16	151.38	14.79	8.90	122.56	180.20

体重之间属于线性回归关系,即组织脏器重量随动物的生长而增加,这与蟾鱼(Robinson *et al*, 1960)、河豚鱼(Wilber *et al*, 1967)和其他畜禽动物(角建林等, 2013; 闵凡贵等, 2009; 钱成等, 2015; 赵丽丽等, 2018; 黄玲等, 2000; 刘科等, 2018; 肖海霞等, 2014)研究结果相一致。但上述研究均提及组织脏器与体重之间属于具有回归常数的一元线性回归模型($y=bx\pm a$)。本研究表明,无回归常数的一元线性回归模型($y=bx$)拟合更符合吉富罗非鱼,即当鱼体重(自变量)为0时,其他组织脏器重量(因变量)也应为0。另一方面,用一元线性回归模型($y=bx$)分析得出的各组织脏器回归方程系数**b**值,几乎等于实测脏器系数值,说明所建回归模型,在体重为600~900 g的雄性吉富罗非鱼上准确性较高。利用该模型对500 g左右的雄性吉富罗非鱼各组织脏器进行预测,主要脏器的预测结果与实测值接近,可见模型对于一定规格范围内罗非鱼鱼体,也具有较好的预测准确性。相比较而言,心脏、肝脏、肾脏、脾脏、皮肤、肌肉和其他组织预测误差相对较小,误差在10%以内,但肠、鳃、胆囊和鳞片的预测误差相对较大。一方面说明所构建回归模型预测功能对雄性吉富罗非鱼成鱼具有组织适用性;另一方面,也表明水产动物同其他陆生动物一样,组织脏器可能受动物品系、性别、年龄、饲养条件等因素的影响而存在其他科学规律(孙建新等, 2009),这有待进一步研究。

3.3 吉富罗非鱼成鱼脏器系数

目前,有关鱼类脏器系数仅见淡水鱼心脏系数的研究。本研究中,雄性成年吉富罗非鱼心脏系数为0.12,与Wilber等(1961)所研究的8种淡水鱼系数结

果相一致。按照 Bertin (1958)心脏系数在0.11左右即为超级游泳性(superior swimmers)鱼类的理论,结合罗非鱼善于游泳的情况,也间接表明本研究中吉富罗非鱼心脏系数的准确性。与虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)相比,吉富罗非鱼鳃(2.86 vs 3.90)、肠(1.61 vs 8.52)、肾脏(0.11 vs 0.80)、皮肤(3.33 vs 4.66)4个组织系数均较低,但吉富罗非鱼肌肉系数更高(51.93 vs 46.50),肝脏系数(1.21 vs 1.16)二者基本接近。与其他哺乳动物脏器系数相比,吉富罗非鱼的心脏、肝脏、肾脏、脾脏所占体重的比例远低于猪(角建林等, 2013; 闵凡贵等, 2009)、羊(钱成等, 2015)、鸡(赵丽丽等, 2018)、犬(黄玲等, 2000)、小鼠(刘科等, 2018)和驴(肖海霞等, 2014)等陆生动物。综上所述,不同物种脏器系数具有明显差异,即使同属于鱼类,虹鳟鱼肠的系数甚至为吉富罗非鱼肠系数的5倍以上。因此,在鱼类生理药代动力学PBPK模型构建中,借用畜禽动物生理参数或借用虹鳟鱼参数代替其他鱼类,可能影响结果的准确性。

参 考 文 献

- BERTIN L. Appareil circulatoire. In: Traite de zoologie. Agnathes et Poissons, 1958, 13(2): 1399-1458
- Bureau of fishery and fishery administration, ministry of agriculture and rural areas, national aquatic technology promotion station, China fisheries society. 2019 China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2019, 25 [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年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019, 25]
- CHEN H L, SI Z X, DU J X, *et al*. Correlation and path coefficient analysis of the morphometric traits and body

- weight for the four color patterns of Oujiang color common carp. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 110–116 [陈红林, 司周旋, 杜金星, 等. 4 种体色瓯江彩鲤形态性状与体质量的相关性与通径分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 110–116]
- CHENG B, AI X H, CHANG Z Q, *et al.* Direction of innovation and development for the study on drug metabolism residues of aquatic animals: The prediction technique based on PBPK model. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2017, 7(6): 42–47 [程波, 艾晓辉, 常志强, 等. 水产动物药物代谢残留研究及创新发展方向——基于 PBPK 模型的残留预测技术. *中国渔业质量与标准*, 2017, 7(6): 42–47]
- DONG J J, SUN C F, TIAN Y Y, *et al.* Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 76–84 [董浚键, 孙成飞, 田园园, 等. 翘嘴鲌主要形态性状与体重的相关性及其雌雄形态性状差异分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 76–84]
- DONG Y S, YIN J Y, CHEN C, *et al.* Establishment and application of the normal reference values of organ masses and organ/body coefficients in SD rats. *Military Medical Sciences*, 2012, 36(5): 351–353 [董延生, 尹纪业, 陈长, 等. SD 大鼠脏器重量及脏器系数正常参考值的确立与应用. *军事医学*, 2012, 36(5): 351–353]
- DONG Z J, LIANG Z Y, XU P, *et al.* Correlation between fillet yield and body measurements in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(2): 212–217 [董在杰, 梁政远, 徐跑, 等. 尼罗罗非鱼出肉率与可量性状的相关性. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 212–217]
- HUANG L, LI C Q, KUANG Z Y. Regressive analysis of the main organ weight and body weight of Beagle dogs. *Laboratory Animal Science and Administration*, 2000, 17(2): 35–37 [黄玲, 李常青, 邝枣园. Beagle 犬体重与各脏器重量之间关系的回归分析. *实验动物科学与管理*, 2000, 17(2): 35–37]
- JIANG J L, LI J T, HE B L, *et al.* Correlation of organ weight and body weight in out bred Diannan mini-pigs. *Journal of Kunming Medical University*, 2013, 34(1): 32–35 [角建林, 李进涛, 何保丽, 等. 封闭群滇南小耳猪体重和脏器重量的测定及其相关性分析. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(1): 32–35]
- LAW F C P, ABEDINI S, KENNEDY C J. A biologically based toxicokinetic model for pyrene in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991, 110(3): 390–402
- LI C L. *Ichthyology course*. Beijing: China Agriculture Press, 2004 [李承林. *鱼类学教程*. 北京: 中国农业出版社, 2004]
- LIAN Y W, WANG H, NI S K, *et al.* Measurement of organ weight and organ coefficient in BALB/c nude mice. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2006, 16(5): 285–287 [练有文, 王晖, 倪少凯, 等. BALB/c 系裸小鼠脏器重量、脏器系数的测定. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(5): 285–287]
- LIU K, SHI H H, YANG L, *et al.* Detection of blood biochemical, main organ weight and organ coefficient in 9th to 10th week-old CB6F1 and B6CF1 mice. *Laboratory Animal Science*, 2018, 35(1): 26–29 [刘科, 施赫赫, 杨林, 等. 9~10 周龄 CB6F1 与 B6CF1 小鼠血生化、主要脏器质量及脏器系数测定. *实验动物科学*, 2018, 35(1): 26–29]
- MENG Q W, SU J X, LI W D. *Comparative anatomy of fishes*. Beijing: Science Press, 1987 [孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. *鱼类比较解剖*. 北京: 科学出版社, 1987]
- MIN F G, PAN J C, YUAN W, *et al.* Correlation between organ weight and body weight in Outbred Wuzhishan mini-pigs. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2009, 17(6): 445–447 [闵凡贵, 潘金春, 袁文, 等. 封闭群五指山小型猪主要脏器重量与体重的相关性分析. *中国实验动物学报*, 2009, 17(6): 445–447]
- NORD H J. Quantitative vntersuchungen on musculus chomesticus. *Zoologischer Anzeiger*, 1993, 170(7/8): 311
- QIAN C, LUO W X, SU N F, *et al.* Determination of slaughter trait, meat quality and viscera coefficient in Guizhou white goat. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2015, 43(7): 121–123, 128 [钱成, 罗卫星, 苏娜芬, 等. 贵州白山羊的屠宰与肉质性状及脏器系数测定. *贵州农业科学*, 2015, 43(7): 121–123, 128]
- REN S L, YANG N, WANG D X, *et al.* Experimental tissue and embryology of aquatic animals. Qingdao: China Ocean University Press, 2009, 4 [任素莲, 杨宁, 王德秀, 等. *水产动物组织胚胎学实验*. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2009, 4]
- ROBINSON P F, WILBER C G, HUNN J. Organ-body weight relationship in the toadfish *Opsanus tau*. *Chesapeake Science*, 1960, 1: 120–122
- SUN J X, AN J, LIAN J. Analysis of factors affecting organ weight and organ coefficients in experimental animals. *Laboratory Animal Science*, 2009, 26(1): 49–51 [孙建新, 安娟, 连军. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析. *实验动物科学*, 2009, 26(1): 49–51]
- WILBER C G, SCHNEIDER R. Organ growth in the puffer fish, *Sphaeroides maculatus*. *Chesapeake Science*, 1967, 8(1): 63–65
- WILNET C G, ROBINSON P F, HUNN J B. Heart size and body size in fish. *Anatomical Record*, 1961, 140: 285–287
- XIAO H X, YU S J, PAREHATIJIANG W F E, *et al.* The analysis of weight and size of donkeys in 3 production areas by R project. *China Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2014, 30(11): 56–59 [肖海霞, 玉山江, 帕热哈提江. 吾甫尔, 等. 应用 R 语言分析新疆 3 个产区驴体尺和体重的相关性. *中国畜牧兽医文摘*, 2014, 30(11): 56–59]
- ZHAN Y Y, ZHANG W J, Ge C, *et al.* Relationships between body weight and other morphological traits in young sea cucumbers *Apostichopus japonicas*. *Journal of Oceanology*

and Limnology, 2019, 37(2): 759–766
ZHAO L L, HAN L X, YU H B, *et al.* Effects of different weeks of age and sex on the main organ coefficients, intestinal length and body size of SJ5-SPF chickens. Chinese Journal

of Comparative Medicine, 2018, 28(3): 67–71 [赵丽丽, 韩凌霞, 于海波, 等. 不同周龄、性别对 SJ5-SPF 鸡主要脏器系数、肠道长度和体尺的影响. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 67–71]

(编辑 陈 严)

Investigation of the Organ Coefficients of Adult GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

XU Juanjuan^{1,3}, WANG Zhuoqun^{2,3}, SHU Xiujun^{2,3}, CHENG Bo^{3①}, REN Yuanyuan³,
ZHANG Xin⁴, WANG Saisai⁴, HAN Gang³, MU Yingchun³, SONG Yi³

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Quality and Standards Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Aquatic Product Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture, Beijing 100141, China;

4. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

Abstract To study the relationships among tissues, organ weights, and body weight of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and obtain organ coefficients, 40 adult male GIFT tilapia with body weights of 600~900 g were randomly selected, and their body weight and weights of the heart, liver, kidney, spleen, intestine, gill, skin, gallbladder, scales, muscle, and carcass (fish head, fins, and fish bones) were measured, as well as the total weight of each fish after dissection. Correlation analysis was performed on the body weight and organ weights of the various tissues, an optimal regression model was established, and model extrapolation was verified using approximately 500 g of tilapia tissue organ weights. The results showed that the organ coefficients of the heart, liver, kidney, spleen, intestine, gill, skin, gallbladder, scales, muscle, and carcass of GIFT tilapia were 0.12 ± 0.02 , 1.22 ± 0.20 , 0.11 ± 0.03 , 0.13 ± 0.05 , 1.58 ± 0.30 , 2.85 ± 0.17 , 3.31 ± 0.38 , 1.05 ± 0.24 , 2.89 ± 0.41 , 51.60 ± 2.09 , and 29.66 ± 2.00 , respectively, and all the measured tissue and organ weights and body weight were significantly positively correlated ($P<0.001$). This was consistent with the univariate linear regression model ($y=bx$) and the predicted error of the model for the heart, liver, kidney, spleen, skin, and muscle of the tilapia was within 8%. These results provide baseline data for fish physiology, toxicology, and the construction of a physiologically-based pharmacokinetics model for veterinary medicine of fish.

Key words *Oreochromis niloticus*; Body weight; Organ coefficient; Correlation analysis; Regression model

① Corresponding author: CHENG Bo, E-mail: chengb@cafs.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200215002

http://www.yykxjz.cn/

李哲, 敬庭森, 李雨, 陆安帅, 周剑, 罗辉, 叶华. 长吻鲩形态性状对体质量的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 98–105
LI Z, JING T S, LI Y, LU A S, ZHOU J, LUO H, YE H. Effects of morphological traits on the body mass of *Leiocassis longirostris*.
Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 98–105

长吻鲩形态性状对体质量的影响*



李 哲¹ 敬庭森¹ 李 雨¹ 陆安帅¹
周 剑² 罗 辉¹ 叶 华^{1①}

(1. 西南大学水产学院 重庆 402460; 2. 四川省水产研究所 四川 成都 611731)

摘要 为探究长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)形态性状对体质量的影响,随机选取 115 尾 14 月龄的长吻鲩,测定其体质量(Y)、全长(X_1)、体长(X_2)、体高(X_3)、体宽(X_4)、头长(X_5)、头高(X_6)、头宽(X_7)、吻长(X_8)、尾柄长(X_9)、尾柄高(X_{10})和躯干长(X_{11})共 12 个性状,进行相关分析、通径分析和多元回归分析。结果显示,11 个形态性状与体质量的相关性均达到极显著水平($P<0.01$);全长、头宽、体长、吻长和尾柄高 5 个性状的通径系数达到显著水平($P<0.05$),其中,全长对体质量的直接作用最大;决定系数分析结果与通径分析结果一致,全长、头宽、尾柄高、体长和吻长的共同决定系数总和为 0.911,说明这 5 个性状是影响长吻鲩体质量的主要因素;运用多元回归分析建立以体质量(Y)为因变量,全长(X_1)、体长(X_2)、头宽(X_7)、吻长(X_8)和尾柄高(X_{10})为自变量的线性回归方程: $Y=-301.368+5.888X_1+5.988X_2+21.482X_7+16.408X_8+34.878X_{10}$ 。本研究可为长吻鲩生长相关性状选育提供理论依据,在长吻鲩优良个体选育中具有重要意义。

关键词 长吻鲩; 通径分析; 多元回归; 体质量; 形态性状

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0098-08

长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)在分类学上隶属鲇形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、鲿属(*Leiocassis*)、又名鲮鱼,是我国特有的名贵淡水经济鱼类(陈道印等, 2012),其肉质细嫩鲜美,营养丰富,在江鲜中与河鲶(*Tetraodontidae*)和刀鲿(*Coilia nasus*)齐名(陈萍, 2014)。邓楠楠等(2018)研究表明,由于长期过度捕捞,长吻鲩生态资源已严重枯竭,为满足长吻鲩的市场需求,选育具有优良性状的长吻鲩推动其养殖产业的可持续健康发展势在必行。在鱼类选育过程中,体质量是定向选育的常用指标,也是生产性能的直接反映

(张敏莹等, 2010; 王新安等, 2013),但由于水产生物的体质量易受基因连锁、多效性以及环境因素等影响(韩慧宗等, 2016),在选育过程中仅以体质量作为参考性状,难以获得最准确的结果,故需要采取更加直观的方法。鱼类的体质量与形态性状具有高度的相关性(Pérez-Rostro *et al*, 2003),并且形态性状在测量精度上准确度高,便于统一规格(刘阳等, 2019),因此,开展鱼类形态性状与体质量的关系研究,对鱼类优良品种的选育具有重要的指导意义。

在研究水产动物形态性状和体质量的关系时,相关

* 国家自然科学基金项目(31402302)、中央高校基本科研业务费项目(XDJK2017B008)和西南大学荣昌校区青年基金项目(20700938)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31402302), Universities Central the for Funds Research Fundamental the (XDJK2017B008), and Youth Fund Project of Southwest University Rongchang Campus (20700938)]. 李 哲, E-mail: 2892500707@qq.com

① 通讯作者: 叶 华, 教授, E-mail: yhlh2000@126.com

收稿日期: 2020-02-15, 收修改稿日期: 2020-03-23

分析、通径分析和多元回归分析的统计方法已被广泛使用(严福升等, 2010; 刘峰等, 2016; 陈亭君等, 2019; 李建立等, 2012), 到目前为止, 这3种统计方法已经应用在鱼类(袁美云等, 2010; 李玺洋等, 2012; 董浚键等, 2018)、虾蟹类(Campos-Montes *et al*, 2013; 张成松等, 2013; 杨长明等, 2011; 王春琳等, 2013; Ma *et al*, 2013)、贝类(Deng *et al*, 2008; Luo *et al*, 2013; You *et al*, 2010)和螺类(柴壮林等, 2011; Zhao *et al*, 2014)等水产动物形态性状和体质量关系的研究中。袁美云等(2010)运用3种统计方法确定了施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)形态性状与体质量的关系, 指出体长是影响体质量的主要因素, 并建立了多元回归方程。张成松等(2013)采用3种统计方法确定了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)形态性状与体质量的关系, 并确定体长对体质量的影响最大。Deng等(2008)也通过3种统计方法判断马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)的全湿重与壳长、壳高、壳宽和壳长存在显著的正相关。

本研究通过测定115尾14月龄长吻鮠的体质量和11个形态性状, 采用相关分析、通径分析和多元回归分析的方法, 研究影响长吻鮠体质量的主要形态性状, 并建立最优回归方程, 为长吻鮠生长性状选育工作的开展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

115尾14月龄长吻鮠取自四川省农科院水产研究所的四川岷江中游珍稀鱼类保护基地。本研究所选取实验鱼为同批次人工繁殖, 且饲养条件一致。

1.2 长吻鮠体质量和形态性状的测量方法

测量前使用60 $\mu\text{g/L}$ 的丁香酚将实验鱼麻醉, 并用滤纸和干毛巾吸干鱼的体表水分(耿绪云等, 2011), 采用电子天平称量体质量(Y), 精确到0.1 g, 参照鱼类学中鱼类外部形态性状的定义进行测量(谢从新, 2010)。使用直尺测量全长(X_1)、体长(X_2); 采用直尺和分规测量体高(X_3)、体宽(X_4)、头长(X_5)、头高(X_6)、头宽(X_7)、吻长(X_8)、尾柄长(X_9)、尾柄高(X_{10})、躯干长(X_{11}), 精确到0.1cm。记录所有测量数据。

1.3 数据处理

使用Excel 2016软件对所测数据进行初步统计整理, 计算长吻鮠各形态性状的平均值、标准差以及变异系数。运用SPSS 20.0软件对长吻鮠的形态性状间进行相关分析。参照安丽等(2008)的研究方法, 计

算通径系数和决定系数, 并运用多元回归分析对与体质量显著相关的形态性状建立最优回归方程。

2 结果与分析

2.1 形态性状的统计分析

由表1可知, 14月龄长吻鮠体质量的平均值和标准差分别为154.107 g和47.111 g, 变异系数为30.57%。除体质量外, 测量的11个外部形态性状的变异系数变化不大, 其中, 躯干长的变异系数最大, 为13.52%, 头长的变异系数最小, 为9.38%。

表1 长吻鮠形态性状及体质量的数据分析

Tab.1 Statistical analysis of morphological traits and body mass data of *L. longirostris*

性状 Trait	均值 Mean	标准偏差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
Y	154.107	47.111	30.57
X_1	26.431	2.579	9.76
X_2	21.316	2.234	10.48
X_3	4.321	0.537	12.43
X_4	3.541	0.424	11.98
X_5	6.277	0.589	9.38
X_6	3.668	0.440	11.99
X_7	3.568	0.414	11.60
X_8	2.388	0.261	10.91
X_9	3.151	0.381	12.08
X_{10}	1.617	0.192	11.84
X_{11}	7.137	0.965	13.52

注: Y 为体质量; $X_1 \sim X_{11}$ 分别为全长、体长、体高、体宽、头长、头高、头宽、吻长、尾柄长、尾柄高和躯干长。下同

Note: Y indicated body mass; From X_1 to X_{11} indicated total length, standard length, body height, body width, head length, head height, head width, snout length, caudal peduncle length, caudal peduncle depth, and trunk length, respectively. The same as below

2.2 形态性状及体质量的相关性分析

长吻鮠全长等11个形态性状与体质量的相关性均达到极显著水平($P < 0.01$)(表2), 其中, 长吻鮠的全长与体质量的相关系数最大, 达到0.936, 其次是体长与体质量之间, 相关系数为0.926。另外, 所有形态性状两两之间的相关性均达到极显著水平($P < 0.01$)。

2.3 形态性状对体质量的通径分析

通径分析表明, 直接作用达到显著或极显著水平的分别为全长、体长、头宽、吻长和尾柄高5个形态性状(表3), 其中, 全长的直接作用最大($P < 0.01$), 达到0.322。此外, 养殖长吻鮠全长、头宽的直接作用均达到极显著水平($P < 0.01$), 体长、吻长和尾柄高的直接作用达到显著水平($P < 0.05$), 其中, 长吻鮠全长、

体长、头宽、吻长、尾柄高 5 个形态性状的直接作用均小于间接作用。

2.4 全长、体长、头宽、吻长和尾柄高对体质量的决定程度分析

根据长吻鲮单个性状对体质量的决定系数和复合性状对体质量的共同决定系数公式, 计算单个性状

及复合性状对体质量的决定系数, 结果见表 4。在本研究中, 全长对体质量的单独决定系数最大, 为 0.104, 在两两性状对体质量的决定程度中, 全长和体长对体质量的共同决定系数最高, 为 0.298。单独决定系数和两两性状的共同决定系数的总决定系数为 0.911, 剩余因子为 0.089, 由此可见, 通过通径分析筛选的 5 个形态性状是影响长吻鲮体质量的主要性状。

表 2 长吻鲮形态性状与体质量间的相关分析

Tab.2 Correlation analysis between morphological traits and body mass of *L. longirostris*

	Y	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
Y	1.000	0.936**	0.926**	0.805**	0.801**	0.871**	0.839**	0.856**	0.695**	0.632**	0.855**	0.852**
X ₁		1.000	0.964**	0.783**	0.788**	0.897**	0.831**	0.837**	0.667**	0.679**	0.857**	0.884**
X ₂			1.000	0.772**	0.776**	0.838**	0.827**	0.819**	0.638**	0.684**	0.841**	0.861**
X ₃				1.000	0.738**	0.755**	0.789**	0.748**	0.638**	0.564**	0.737**	0.729**
X ₄					1.000	0.772**	0.732**	0.769**	0.592**	0.575**	0.725**	0.740**
X ₅						1.000	0.773**	0.824**	0.700**	0.630**	0.799**	0.789**
X ₆							1.000	0.801**	0.593**	0.580**	0.787**	0.792**
X ₇								1.000	0.637**	0.610**	0.754**	0.777**
X ₈									1.000	0.527**	0.618**	0.556**
X ₉										1.000	0.572**	0.501**
X ₁₀											1.000	0.780**
X ₁₁												1.000

注: **表示相关性极显著(P<0.01)

Note: ** indicated significant correlation at P<0.01 level

表 3 长吻鲮形态性状对体质量的通径分析

Tab.3 Path analysis of morphological traits on body mass of *L. longirostris*

性状 Trait	相关系数 Coefficient	直接作用 Direct effect	间接作用 Indirect effect					
			Σ	X ₁	X ₂	X ₇	X ₈	X ₁₀
X ₁	0.936**	0.322**	0.614		0.274	0.158	0.061	0.122
X ₂	0.926**	0.284*	0.642	0.310		0.155	0.058	0.119
X ₇	0.856**	0.189**	0.667	0.270	0.232		0.058	0.107
X ₈	0.695**	0.091*	0.604	0.215	0.181	0.120		0.088
X ₁₀	0.855**	0.142*	0.713	0.276	0.239	0.142	0.056	

注: X₁、X₂、X₇、X₈、X₁₀分别表示全长、体长、头宽、吻长、尾柄高; *表示差异显著(P<0.05)。下同

Note: X₁、X₂、X₇、X₈、X₁₀ indicated total length, standard length, head width, snout length, and caudal peduncle depth, respectively; * indicated significantly different at P<0.05 level. The same as below

表 4 养殖长吻鲮全长、体长、头宽、吻长、尾柄高对体质量的决定系数

Tab.4 The determinant coefficients of total length, standard length, head width, snout length, and caudal peduncle depth on body mass of *L. longirostris*

性状 Trait	X ₁	X ₂	X ₇	X ₈	X ₁₀
X ₁	0.104	0.088	0.051	0.020	0.039
X ₂		0.081	0.044	0.016	0.034
X ₇			0.036	0.011	0.020
X ₈				0.008	0.008
X ₁₀					0.020

注: 加粗的数字表示单一性状对体质量的决定系数

Note: The bold numbers indicated the determination coefficient of single trait to body mass

2.5 长吻鲮形态性状与体质量多元回归方程的建立

对多元回归方程和各形态性状的偏回归系数进行显著性检验。方差分析结果显示, 回归关系均达到极显著水平(F=222.158, P<0.01) (表 5)。各形态性状的偏回归系数的显著性检验结果显示, 全长和头宽均达到极显著水平(P<0.01), 体长、吻长和尾柄高达到显著水平(P<0.05)(表 6)。最终建立了长吻鲮的全长、体长、头宽、吻长和尾柄高 5 个形态性状为自变量, 体质量为因变量的最优多元回归方程: $Y = -301.368 + 5.888X_1 + 5.988X_2 + 21.482X_7 + 16.408X_8 + 34.878X_{10}$ 。回归

表 5 多元回归方程的方差分析

Tab.5 Variance analysis of multiple regression analysis

项目 Item	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 检验 F test	显著性 Significance
回归 Regression	230,406.926	5	46,081.385	222.158	0
残差 Residual	22,609.408	109	207.426		
总计 Total	253,016.334	114			

预测结果显示,系数检验显著($P<0.05$)(表 6),表明自变量可有效预测因变量的变异,即该方程可用于长吻鲢的选育。

表 6 养殖长吻鲢形态性状非标准化系数显著性检验

Tab.6 Significance test of non-standardized coefficient for morphological traits of *L. longirostris*

项目 Item	非标准化系数 Non-standardized coefficient		标准系数 Standardized coefficient	<i>t</i>	显著性 Signifi- cance
	回归 系数 Beta	标准误差 Standard error			
Variable	-301.368	14.665		-20.550	0
X_1	5.888	2.184	0.322	2.696	0.008
X_7	21.482	6.134	0.189	3.502	0.001
X_{10}	34.878	13.949	0.142	2.500	0.014
X_2	5.988	2.293	0.284	2.612	0.010
X_8	16.408	7.122	0.091	2.304	0.023

3 讨论

3.1 影响长吻鲢体质量的主要形态性状的确定

本研究中,全长、体高和体长等 11 个形态性状与体质量间的相关系数均达到极显著水平($P<0.01$),但并不全是影响体质量的主要形态性状。相关性分析方法计算得到的相关系数包含自变量对因变量的直接作用和通过影响其他变量而产生的间接作用,仅反映了变量间的综合关系,而不能反映变量间的真实关系,结果具有一定的片面性(曲焕韬等, 2018)。而通径分析将自变量和因变量的相关系数分解为自变量对因变量的直接和间接作用(刘小林等, 2002),可以准确判断影响体质量的主要形态性状。本研究中,通径分析结果显示,直接作用达到显著水平的 5 个形态性状分别为全长、体长、头宽、吻长和尾柄高,这一结果与相关分析结果相似。不同的是,虽然尾柄高和体质量的相关系数与头宽和体质量的相关系数接近,但头宽对体质量的直接作用却达到了极显著水平($P<0.01$),而尾柄高对体质量的直接作用仅达到显著水平($P<0.05$),这主要是由于头宽通过全长、体长、

吻长和尾柄高对体质量产生了较大的间接作用,而当个体具有较大的几何空间时,有利于脂肪和肝脏等营养物质的积累存贮,相应的个体体质量也较重(王新安等, 2008)。另外,全长对体质量的直接影响最高,但通过体长、头宽、吻长和尾柄高产生的间接作用却较小。因此,简单的通过相关分析来判定形态性状对体质量的影响显然并不准确,需要通过通径分析进一步找出影响体质量的主要形态性状。

多元回归方程的建立可以量化形态性状对体质量的影响关系(赵旺等, 2017)。偏回归系数的显著性检验结果显示,全长、体长、头宽、吻长和尾柄高对长吻鲢体质量的偏回归系数均达到极显著水平。在表型相关分析的基础上进行通径分析和决定系数分析时,只有当各自变量对依变量的单独决定系数和两两共同决定系数的总和在数值上 ≥ 0.85 ,才能表明已经找到了影响依变量的主要自变量(刘小林等, 2002)。本研究中,全长、体长、头宽、吻长和尾柄高的共同决定系数为 0.911(>0.85),说明保留的 5 个性状是影响体质量的重要性状,这一结果与杨月静等(2019)对齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)、胡彦波等(2018)对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和佟广香等(2011)对哲罗鲑(*Hucho taimen*)等的研究结果相似,影响体质量的形态性状集中在鱼体的长度、高度和宽度方面。经逐步回归分析,建立长吻鲢各形态与体质量的最优回归方程: $Y=-301.368+5.888X_1+5.988X_2+21.482X_7+16.408X_8+34.878X_{10}$ 。该研究结果可用于指导长吻鲢的选育,在长吻鲢优良个体选育中具有重要意义。

3.2 影响鱼类体质量的主要形态性状

多位学者运用相关分析、多元回归分析和通径分析对不同体型鱼类形态性状与体质量的关系进行分析(表 7)。相关数据表明,纺锤型鱼类的生长早期通常表现为鱼类长度和高度的增加(刘峰等, 2016; 曲焕韬等, 2018; 李玺洋等, 2012; 窦亚琪等, 2014; 胡彦波等, 2018; 佟广香等, 2011),可能与鱼类早期的生长主要是为了提升生存能力有关;而在生长的后期表现为长度、高度和宽度的增加,可能是因为当个体宽度较大时,有利于脂肪等物质的贮存,为繁殖提供营养支撑,这一结果与本研究一致。而影响纺锤型鱼类体质量

量的主要形态性状与影响圆筒型鱼类体质量的主要形态性状差别甚大。李军等(2017)研究表明,影响东北七鳃鳗(*Lampetra morii* Berg, 1931)和日本七鳃鳗(*Lampetra japonica* Martens, 1868)等圆筒型鱼类体质量的主要形态性状是长度,这可能是由于圆筒形鱼类的生长通常表现为长度的增加。学者们的研究也发

现,平扁型和侧扁型鱼类在生长过程中更倾向于体厚的增加(严福升等, 2010; 程大川等, 2016; 刘莹等, 2018)。另外,影响鱼类体质量的主要性状不仅会因为体型的不同产生差异,还会因为一些特殊形态产生差异。在本研究中,长吻鲢的吻长与体质量的相关系数和直接作用在这 5 个性状中最小,却能显著影响体

表 7 不同体型鱼类影响体质量的主要形态性状

Tab.7 Main morphological traits affecting body weight of different body types of fish

种类 Species	体型 Body type	年龄 Age	测量的性状 Measured traits	影响体质量的主要形态性状 Main morphological traits those affect body weight	文献来源 Reference
长吻鲢 <i>L. longirostris</i>	纺锤型	14 月龄	全长、体长、体高、体宽、头长、头高、头宽、吻长、尾柄长、尾柄高、躯干长	全长、体长、头宽、吻长、尾柄高	本研究 This study
小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	纺锤型	4.5 月龄	全长、体长、头长、躯干长、尾部长、尾柄长、尾柄高、体高	体长、躯干长、尾柄高、体高	刘峰等 (2016)
岩原鲤 <i>Procypris rabaudi</i>	纺锤型	6 月龄	全长、体长、躯干长、头长、眼后头长、吻长、眼径、体高、体宽、尾柄长、尾柄高	全长、体高、尾柄高	曲焕韬等 (2018)
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	纺锤型	2 龄	全长、体长、头长、体宽、体高、眼间距、肛前距	体长、体宽、眼间距、肛前距	李玺洋等 (2012)
翘嘴鲌 <i>Siniperca chuatsi</i> (Basilewsky)	纺锤型	2~6 月龄	全长、体长、体高、头长、眼径、尾长、尾柄长、尾柄高	体长、体高	窦亚琪等 (2014)
花鲈 <i>L. japonicus</i>	纺锤型	2 龄	全长、体长、体高、体宽、头长、头高、头宽、间距、吻长、尾柄高、尾柄长	全长、体宽、头长、尾柄高	胡彦波等 (2018)
哲罗鲑 <i>H. taimen</i>	纺锤型	1 龄	全长、体长、叉长、体高、体宽、头长、头高、头宽、眼径、眼间距、吻长	全长、体高、体宽、头高、头宽、眼间距	佟广香等 (2011)
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	侧扁型	3 月龄	全长、体长、体高、体厚、头长、吻长、吻间至腮裂前缘长、眼间距、尾长、尾柄长、尾柄高	全长、体高、体厚、尾柄高	程大川等 (2016)
大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i> (Linnaeus 1758)	侧扁型	6 月龄	全长、体长、头长、体高、尾柄宽、体厚	全长、体长、头长、体厚	刘莹等 (2018)
大菱鲂 <i>S. maximus</i> (Linnaeus 1758)	侧扁型	14 月龄	全长、体长、头长、体高、尾柄宽、体厚	全长、体厚、尾柄宽	刘莹等 (2018)
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	平扁型	3 月龄	全长、体长、头长、体厚、体高	体长、体厚、体高	严福升等 (2010)
东北七鳃鳗 <i>Lampetra morii</i> Berg, 1931	圆筒型		全长、躯干长、尾长、头长、吻长、眼径、背鳍前长、眼后头长	全长、头长、眼径、眼后头长	李军等 (2017)
日本七鳃鳗 <i>Lampetra japonica</i> Martens, 1868	圆筒型		全长、躯干长、尾长、头长、吻长、眼径、背鳍前长、眼后头长	全长、吻长、眼后头长	李军等 (2017)

质量($P<0.05$),但在袁美云等(2010)、曲焕韬等(2018)、白晓慧等(2015)和刘晓敏等(2015)的研究中未发现吻长对鱼类体质量能产生显著影响,这可能是因为长吻鮠的吻部较一般鱼类更长,同时也表明影响鱼类体质量的形态性状中含有与特殊形态相关的性状。

关于影响不同体型鱼类体质量的主要形态性状,还有待更多研究数据的支持,这对于揭示不同体型的鱼类在不同时期的生长策略具有重大意义。

参 考 文 献

- AN L, LIU P, LI J, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric traits on body weight for *Fenneropenaeus chinensis* named "Yellow Sea No.1". *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 779-786 [安丽, 刘萍, 李健, 等. "黄海1号"中国明对虾形态性状对体质量的影响效果分析. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 779-786]
- BAI X H, YOU H Z, ZHANG W, *et al.* Path analysis of effects of morphometric traits on body weight of *Oplegnathus punctatus*. *Journal of Economic Animal*, 2015, 19(04): 191-194, 201 [白晓慧, 尤宏争, 张伟, 等. 斑石鲷形态性状对体质量影响的通径分析. *经济动物学报*, 2015, 19(4): 191-194, 201]
- CAMPOS-MONTES G R, MONTALDO H H, MARTÍNEZ-ORTEGA A, *et al.* Genetic parameters for growth and survival traits in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* from a nucleus population undergoing a two-stage selection program. *Aquaculture International*, 2013, 21(2): 299-310
- CHEN D Y, ZHOU P, LIU Z Y. Key techniques of pond *Leiocassis longirostris* breeding. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 2012(2): 29-30 [陈道印, 周平, 刘正友. 池塘主养长吻鮠关键技术. *江西水产科技*, 2012(2): 29-30]
- CHEN P. *Leiocassis longirostris* breeding technology. *New Rural Technology*, 2014(9): 27-28 [陈萍. 长吻鮠养殖技术. *农村新技术*, 2014(9): 27-28]
- CHEN T J, HE X M, SHEN Y C, *et al.* Effects of morphological traits on body weight of 20-month-old *Soletellina acuta*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(6): 23-29 [陈亭君, 何旭盟, 申玉春, 等. 20月龄尖紫蛤壳形态性状对体质量的影响. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(6): 23-29]
- CHENG D C, GUO H Y, MA Z H, *et al.* Mathematical analysis of morphometric attribute effects on body weight for three-month-old *Trachinotus ovatus*. *Marine Fisheries*, 2016, 38(1): 26-34 [程大川, 郭华阳, 马振华, 等. 3月龄卵形鲳鲹形态性状对体质量的影响分析. *海洋渔业*, 2016, 38(1): 26-34]
- DENG N N, WANG R L, XÜ Z L. A preliminary study on imitating ecological breeding of *Leiocassis longirostris*. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(12):33-34 [邓楠楠, 王荣林, 徐志良. 长吻鮠仿生态养殖初探. *水产养殖*, 2018, 39(12): 33-34]
- DENG Y W, DU X D, WANG Q H, *et al.* Correlation and path analysis for growth traits in F_1 population of pearl oyster *Pinctada martensii*. *Marine Science Bulletin*, 2008, 10(2): 68-73
- DONG J J, SUN C F, TIAN Y Y, *et al.* Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 76-84 [董浚键, 孙成飞, 田园园, 等. 翘嘴鲌主要形态性状与体重的相关性及雌雄形态性状差异分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 76-84]
- DOU Y Q, LIANG X F, YI T L, *et al.* Principal component and discriminant analyses of traits of *Siniperca chuatsi* at different ages. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1116-1124 [窦亚琪, 梁旭方, 易提林, 等. 翘嘴鲌不同月龄性状的主成分与判别分析. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1116-1124]
- GENG X Y, MA W L, LI X P, *et al.* Morphometric attributes to body weight for the redlip mullet *Liza haematocheila*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 530-537 [耿绪云, 马维林, 李相普, 等. 梭鱼(*Liza haematocheila*)外部形态性状对体重影响效果分析. *海洋与湖沼*, 2011, 42(4): 530-537]
- HAN H Z, JIANG H B, WANG F, *et al.* Principal component and path analysis of morphological traits of selective groups at different month ages of *Sebastes schlegelii*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(8): 1163-1172 [韩慧宗, 姜海滨, 王斐, 等. 许氏平鲷不同月龄选育群体形态性状的主成分与通径分析. *水产学报*, 2016, 40(8): 1163-1172]
- HU Y B, WEN H S, ZHANG M Z, *et al.* Analysis of effects of morphological traits on body weight of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(2): 38-48 [胡彦波, 温海深, 张美昭, 等. 花鲈形态性状对体质量的影响效果. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(2): 38-48]
- LI J L, WANG C D, LI C X, *et al.* Growth and path analyses of hybrid families between the Peruvian and bay scallop. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 15-20 [李建立, 王春德, 李朝霞, 等. 紫扇贝和海湾扇贝杂交家系的生长和通径分析. *海洋科学*, 2012, 36(8): 15-20]
- LI J, DONG Y J, HAN Y L, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attribute on body weight of *Lampetra morii* and *Lampetra japonica*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017, 39(4): 61-71 [李军, 董彦娇, 韩英伦, 等. 东北七鳃鳗和日本七鳃鳗成体形态性状对体质量的影响分析. *海洋学报*, 2017, 39(4): 61-71]
- LI X Y, BAI J J, FAN J J, *et al.* The relationship between morphological characters and body weight of *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(4): 535-541 [李玺洋, 白俊杰, 樊佳佳, 等. 二龄草鱼形态性

- 状对体质量影响效果的分析. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 535–541]
- LIU F, CHEN L, LOU B, *et al.* Correlation and path coefficient analysis on body weight and morphometric traits of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 655–662 [刘峰, 陈琳, 楼宝, 等. 小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)形态性状与体质量的相关性及通径分析. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 655–662]
- LIU X L, CHANG Y Q, XIANG J H, *et al.* Analysis of effects of shell size characters on live weight in Chinese scallop *Chamys farreri*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(6): 673–678 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响效果分析. 海洋与湖沼, 2002, 33(6): 673–678]
- LIU X M, SHI Y. Effects of morphological traits of F₁ generation on body mass of *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2015, 42(6): 324–327, 333 [刘晓敏, 石英. 黄河鲤 F₁ 代形态性状对体质量的影响. 水产科技情报, 2015, 42(6): 324–327, 333]
- LIU Y, HAN H Z, WANG T T, *et al.* Phenotypic analysis of the main morphological traits and body weight of black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Progress in Fishery Sciences*. 2019, 40(5): 117–125 [刘阳, 韩慧宗, 王腾腾, 等. 许氏平鲷体质量与形态性状的表型特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 117–125]
- LIU Y, YU C Y, YU D D, *et al.* Path coefficient analysis and curve estimates for body mass and morphometric traits of *Scophthalmus maximus* at different growth stages. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2018, 34(3): 181–190 [刘莹, 于超勇, 于道德, 等. 不同生长时期大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)形态性状与体质量的通径分析及曲线拟合研究. 广西科学院学报, 2018, 34(3): 181–190]
- LUO X, KE C H, YOU W W. Estimates of correlations for shell morphological traits on body weight of interspecific hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* and *Haliotis gigantea*). *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32(1): 115–118
- MA H Y, MA C Y, MA L B, *et al.* Correlation of growth-related traits and their effects on body weight of the mud crab (*Scylla paramamosain*). *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(4): 4127–4136
- PÉREZ-ROSTRO C, IBARRA AM. Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research*, 2003, 34(7): 543–553
- QI Z L, WANG Y N, CHEN D Y, *et al.* Effect of morphometric traits on body weight in clam *Nerita yoldi*. *Fisheries Science*, 2011, 30(8): 505–508 [柴壮林, 王一农, 陈德云, 等. 齿纹蛭螺的形态性状对体质量的影响分析. 水产科学, 2011, 30(8): 505–508]
- QU H T, YANG Y J, LU X B, *et al.* Correlation and path analysis of morphometric attributes on body weight in *Procypris rabaudi*. *Fisheries Science*, 2018, 37(6): 769–774 [曲焕韬, 杨元金, 鲁雪报, 等. 岩原鲤形态性状与体质量的相关性及通径分析. 水产科学, 2018, 37(6): 769–774]
- TONG G X, KUANG Y Y, XU L X, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight in Taimen *Hucho taimen*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(2): 31–36 [佟广香, 匡友谊, 许凌雪, 等. 哲罗鲑形态性状与体重的相关性分析. 水产学杂志, 2011, 24(2): 31–36]
- WANG C L, WU D H, CUI Z X, *et al.* The effects of morphometric traits on body weight in F₂ population of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Marine Sciences*, 2013, 37(7): 100–108 [王春琳, 吴丹华, 崔朝霞, 等. 三疣梭子蟹选育群 F₂ S 表型性状对体质量影响的效果分析. 海洋科学, 2013, 37(7): 100–108]
- WANG X A, MA A J, XÜ K, *et al.* Relationship between morphometric attributes and body weight of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(3): 540–545 [王新安, 马爱军, 许可, 等. 大菱鲆幼鱼表型形态性状与体重之间的关系. 动物学报, 2008, 54(3): 540–545]
- WANG X A, MA A J, ZHUANG Z M, *et al.* Effects of morphometric attributes on body weight of *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 135–140 [王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)形态性状对体重的影响效果. 海洋与湖沼, 2013, 44(1): 135–140]
- XIE C X. *Ichthyology*. Beijing: China Agriculture Press, 2010, 14 [谢从新. 鱼类学. 北京: 中国农业出版, 2010, 14]
- YAN F S, WANG Z G, LIU X D, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for 3-month aged *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(2): 45–50 [严福升, 王志刚, 刘旭东, 等. 3月龄牙鲆形态性状对体质量的通径分析. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 45–50]
- YANG C M, HE T, LIU X L, *et al.* Stepwise regression analysis of morphometric attribute on body weight of *Penaeus vannamei*. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2011, 20(2): 15–20 [杨长明, 何铜, 刘小林, 等. 凡纳对虾形态性状对体质量的逐步回归分析. 西北农业学报, 2011, 20(2): 15–20]
- YANG Y J, XIANG M B, LIU T, *et al.* Relationship between morphological traits and body mass of culture 13-month-old *Schizothorax prenanti*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(6): 139–144 [杨月静, 向梦斌, 刘庭, 等. 13月龄养殖齐口裂腹鱼形态性状与体质量的关系. 河南农业科学, 2019, 48(6): 139–144]
- YOU W W, KE C H, LUO X, *et al.* Genetic correlations to morphological traits of small abalone *Haliotis diversicolor*. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(3): 683–686
- YUAN M Y, LIU S F, HAN Z Z, *et al.* Mathematical analysis of morphometric attribute effects on body weight for three-month-old *Acipenser schrenckii* Brandt. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 507–513 [袁美云, 刘双凤, 韩志忠, 等. 3月龄施氏鲟形态性状对体质量的影响分析.

- 中国水产科学, 2010, 17(3): 507–513]
- ZHANG C S, LI F H, XIANG J H. Path analysis of effects of morphometric attributes on body weight of *Exopalaemon carinicauda*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 809–815 [张成松, 李富花, 相建海. 脊尾白虾形态性状对体质量影响的通径分析. 水产学报, 2013, 37(6): 809–815]
- ZHANG M Y, LIU K, DUAN J R, *et al.* Path analysis of effects of morphometric traits on body weight of *Exopalaemon modestus* in Taihu Lake. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(21): 417–421 [张敏莹, 刘凯, 段金荣, 等. 太湖秀丽白虾形态性状对体重影响的通径分析. 中国农学通报, 2010, 26(21): 417–421]
- ZHAO L Q, HE Y Y, YANG F, *et al.* Correlation and path analysis of morphological and weight traits in marine gastropod *Glossaulax reiniana*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(4): 821–827
- ZHAO W, YANG R, HU J, *et al.* Path analysis of morphological traits effects on body weight of five-month-old grouper *Epinephelus coioides*. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(5): 557–562 [赵旺, 杨蕊, 胡静, 等. 5月龄斜带石斑鱼形态性状对体质量影响的通径分析. 大连海洋大学学报, 2017, 32(5): 557–562]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Morphological Traits on the Body Mass of *Leiocassis longirostris*

LI Zhe¹, JING Tingsen¹, LI Yu¹, LU Anshuai¹, ZHOU Jian², LUO Hui¹, YE Hua^{1①}

(1. College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 611731, China)

Abstract To explore the effects of morphological traits on the body mass of *Leiocassis longirostris*, 115 × 14-month-old samples were randomly selected. A total of 12 morphological traits including body mass, total length, standard length, body height, body width, head length, head height, head width, snout length, caudal peduncle length, caudal peduncle depth, and trunk length were measured and analyzed using correlation analysis, path analysis, and multiple regression analysis. The results showed that the correlation among these 12 morphological traits were all very significant ($P < 0.01$). The path analysis results showed that there were five morphological traits, including total length, standard length, head width, snout length, and caudal peduncle depth that reached a significant level ($P < 0.05$). Among these, total length had the greatest direct effect on body mass. The common determinant coefficient of total length, standard length, head width, snout length, and caudal peduncle depth was 0.911, which was consistent with the results of the path analysis, indicating that these five morphological traits were the main factors affecting the body mass of *L. longirostris*. The multiple regression analysis established a linear regression equation with body mass (Y) as the dependent variable and total length (X_1), standard length (X_2), head width (X_7), snout length (X_8), and caudal peduncle depth (X_{10}) as the independent variables, which was presented as $Y = -301.368 + 5.888X_1 + 5.988X_2 + 21.482X_7 + 16.408X_8 + 34.878X_{10}$. The results of this study provide a theoretical basis for the breeding of growth-related traits of *L. longirostris* and is of great significance for the breeding of individuals of this species.

Key words *Leiocassis longirostris*; Path analysis; Multiple regression; Body mass; Morphological traits

① Corresponding author: YE Hua, E-mail: yhlh2000@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200424002

http://www.yykxjz.cn/

王盼, 史文军, 万夕和, 沈辉, 沙士兵, 黎慧, 王李宝, 孙瑞健, 蒋葛, 吴旭干. 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化酶活力的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 106-115

WANG P, SHI W J, WAN X H, SHEN H, SHA S B, LI H, WANG L B, SUN R J, JIANG G, WU X G. Effects of hypoxia and reoxygenation on respiratory metabolism enzyme and antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 106-115

低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和 抗氧化酶活力的影响*



王 盼^{1,2#} 史文军^{2#} 万夕和^{2①} 沈 辉² 沙士兵²
黎 慧² 王李宝² 孙瑞健² 蒋 葛² 吴旭干¹

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 江苏省海洋水产研究所 江苏 南通 226007)

摘要 以静室呼吸耗氧-复氧为实验组, 持续充气组为对照组。于 0、1、2、4、5 h 及复氧 1、4、8 h 检测并分析了水体溶解氧(DO)和脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)组织主要呼吸代谢及抗氧化酶活力。结果显示, 随着时间的延长, 实验组 DO 不断降低, 且显著低于对照组($P<0.05$)。脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉细胞色素 C 氧化酶(CCO)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活力降低; 乳酸脱氢酶(LDH)、延胡索酸还原酶(FRD)活力升高, SDH/FRD 值降低。复氧后, 3 种组织 SDH、LDH 和 FRD 活力恢复至对照组, 肌肉 CCO 活力升高, 在复氧 8 h 时低于对照组($P<0.05$); SDH/FRD 值升高。随着时间的延长, 3 种组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和谷胱甘肽 S 转移酶(GST)活力均先升后降, 但肝胰腺的过氧化物酶(POD)活力降低, 而在鳃和肌肉中呈波动性变化; 复氧后, 3 种组织 SOD、CAT、GPX 和 GST 活力均恢复至对照组水平, 但鳃和肌肉的 POD 在复氧 8 h 时均低于对照组($P<0.05$)。研究表明, 随着 DO 的降低, 脊尾白虾有氧代谢逐渐降低, 无氧代谢逐渐升高。复氧后, 有氧代谢能力又逐渐恢复。上述抗氧化酶可能在脊尾白虾应对低氧-复氧中产生的氧化损伤发挥着重要作用。

关键词 脊尾白虾; 低氧; 呼吸代谢; 抗氧化能力

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0106-10

水体溶解氧(DO)是水生生物生存的必需因素之一, 在其生长、发育和繁殖等方面发挥重要作用。当

前, 在我国水产养殖过程中, 由于养殖密度高、养殖投入品的广泛使用和气候变化等, 导致水体中 DO 含

* 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201747)、2018 年江苏省农业科技自主创新项目(CX18-2010)、2018 年南通市科技计划项目(JCZ18066)和 2019 年南通市科技计划项目(JC2019057)共同资助 [This work was supported by Agricultural Major New Variety Creation Project of Jiangsu Province (PZCZ201747), Agricultural Science and Technology Independent Innovation Project of Jiangsu Province in 2018 (CX18-2010), Science and Technology Plan Project of Nantong in 2018 (JCZ18066), and Science and Technology Plan Project of Nantong in 2019 (JC2019057)].

#共同第一作者: 王 盼, E-mail: w18738397563@163.com; 史文军, E-mail: muzhiye080326@126.com

① 通讯作者: 万夕和, 研究员, E-mail: wxh1708@163.com

收稿日期: 2020-04-24, 收修改稿日期: 2020-05-21

量经常波动,有时可能会下降到生物体的生理极限以下,形成低氧环境,对水产养殖造成巨大威胁。李志华等(2004)研究表明,在虾类养殖过程中,DO含量应该不低于3 mg/L。当低氧发生时,会对虾的呼吸、代谢和抗氧化能力等方面产生影响。Richard等(1996)研究表明,短刀小长臂虾(*Palaemonetes pugio*)的耗氧量随着氧分压力的降低显著下降。Marion等(2016)研究表明,在长期低氧条件下,北方长额虾(*Pandalus borealis*)肌肉组织乳酸脱氢酶(LDH)活力显著降低。此外,Li等(2016)研究表明,在低氧条件下,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃、肝胰腺、血淋巴组织的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活力均增加。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)广泛分布于我国沿岸,因其具有生长快、繁殖能力强、味道鲜美且营养价值高等优点,已成为我国海水池塘养殖的主要虾类品种(连春盎等,2017; 窦全伟等,2019)。但脊尾白虾对氧的需求比较高,尤其是夏季高温季节,易出现缺氧死亡。目前,关于DO对脊尾白虾影响方面的研究相对较少,仅李明云等(1992)研究了脊尾白虾的窒息点和耗氧率;王琦等(2013)研究了干露胁迫对脊尾白虾HSP70和*ferritin*基因表达的影响;连春盎(2016)研究了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。尚未见对脊尾白虾进行渐变式低氧胁迫并分析其生理响应的研究。因此,本研究在封闭水体中,通过脊尾白虾的呼吸消耗逐渐产生低氧环境,模拟自然环境下水体低氧的形成过程,研究低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响,分析其生理指标的变化趋势,以期对脊尾白虾的健康养殖和耐低氧品系的选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料取自江苏省海洋水产研究所如东海水虾类科研基地。随机挑选体长为(5.1±0.2) cm,体重为(2.38±0.19) g,健康、活力好的脊尾白虾,于1000 L塑料圆桶中暂养7 d。暂养期间,海水盐度为25、水温为20℃~21℃,持续充气。每天投喂适量的配合饲料,实验前1 d停止投喂。每天换水1次,换水量约为总水量体积1/3。

1.2 实验设计

实验在盐度为25、温度为20℃~21℃条件下进行。

按预实验结果,随机将脊尾白虾分到装有5 L海水的三角瓶中,共48瓶,每瓶10尾,每3瓶为1个组。充气稳定0.5 h后,将实验组三角瓶停止充气,并用带有橡胶导管的橡胶塞密封,开始计时,待5 h后,打开橡胶塞,开始对实验组复氧并计时;对照组一直保持充气供氧。

1.3 样品的采集与测定

1.3.1 水样和组织采集 根据预实验结果,分别于实验开始0、1、2、4、5 h和复氧1、4、8 h,将水样采集至水样瓶中,用碱性碘化钾和MnCl₂固定液固定,用于后续DO的测定;同时,在每组水样取完后,立即打开橡胶塞,从各瓶中随机选取6尾活虾,取完整的鳃、肝胰腺和肌肉组织,液氮冻存后放入-80℃冰箱保存,用于后续酶活力的测定。

1.3.2 溶解氧测定 待水样固定1 h后(沉淀完全),按照海水监测规范(GB 17378.4-2007)规定的方法进行DO的测定。

1.3.3 酶活力测定 按1:9质量体积比,于上述鳃、肝胰腺和肌肉组织样品中加入0.86% NaCl溶液,冰浴下匀浆制成10%的组织匀浆液,离心,上清液分装后用于抗氧化酶和LDH活力测定;沉淀经匀浆介质重悬、超声破碎后制成线粒体匀浆液,用于细胞色素C氧化酶(CCO)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和延胡索酸还原酶(FRD)活力测定。CCO活力测定采用武汉纯度生物科技有限公司试剂盒;抗氧化酶、LDH和SDH活力以及蛋白含量测定均采用南京建成生物研究所试剂盒;FRD活力测定参照Xiao等(1993)方法。酶活力单位以U/mg prot表示,代表每毫克组织含有的酶活力单位数。

1.4 数据分析

采用SPSS统计软件进行数据分析,所有实验结果均采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。不同组同一时间点的数据采用*t*检验比较,同一组不同时间点的数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较,以*P*<0.05作为显著标准。

2 结果与分析

2.1 溶解氧浓度变化分析

对照组与实验组DO浓度的变化曲线见图1。从图1可以看出,随着静室呼吸耗氧时间的延长,实验组水体中DO含量不断降低,在呼吸耗氧2 h时,DO含量为3.70 mg/L;5 h时,DO含量已经由最初的7.92 mg/L

降至 1.10 mg/L, 而对照组 DO 含量一直保持相对稳定。实验组各时间点 DO 含量与对照组相比均差异显著($P<0.05$)。复氧后, 实验组 DO 含量迅速恢复到对照组水平, 且随着复氧时间的延长而一直保持稳定。

2.2 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢酶活力的影响

2.2.1 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉细胞色素 C 氧化酶活力的变化

从图 2 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 CCO 活力均呈逐渐降低的趋势。在呼吸耗氧 5 h 时, 酶活力降到最低值, 分别下降了 80.2%、48.7%、80.1%。鳃和肌肉组织酶活力在呼吸耗氧 1 h 时, 分别与各自的对照组相比差异显著($P<0.05$); 而肝胰腺组织酶活力在呼吸耗氧 4 h 时与对照组间存在显著差异($P<0.05$)。鳃和肌肉组织酶活力分别在呼吸耗氧 2、4、5 h 和 4、5 h 时均呈下降趋势, 但差异不显著($P>0.05$)。复氧后, 3 种组织 CCO 活力均逐渐升高, 3 种组织在复氧 4 h 时与各自的对照组相比均无显著差异($P>0.05$), 但肌肉组织酶活力在复氧 8 h 时, 显著低于对照组($P<0.05$)。

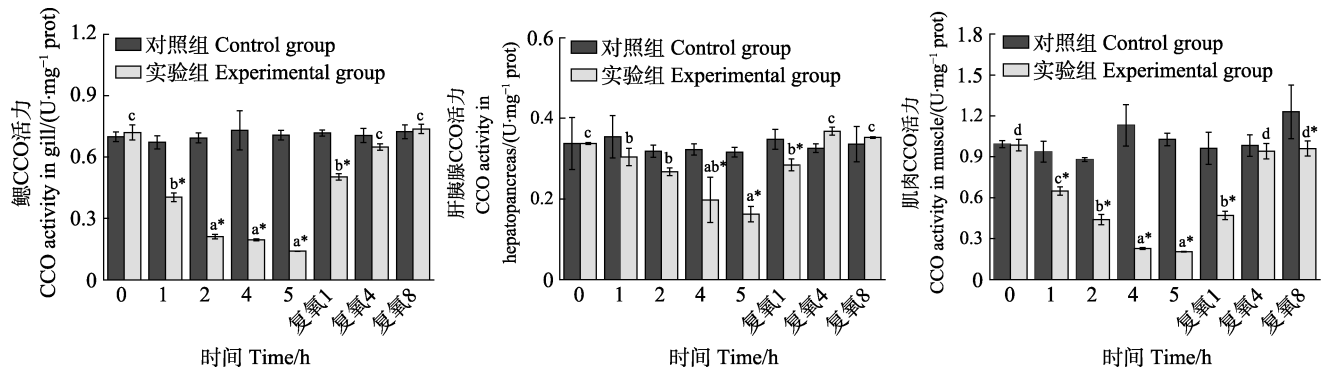


图 2 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 CCO 活力的变化

Fig.2 Changes of CCO activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

2.2.2 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉琥珀酸脱氢酶活力的变化

从图 3 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾的鳃、肝胰腺和肌肉组织 SDH 活力均呈逐渐降低的趋势。鳃和肌肉组织酶活力在呼吸耗氧 2 h、肝胰腺在呼吸耗氧 4 h 时, 才开始与各自的对照组相比差异显著($P<0.05$)。3 种组织酶活力在呼吸耗氧 5 h 时降到最低, 分别下降了 48.4%、66.8%、52.3%。复氧后, 3 种组织酶活力均呈逐渐升高的趋势。在复氧 1 h 时, 3 种组织酶活力虽然升高但均显著低于各自的对照组($P<0.05$)。在复氧 4 h 时, 鳃和肌肉组织酶活力与各自对照组相比差异不显著($P>0.05$), 而肝胰腺组织酶活力却显著低于对照组($P<0.05$); 复氧 8 h 时, 3 种组织酶活力与各自对照组相比均无显著差异

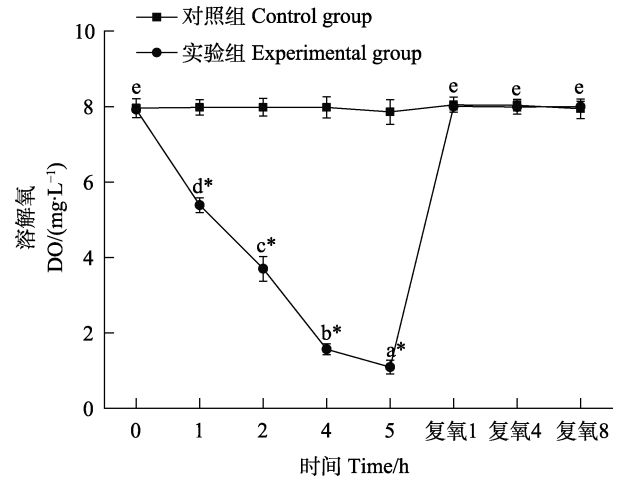


图 1 溶解氧浓度变化

Fig.1 Changes in dissolved oxygen concentration

不同小写字母表示同一处理组不同时间点差异显著, *表示实验组与对照组在相同时间点差异显著。下同
Different lowercases indicate significance difference ($P<0.05$) among the same treatment in different time points, *indicate significant differences ($P<0.05$) between experimental group and the control group at the same time. The same as below

($P>0.05$)。

2.2.3 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉延胡索酸还原酶活力的变化

从图 4 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 FRD 活力均呈逐渐升高的趋势。在呼吸耗氧 2 h 时, 3 种组织酶活力与各自对照组之间相比差异显著($P<0.05$); 在呼吸耗氧 5 h 时, 3 种组织酶活力均达到最大值, 分别升高了 77.4%、179.5%、81.6%。复氧后, 3 种组织酶活力均呈逐渐降低的趋势。在复氧 1 h 时, 酶活力虽然显著下降但依旧显著高于各自的对照组($P<0.05$), 继续复氧, 酶活力逐渐恢复至对照组水平, 在复氧 8 h 与各自对照组相比均无显著差异($P>0.05$)。

2.2.4 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉乳酸脱氢酶活力的变化 从图 5 可以看出,随着静室呼吸耗氧时间的延长,实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 LDH 活力均呈现逐渐升高的变化趋势。在呼吸耗氧 2 h 时,3 种组织酶活力与对照组相比存在显著差异($P<0.05$);在吸耗氧 5 h 时,3 种组织酶活力均达到最大值,分别

升高了 189.1%、103.6%、74.9%。复氧后,鳃和肌肉组织酶活力均逐渐降低,鳃组织酶活力在复氧 1 h 时仍显著高于对照组($P<0.05$);肌肉组织酶活力在复氧 1、4、8 h 与对照组相比均无显著差异($P>0.05$);肝胰腺组织酶活力在复氧阶段呈波动性变化,但在复氧 1、4、8 h 与对照组相比均无显著差异($P>0.05$)。

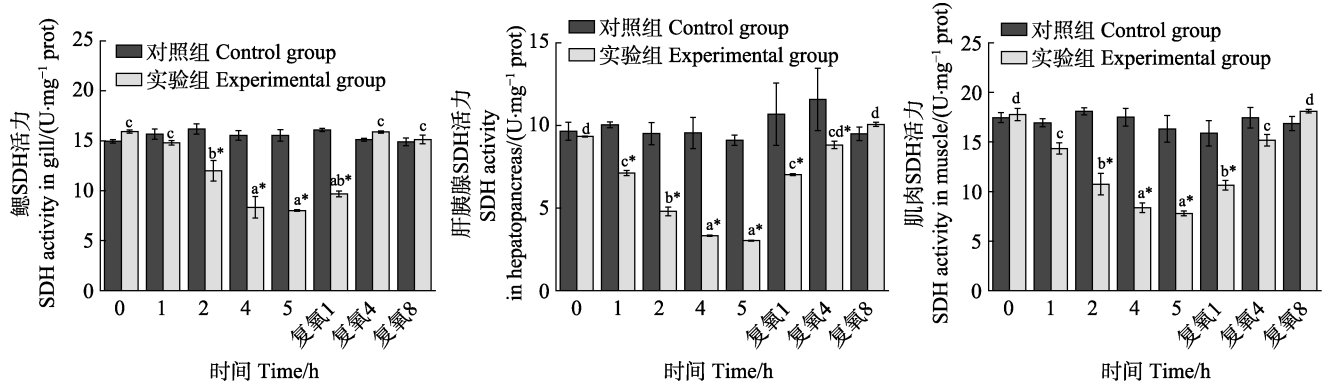


图 3 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 SDH 活力的变化

Fig.3 Changes of SDH activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

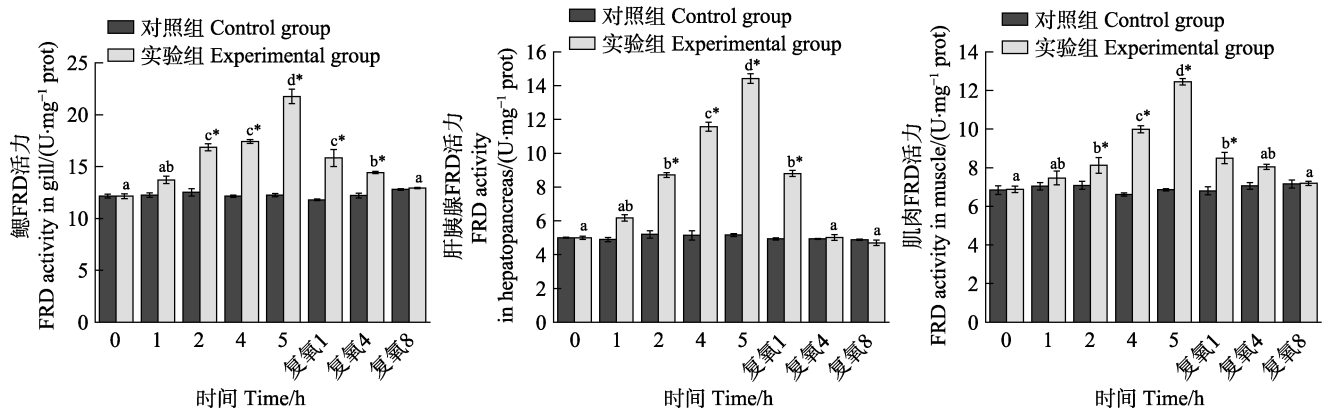


图 4 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 FRD 活力的变化

Fig.4 Changes of FRD activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

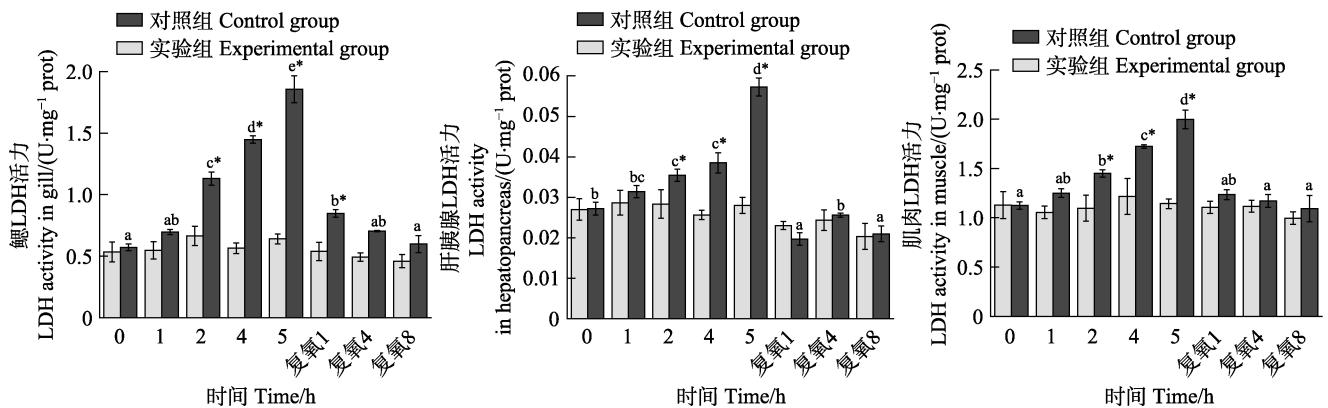


图 5 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 LDH 活力的变化

Fig.5 Changes of LDH activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

2.2.5 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 SDH/FRD 值的变化

从图 6 可以看出, 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 SDH/FRD 值的变化规律基本相似。随着静室呼吸耗氧时间的延长, 该比值呈逐渐降低的趋势, 在呼吸耗氧 5 h 时降到最低值; 复氧后, 该比值逐渐升高。从图 6 还可以看出, 该比值在下降和升高阶段, 肌肉和肝胰腺组织变化幅度相比于鳃组织中的变化幅度较大。

2.3 低氧-复氧对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响

2.3.1 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉超氧化物歧化酶活力的变化

从图 7 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 SOD 活力均呈先升高后降低的趋势, 在呼吸耗氧 4 h 达到最大值, 分别升高了 54.2%、29.9%、199.6%; 呼吸耗氧 5 h 时, 3 种组织酶活力均显著下降, 但只有肝胰腺组织酶活力显著低于对照组 ($P < 0.05$)。复氧后, 3 种组织酶活力均呈先升高后降低的趋势, 在复氧 1 h 时,

酶活力均显著高于各自的对照组 ($P < 0.05$); 复氧 4、8 h 时, 酶活力与各自对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$)。

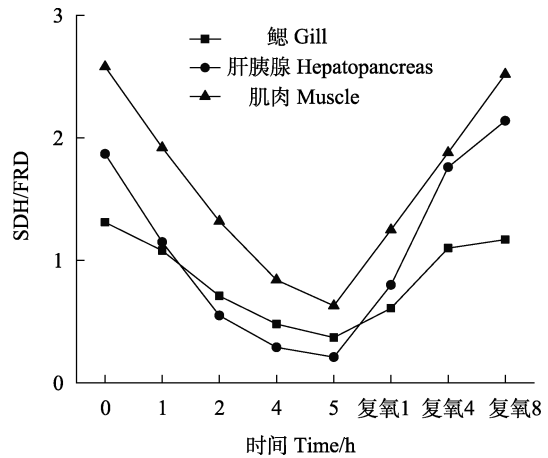


图 6 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 SDH/FRD 值的变化
Fig.6 Changes on value of SDH/FRD in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

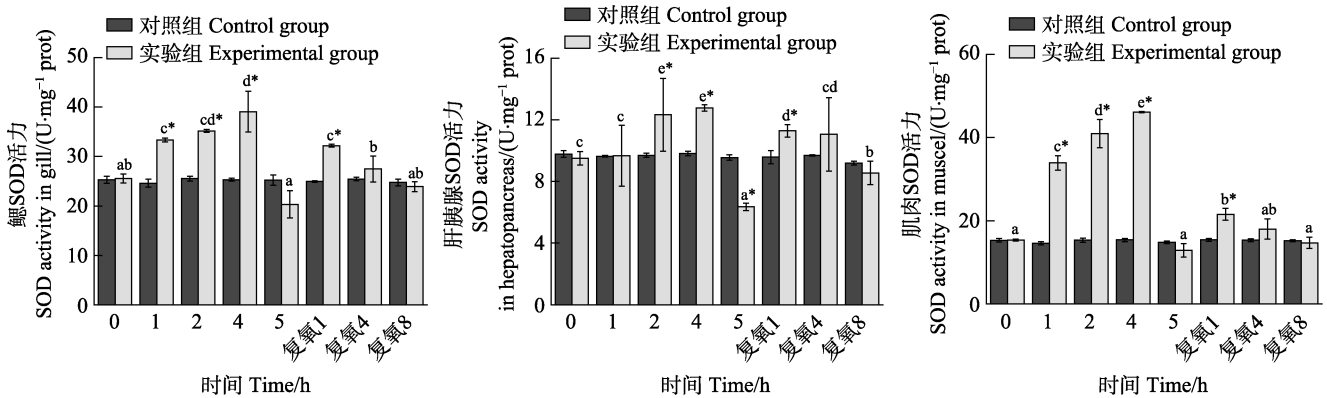


图 7 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 SOD 活力的变化
Fig.7 Changes of SOD activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

2.3.2 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉过氧化氢酶(CAT)活力的变化

从图 8 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾肝胰腺和肌肉组织 CAT 活力均呈先升高后降低的趋势, 在呼吸耗氧 4 h 达到最大值并显著高于各自对照组 ($P < 0.05$)。呼吸耗氧 5 h 时, 酶活力均显著降低 ($P < 0.05$), 但与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$); 鳃组织酶活力在呼吸耗氧阶段呈波动性变化, 在呼吸耗氧 1 h 时, 酶活力显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在呼吸耗氧 4 h 时显著升高并达到最大值, 继续呼吸耗氧至 5 h 时, 酶活力又显著降低 ($P < 0.05$) 但与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。复氧后, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 3 种组织酶活力均呈先升高后降低的趋势, 复氧 4、8 h 时, 3 种组织酶活力与各自对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3.3 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉过氧化物酶(POD)活力的变化

从图 9 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃和肌肉组织 POD 活力呈“降-升-降”的变化趋势, 但鳃组织酶活力在呼吸耗氧 5 h 时显著低于对照组 ($P < 0.05$); 肌肉组织酶活力呼吸耗氧 2 h 时显著低于对照组 ($P < 0.05$); 呼吸耗氧 4 h 时酶活力显著升高但与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$); 肝胰腺组织酶活力呈逐渐降低的趋势, 呼吸耗氧 2 h 时显著低于对照组 ($P < 0.05$)。复氧后, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 3 种组织酶活力均呈先升高后降低的趋势。复氧 1 h 时, 3 种组织酶活力显著升高并显著高于各自的对照组 ($P < 0.05$), 继续复氧酶活力不断降低, 但在复氧 8 h 时, 鳃和肌肉组织酶活力显著低于对照组 ($P < 0.05$), 肝胰腺组

织酶活力虽高于对照组但差异不显著($P>0.05$)。

2.3.4 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉谷胱甘肽过氧化物酶活力的变化 从图 10 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 GPX 活力均呈先升高后降低的趋势, 在呼吸耗氧 4 h 时达到最大值, 并显著高于各自的对照组($P<0.05$); 呼吸耗氧 5 h 时, 3 种组织酶活力均显著降低, 但肝胰腺组织酶活力显著低于对照组($P<0.05$),

而肌肉组织酶活力显著高于对照组($P<0.05$)。复氧后, 实验组脊尾白虾鳃和肝胰腺组织酶活力均呈先升高后降低的趋势。复氧 4 h 时, 酶活力达到最大值并显著高于对照组($P<0.05$); 复氧 8 h 时, 酶活力下降至低于对照组水平, 但差异不显著($P>0.05$)。肌肉组织酶活力在复氧 1 h 时显著降低($P<0.05$), 但与对照组相比无显著差异($P>0.05$), 继续复氧后, GPX 活力维持相对稳定。

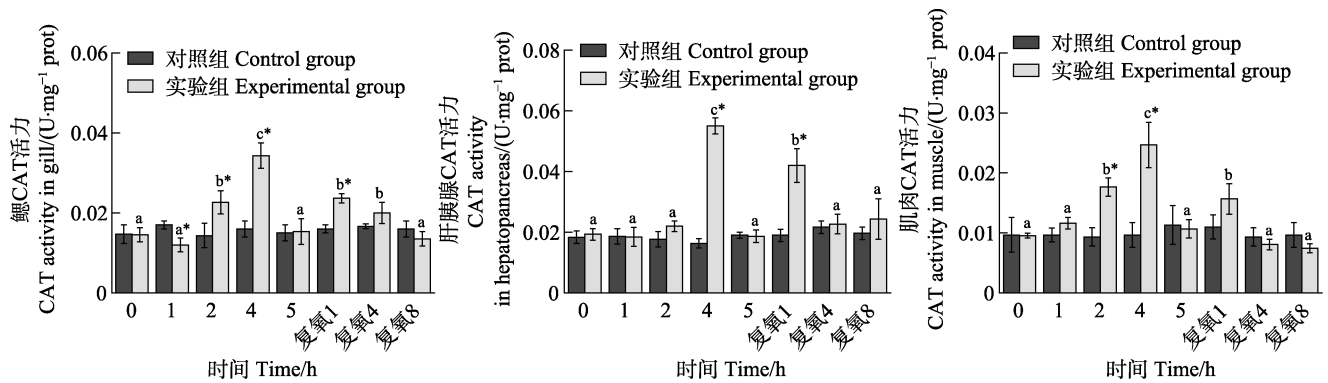


图 8 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 CAT 活力的变化

Fig.8 Changes of CAT activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

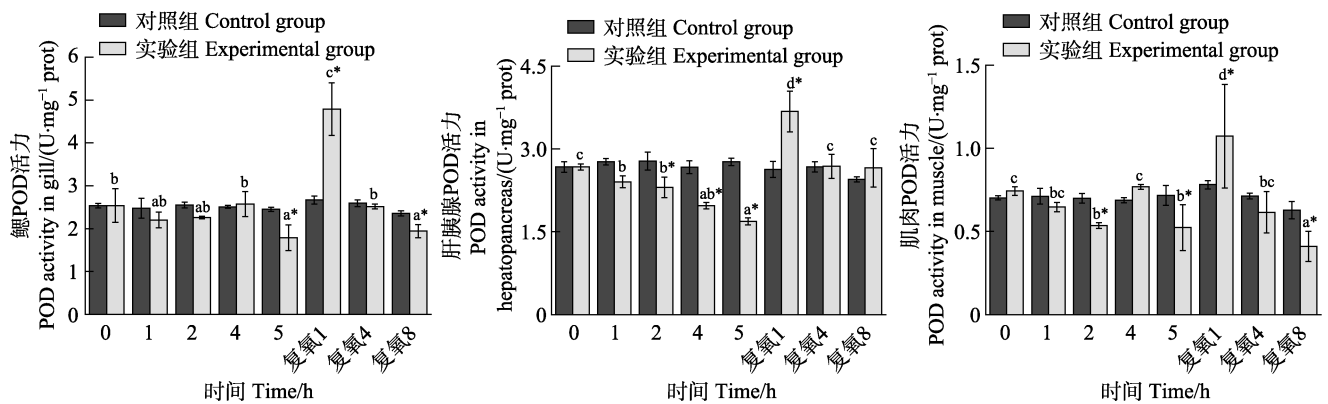


图 9 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 POD 活力的变化

Fig.9 Changes of POD activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

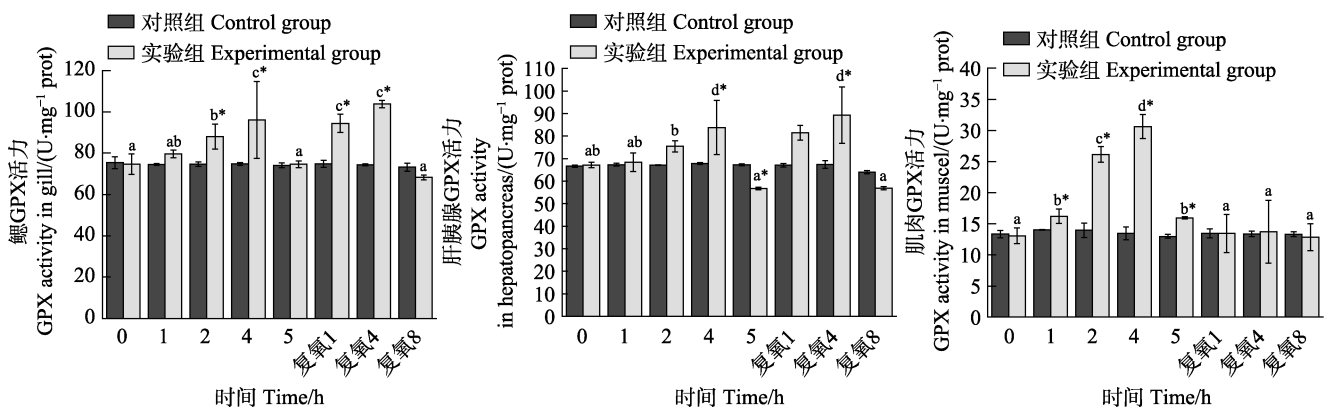


图 10 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 GPX 活力的变化

Fig.10 Changes of GPX activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

2.3.5 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 活力的变化 从图 11 可以看出, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 实验组脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉组织 GST 活力均呈先升高后降低的趋势, 在呼吸耗氧 4 h 时达到最大值并显著高于各自的对照组 ($P<0.05$); 呼吸耗氧 5 h 时, 酶活力均显著降低, 鳃和肝胰腺组织酶活力显著低于对照组 ($P<0.05$), 但肌

肉组织酶活力与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。复氧后, 肝胰腺和肌肉组织酶活力均呈先下降后升高的趋势, 肝胰腺组织在复氧 1 h 时显著低于对照组 ($P<0.05$), 肌肉组织酶活力在复氧期间与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$); 鳃组织酶活力逐渐升高, 但复氧 1 h 时仍显著低于对照组 ($P<0.05$), 继续复氧, GST 活力升高至对照组水平。

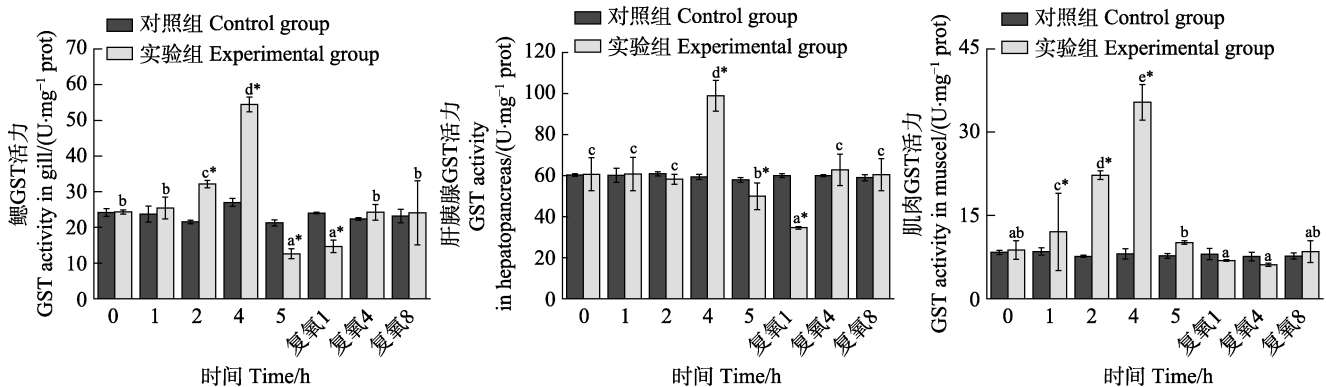


图 11 脊尾白虾鳃、肝胰腺和肌肉 GST 活力的变化

Fig.11 Changes of GST activity in gill, hepatopancreas and muscle of *E. carinicauda*

3 讨论

3.1 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢酶活力的影响

呼吸代谢常被用来评估十足目(Decapoda)甲壳动物在各种压力环境下的生理反应(Li *et al*, 2019)。在代谢过程中, 特定的酶会加速代谢产物的转化, 产生能量以满足机体的需要, 呼吸代谢酶活性的变化是代谢能力变化的直接反映(Bao *et al*, 2018)。CCO 是电子传递链末端的酶, 负责将电子从还原的细胞色素 c 转移到氢中, 从而产生 H₂O, 其活性是评价不同组织有氧呼吸产生能量的重要指标(Yau *et al*, 2018)。SDH 是唯一同时参加三羧酸循环和电子传递链的酶复合物(Haroon, 2018), 其活性在一定程度上可以反映有氧代谢水平; FRD 在三羧酸循环中催化其可逆反应(Messeder *et al*, 2017)。LDH 催化丙酮酸转变为乳酸及其可逆反应, 是生物体内参加无氧代谢的关键酶(Sun *et al*, 2018)。此外, 丁银娣等(2005)研究显示, SDH/FRD 值可以作为判断动物代谢类型的依据。

本研究结果显示, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, 脊尾白虾鳃、肝胰腺、肌肉组织 CCO 和 SDH 活力均逐渐降低, LDH 和 FRD 酶活力逐渐升高, 且 SDH/FRD 值呈逐渐降低的变化趋势。复氧后, 酶活力均逐渐恢复到对照组水平, SDH/FRD 值也逐渐升高。管越强等(2010)对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的研究显示, 随着低氧[(2.0±0.2) mg/L, 8 h]

暴露时间的延长, 肝胰腺和肌肉组织细胞 CCO 和 SDH 活力显著下降, LDH 和 FRD 活力显著上升; 恢复常氧水平[(7±0.2) mg/L, 2.5 h]后, CCO、SDH 和 LDH、FRD 活力逐渐恢复正常水平。Gutierrez 等(2013)研究表明, 在对凡纳滨对虾缺氧条件下, CCO 活性降低, 但随着缺氧时间的延长逐渐恢复。Bao 等(2019)研究表明, 在对中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)的研究中, 随着环境缺氧时间的延长, SDH 活力逐渐降低, LDH 活力逐渐升高; 复氧后, SDH 和 LDH 活力均逐渐恢复到正常水平。另外, 李泽健(2012)研究表明, 在低氧条件下, 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)呼吸代谢产生一定的影响, SDH/FRD 值呈下降趋势, 复氧阶段呈上升趋势。这些研究结果与本研究结果基本一致, 说明在低氧条件下, 脊尾白虾有氧代谢能力逐渐降低, 无氧代谢能力逐渐升高。复氧后, 这种代谢调控的转变又逐渐恢复, 机体可以通过代谢水平调控来适应逐渐缺氧的水生环境。

3.2 低氧-复氧对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响

在正常细胞呼吸过程中, O₂ 消耗量的 0.1%~0.2% 在逐步减少 O₂ 的过程中转化为活性氧(ROS), ROS 是具有未配对电子的高活性氧, 包括超氧自由基(O²⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(OH⁻)等, ROS 会损害细胞大分子, 如核酸、蛋白质和膜脂(Savin *et al*, 2006)。内源性抗氧化系统在抵消活性氧保护细胞免

受氧化应激中发挥重要作用, 这个系统主要由清除活性氧的酶组成, 包括 SOD、CAT、POD、GPX 和 GST(Li *et al.*, 2016; 李根瑞等, 2016)。O²⁻是最先产生的氧活性前体, SOD 将其催化为 H₂O₂, 尽管 H₂O₂ 依然有害, 但后续会被 CAT、POD、GPX 和 GST 催化转变为无害的 H₂O(Wang *et al.*, 2012; Casey *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018)。

本研究结果显示, 随着静室呼吸耗氧时间的延长, SOD、CAT、GPX 和 GST 活力均呈先升高后降低的趋势, 可能因为在实验前期的呼吸耗氧过程中, 实验组水体 DO 含量还处于比较高的水平, 虾体内摄氧量高, O²⁻产生多, 因此, SOD 活力升高, 导致产生的 H₂O₂ 水平上升, CAT、GPX 和 GST 活力也随之升高; 呼吸耗氧到实验后期时, 水体 DO 含量降至极低水平, 虾体内摄氧量下降, O²⁻的产生减少, SOD 活力下降, 导致产生的 H₂O₂ 水平降低, CAT、GPX 和 GST 活力也随之降低。在复氧后, SOD、CAT、GPX 和 GST 活力均呈先升高后降低逐渐恢复至对照组水平, 可能在复氧初期, 突然 O₂ 含量增加, 使脊尾白虾机体在短期内的摄氧量突然增加, 导致 O²⁻和 H₂O₂ 产生增多, SOD、CAT、GPX 和 GST 活力也随之升高, 随着复氧时间的延长, 机体逐渐适应并恢复, 酶活力也逐渐恢复至对照组水平。李利(2010)研究表明, 随着低氧暴露时间的延长, 日本沼虾肝胰腺组织 SOD 活力逐渐下降, CAT、GST 活力逐渐升高; 在常氧恢复阶段, SOD、CAT、GST 活力均恢复至对照组水平。杨明等(2019)在对日本沼虾的研究中发现, 低氧胁迫期间, 肌肉组织 SOD、CAT 和 GPX 活力呈先升高后下降的趋势。另外, Taylor 等(2011)研究也表明, 凡纳滨对虾在缺氧胁迫下, 肝胰腺组织中 SOD、CAT 和 GST 活力均高于对照组; 在复氧 1 h 时, SOD 和 GST 活力又明显的下降。这些研究结果与本研究结果有所不同, 可能是因为在实验低氧胁迫处理的方式存在差异。另外, 在本研究中, 鳃和肌肉 POD 活力在静室呼吸耗氧阶段呈波动性变化, 肝胰腺 POD 活力逐渐降低; 复氧处理后, POD 活力在鳃、肝胰腺和肌肉 3 种组织均呈现先升高后降低的变化趋势。Li 等(2006)在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的研究中发现, 随着养殖密度的增加, 实验组水体 DO 含量逐渐降低, POD 在低密度养殖中有较高的活力。而王春琳等(2008)在曼氏无针乌贼(*Sepiella maindrona*)的研究表明, 随着水体 DO 含量的不断下降, POD 活力呈先升高后降低的趋势。张晓梅等(2010)研究发现, 随着水体中 DO 胁迫程度的增加, 长蛸(*Octopusvariabilis sasaki*)体内的 POD 活力呈“降-升-

降”的变化趋势。推测可能由于物种和实验处理方式的差异, POD 在不同生物体所处地位存在差异。总之, 脊尾白虾在低氧胁迫及低氧后的复氧期间, 机体内抗氧化酶活力会发生显著变化, 这可能在脊尾白虾适应低氧及复氧环境处理机体产生的氧化损伤中发挥重要作用。

4 小结

本研究结果显示, 渐变式低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化能力存在影响, 处于水体 DO 逐渐降低的环境中时, 脊尾白虾体有氧代谢水平下降, 无氧代谢水平升高, 同时, 在 DO 低至一定程度时会激活机体的抗氧化酶系统; 复氧后, 有氧代谢能力逐渐恢复; 此外, 从低氧环境骤然复氧到对照组水平也会使抗氧化功能再次被激活, 但经过一段时间的适应, 虾体会逐渐恢复。目前, 在我国虾类水产养殖业中, 随着养殖规模的扩大, 高密度养殖已成为池塘养殖的主要模式, 这也加剧了缺氧发生的可能性, 必然会导致缺氧胁迫。因此, 有必要进一步深入探究低氧下脊尾白虾适应及调控的分子机制, 为今后耐低氧品系的育种工作做准备。

参 考 文 献

- BAO J, LI X D, YU H, *et al.* Respiratory metabolism responses of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* and Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, subjected to environmental hypoxia stress. *Frontiers in Physiology*, 2018(9): 1559
- CASEY D K, LOUIS E B, KAREN G B. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: Impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 170(1): 43-49
- CHU C, YU J L, WANG H, *et al.* Experiment on freshwater domestication aquaculture of *Exopalaemon carinicauda*. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 38(12): 76-77 [褚春, 于杰伦, 王慧, 等. 脊尾白虾淡水驯化养殖试验. *山东畜牧兽医*, 2017, 38(12): 76-77]
- DING Y D, WANG Q, LI K, *et al.* Biochemical composition and sperm metabolism in male reproductive system of crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 22(5): 562-568 [丁银娣, 王群, 李恺, 等. 红螯螯虾雄性生殖系统的生化组成及精子代谢. *中国水产科学*, 2005, 22(5): 562-568]
- DOU Q W, LI J T, LIU P, *et al.* cDNA cloning and immunological properties of two variants of hemocyanin subunit with higher molecular weight in *Exopalaemon carinicauda*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(1): 37-44 [窦全伟, 李吉涛, 刘萍, 等. 脊尾白虾 2 种血蓝蛋白大亚基变体的克隆及功能分析. *水生生物学报*, 2019, 43(1): 37-44]
- GUAN Y Q, LI L, WANG H C, *et al.* Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Hebei University (Natural Science)*, 2010, 30(3): 301-306 [管越强, 李利, 王慧

- 春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响. 河北大学学报(自然科学版), 2010, 30(3): 301–306]
- GUTIERREZ L R J, LOPEZ J H, OSUNA M A I, *et al.* Three nucleus-encoded subunits of mitochondrial cytochrome c oxidase of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA characterization, phylogeny and mRNA expression during hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2013, 166(1): 30–39
- HARON A R M. Succinate dehydrogenase complex: An updated review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2018, 142(12): 1564–1570
- HAN S Y, WANG M Q, 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
- LI G R, REN L H, SUN G H, *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]
- LI J T, XU X W, LI W T, *et al.* Linking energy metabolism and locomotor variation to osmoregulation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 234: 58–67
- LI L. Effects of hypoxia on respiratory metabolism, energy metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*. Master's Thesis of Hebei University, 2010 [李利. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢、能量代谢和抗氧化能力的影响. 河北大学硕士研究生学位论文, 2010]
- LI M Y, BAO J M, WU C E. Experiment on the oxygen consumption rate and the asphyxiant point of *Exopalaemon carinicauda*. *Marine Fisheries*, 1992(6): 251–253 [李明云, 包坚敏, 吴春娥. 脊尾白虾窒息点与耗氧率的试验观察. 海洋渔业, 1992(6): 251–253]
- LI Y H, WEI L, CAO J R, *et al.* Oxidativestress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 2016, 144: 234–240
- LI Y Q, LI J, WANG Q Y. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2006, 256(1/2/3/4): 608–616
- LI Z H, WANG J H, XIE S. Analysis of the role of environmental factors in shrimp farming. *Reservoir Fisheries*, 2004(5): 1–4 [李志华, 王军霞, 谢松. 环境因子在虾类养殖中的作用分析. 水利渔业, 2004(5): 1–4]
- LI Z J. Effects of hypoxia Stress on energy metabolism, respiratory metabolism and antioxidant metabolism of *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Hebei University, 2012 [李泽健. 低氧胁迫对中华绒螯蟹能量代谢、呼吸代谢及抗氧化代谢的影响. 河北大学硕士研究生学位论文, 2012]
- LIAN C A, LI J, LI J T, *et al.* Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 53–60 [连春盎, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)呼吸代谢相关酶的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 53–60]
- LIAN C A. Effect of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes and HIF-1 of *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]
- MARION P, AURELIE D P, DENIS C, *et al.* Effects of exposure to hypoxia on metabolic pathways in northern shrimp (*Pandalus borealis*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, 483: 88–96
- MESSEDER D J, CAGLIAN C C, RAUBER R, *et al.* Fumarate reductase superfamily: A diverse group of enzymes whose evolution is correlated to the establishment of different metabolic pathways. *Mitochondrion*, 2017, 34: 56–66
- RICHARD E C, LOUIS E B. Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomus xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, 195(1): 125–144
- SAVIN T Z, SALDIEMA R, SANDOVAL M A. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2006, 142(3–4): 301–308
- SUN S M, FU H T, ZHU J, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of lactate dehydrogenase from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1990
- TAYLOW D P P, SAVIN T Z. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 2011, 318(3/4): 379–383
- WANG C L, WU D H, DONG T Y, *et al.* Oxygen consumption rate and effects of hypoxia stress on enzyme activities of *Sepiella maindron*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(11): 2420–2427 [王春琳, 吴丹华, 董天野, 等. 曼氏无针乌贼耗氧率及溶氧胁迫对其体内酶活力的影响. 应用生态学报, 2008, 19(11): 2420–2427]
- WANG D D, LI F H, CHI Y H. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress and Chaperones*, 2012, 17: 423–433
- WANG Q, LI J, LI J T, *et al.* The effect of dry exposure on HSP70 and ferritin gene expression level in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 409–414 [王琦, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) HSP70 和 ferritin 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 409–414]
- XIAO S H, FENG J J, GUO H F, *et al.* Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on succinate dehydrogenase, fumarate reductase, and malate dehydrogenase in *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1993, 14(2): 151–154
- YAU C H, MENG H C, TSUNG H L. An assay of optimal cytochrome c oxidase activity in fish gills. *Analytical Biochemistry*, 2018, 553: 38–45
- YANG M, SUN S M, FU H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 493–503 [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响. 中国水产科学, 2019, 26(3): 493–503]
- ZHANG X M, WANG C L, LI L G, *et al.* Oxygen consumption rate and effect of hypoxia stress on enzyme activity of *Octopus variabilis*. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(2): 72–79 [张晓梅, 王春琳, 李来国, 等. 耗氧率及溶氧胁迫对长蛸体内酶活力的影响. 水生态学杂志, 2010, 3(2): 72–79]

Effects of Hypoxia and Reoxygenation on Respiratory Metabolism Enzyme and Antioxidant Enzyme Activities in *Exopalaemon carinicauda*

WANG Pan^{1,2#}, SHI Wenjun^{2#}, WAN Xihe^{2①}, SHEN Hui², SHA Shibing², LI Hui²,
WANG Libao², SUN Ruijian², JIANG Ge², WU Xugan¹

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University),
Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu 226007, China)

Abstract Here we clarify the effects of gradually changing hypoxia and reoxygenation on respiratory metabolism and antioxidant capacity in *Exopalaemon carinicauda*. In the present study, we investigated oxygen consumption and reoxygenation in a respiratory chamber in which we first created a low-oxygen environment by preventing aeration and isolating the air, following which the chamber was aerated and reoxygenated. Continuously aerated groups were used as the control groups. Water and shrimp tissue samples were taken after 0, 1, 2, 4, 5 h of hypoxia and 1, 4, 8 h of reoxygenation from the beginning of the experiment. Further, we recorded the dissolved oxygen concentration of the water and the activities of the main respiratory metabolism enzyme and the antioxidant enzyme in shrimp tissues at different time points. The results indicated that over time, the dissolved oxygen concentration in the experimental group significantly decreased and was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The dissolved oxygen concentration in the control group remained stable. After reoxygenation, the dissolved oxygen concentration in the experimental group quickly returned to the control level. Over time, cytochrome c oxidase (CCO) and succinate dehydrogenase (SDH) activities in the gill, hepatopancreas, and muscle tissue from the experimental group continuously decreased, lactic dehydrogenase (LDH) and fumaric reductase (FRD) activities continuously increased. In addition, the value of SDH/FRD showed a gradually decreasing trend. During reoxygenation, SDH, LDH, and FRD activities gradually returned to the levels of the control group in three organizations; CCO activity in muscle continuously increased but was significantly lower than that in the control group at 8 h ($P < 0.05$). Furthermore, the value of SDH/FRD also showed a gradually increasing trend. Over time, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione s-transferase (GST) in the gill, hepatopancreas, and muscle tissue showed a trend of first increasing and then decreasing, but the activities of peroxidase (POD) continuously decreased in the hepatopancreas, while fluctuating in both, the gill and the muscle tissue. During reoxygenation, the activities of SOD and CAT in the gill, hepatopancreas, and muscle tissue all showed a trend of first increasing and then decreasing, but showed no significant difference with the control group at 8 h ($P > 0.05$). With the increase of recovery time, the activities of GPX and GST in the three tissues returned to the level of the control group, but the activities of POD in gill and muscle tissue were significantly lower than those in the control group under reoxygenation at 8 h. The results show that with the continuous decrease in dissolved oxygen concentration, the aerobic metabolic level of *E. carinicauda* gradually decreased, and the anaerobic metabolic capacity gradually increased, while during reoxygenation, the aerobic metabolic capacity gradually recovered. Antioxidant enzymes such as SOD, CAT, POD, GPX, and GST may play an important role in responding to oxidative damage during hypoxia and reoxygenation.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Hypoxia; Respiratory metabolism; Antioxidant capacity

① Corresponding author: WAN Xihe, E-mail: wxh1708@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200304001

http://www.yykxjz.cn/

王建学, 卫育良, 徐后国, 孙曙光, 梁萌青. 饲料蛋白能量比对红鳍东方鲀幼鱼的生长性能、饲料利用和体组成的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 116-125

WANG J X, WEI Y L, XU H G, SUN S G, LIANG M Q. Effects of dietary protein to energy ratios on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 116-125

饲料蛋白能量比对红鳍东方鲀幼鱼的生长性能、 饲料利用和体组成的影响*

王建学^{1,2} 卫育良¹ 徐后国¹ 孙曙光¹ 梁萌青^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为探求红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)幼鱼饲料的最适蛋白质能量比,以鱼粉和豆粕作为主要蛋白源,鱼油和豆油作为主要脂肪源,配制粗蛋白含量分别为 36%、42%和 48%,粗脂肪含量分别为 8%、12%和 16%,蛋能比为 17.06~24.20 mg/kJ 的 9 组饲料。投喂初始体重为 14.95 g 的红鳍东方鲀幼鱼 56 d。结果显示,由双因素分析方法得出,饲料的蛋白水平、脂肪水平和蛋能比水平均可显著影响红鳍东方鲀的终末体重、特定生长率(SGR)和饲料效率(FE),且饲料蛋白为 36%时,显著低于 42%和 48%组,但与饲料蛋白为 42%和 48%组之间相比无显著差异。在饲料脂肪为 8%时,显著低于 12%组,与饲料脂肪为 12%与 16%组之间相比无显著差异。此外,饲料的蛋白和脂肪水平对红鳍东方鲀生长和饲料利用的相关指标均无显著的交互作用($P>0.05$)。由单因素方差分析得出,终末体重、FE、SGR 均是 Diet8(48/12)蛋白水平为 48%、脂肪水平为 12%处理组最高,显著高于 Diet1(36/8)蛋白水平为 36%和脂肪水平为 8%处理组、Diet2(36/12)蛋白水平为 36%和脂肪水平为 12%处理组、Diet3(36/16)蛋白水平为 36%和脂肪水平为 16%处理组($P<0.05$)与 Diet4(42/8)蛋白水平为 48%和脂肪水平为 8%处理组、Diet5(42/12)蛋白水平为 42%和脂肪水平为 12%处理组、Diet6(42/16)蛋白水平为 42%和脂肪水平为 16%处理组、Diet7(48/8)蛋白水平为 48%、脂肪水平为 8%处理组之间相比无显著差异($P>0.05$)。因此,根据研究结果综合考虑生长性能及蛋白质节约效应,红鳍东方鲀幼鱼的最适蛋白水平为 42%,脂肪水平为 12%,蛋能比为 20.75 mg/kJ。

关键词 红鳍东方鲀; 蛋能比; 蛋白质; 能量

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)04-0116-10

蛋白质是最昂贵的营养成分,对鱼类的生长起着重要作用,饲料蛋白的利用效率与蛋白质水平及非蛋白能源的可利用率有关。饲料中多余的蛋白质被用作

能量浪费,并造成氮排泄(LeGrow *et al*, 1986)。饲料的能量物质适当提高后,可以减少由于缺乏能量而被作为能量消耗掉的饲料蛋白用量,从而起到节约蛋白的

* 财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系专项(CARS-47)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD48)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD48)]. 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: 2020-03-04, 收修改稿日期: 2020-03-23

作用(Morais *et al.*, 2001)。蛋白质、脂肪和碳水化合物是饲料中主要的能量物质, 由于鱼类对碳水化合物的利用能力有限, 饲料脂肪可以提供养殖鱼类能量的需要, 减少饲料蛋白质的浪费, 使之更好地在鱼体内合成体蛋白(Nankervis *et al.*, 2000)。但饲料中非蛋白能量过高也会造成鱼类降低摄食(Lovell, 1979)、抑制其他营养素的利用(Winfrey *et al.*, 1981), 还能造成鱼体脂肪积蓄过高, 风味变差, 品质降低(付世建等, 2001)。在配合饲料的研发过程中, 蛋白能量比(P/E)是一个重要的参数指标, 适宜的饲料蛋白能量比可以在促进鱼类生长、节约饲料蛋白、提高鱼类品质、降低养殖成本中起重要的作用(何吉祥等, 2009)。

目前, 包括花鲈(*Lateolabrax japonicus*) (Ai *et al.*, 2003)、云纹龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. moara* ♀) (公绪鹏等, 2018)、罗非鱼(*Oreochromis aurea*) (李金秋等, 2007)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*) (韩光明等, 2015)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (李敬伟等, 2005)等都已有关研究的报道。鱼类对饲料适宜蛋能比的需求受多种因素的影响, 如种类、食性、生长阶段、耗氧率、饲料加工、饲料成分、投喂量和养殖环境等(高柳玲等, 2018)。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)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, 其饲料最适蛋能比方面的研究未见报道。本研究探究了红鳍东方鲀的最适蛋能比, 为研制适合红鳍东方鲀的精准饲料配方提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、豆粕为主要蛋白源, 鱼油、豆油作为主要脂肪源, 小麦粉作为糖源, 设计两因素三水平(2×3)的交互实验。饲料蛋白水平分别为36%、42%和48%, 每1组蛋白水平设置3个脂肪水平分别为8%、12%和16%的9组饲料(表1)。

所有原料测定常规成分后, 粉碎机粉碎, 过80目筛网, 按配方称量原料, 逐级混匀, 然后加鱼油、大豆卵磷脂混匀, 加30%水搅拌均匀, 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。

1.2 实验鱼来源及驯化

养殖实验在山东省烟台海阳市黄海水产公司基地养殖桶(0.7 m×0.7 m×0.4 m)中进行, 实验所用鱼苗取自河北唐山海都水产食品有限公司。正式实验开始

前, 在暂养池(5 m×5 m×1.5 m)中使用商业配合饲料(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残食, 对每尾幼鱼剪牙, 再继续暂养14 d, 使其适应养殖环境。随机挑选规格一致、健康无病的鱼苗, 称重后分别放入27个桶中, 每个桶放入30尾鱼[平均体重为(14.95±0.37) g]。将9种饲料随机分派到27个桶中, 每种饲料3个重复。每天08:00和17:00手工缓慢投喂饲料至表现饱食, 实验周期为56 d。实验期间, 记录每天的摄食、死鱼数量。养殖车间采用自然光周期, 流水养殖, 水温为24℃~28℃, 盐度为30~31, pH为7.4~8.2, 溶解氧(DO)为5~7 mg/L。

1.3 实验取样

实验开始前, 随机取10尾鱼作为初始鱼, 用于常规营养成分分析。实验结束时, 饥饿24 h后对每桶鱼进行计数、称重; 每桶随机取6尾鱼、-20℃保存, 用于体成分分析。

1.4 生化分析

饲料原料、实验饲料及鱼体的粗蛋白、粗脂肪、灰分、水分的测定均采用AOAC(1995)的标准。其中, 水分含量使用105℃常温干燥法; 灰分含量使用马弗炉550℃高温灼烧法; 粗蛋白含量采用凯氏定氮仪测定(VELP, UDK142 automatic distillation unit, 意大利); 粗脂肪采用索氏抽提仪测定(Foss Tecator, Hogan, 瑞典); 饲料及鱼体的能量采用氧弹仪(Parr 6100, 美国)测定。

1.5 计算方法及统计分析方法

增重率(weight gain rate, WGR, %)=100×(终末体重-初始体重)/初始体重

摄食率(feeding intake, FI, %/d)=100×总干物质摄食量/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2]

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=100×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/实验天数

饲料效率(feed efficiency, FE)=鱼体增重(湿重)/总干物质摄食量

蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER)=(终末体重-初始体重)/蛋白摄入量

蛋白质沉积率(protein productive value, PPV, %)=100×鱼体蛋白质贮存量/蛋白摄入量

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)=肝脏重/体重×100

表 1 实验饲料配方及营养成分组成(%干物质)
Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (% dry matter)

原料 Ingredient	饲料编号(蛋白/脂肪) Diet No. (protein/lipid)								
	Diet1 (36/8)	Diet2 (36/12)	Diet3 (36/16)	Diet4 (42/8)	Diet5 (42/12)	Diet6 (42/16)	Diet7 (48/8)	Diet8 (48/12)	Diet9 (48/16)
白鱼粉 White fish meal	26.00	26.00	26.00	34.00	34.00	34.00	42.00	42.00	42.00
豆粕 Soybean meal	19.00	21.00	23.00	23.00	25.00	27.00	27.00	29.00	31.00
小麦粉 Wheat meal	44.00	38.00	32.00	32.50	26.50	20.50	20.70	14.70	8.70
卵磷脂 Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼油 Fish oil	4.00	8.00	12.00	3.50	7.50	11.50	3.30	7.30	11.30
诱食剂 Attractant	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
复合维生素 ¹ Vitamin premix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
复合矿物质 ² Mineral premix ²	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素 C Vitamin C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose sodium	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
化学成分 Chemical composition/%									
粗蛋白 Crude protein	36.89	37.89	36.74	42.86	43.08	43.01	48.37	48.81	48.94
粗脂肪 Crude lipid	7.05	11.21	15.60	7.30	11.58	15.82	7.27	11.30	16.02
总能 Gross energy/(kJ·g ⁻¹)	19.89	20.66	21.53	20.15	20.76	21.64	19.99	20.39	21.40
蛋白质/能量比 P/E/(mg·kJ ⁻¹)	18.55	18.34	17.06	21.27	20.75	19.88	24.20	23.94	22.87

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 0.08mg; 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

脏体比(viscerosomatic index, VSI, %)=内脏重/体重×100

肥满度(condition factor, CF)=体重/体长³×100

实验数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示, 采用 SPSS20.0 软件进行单因素方差(one-way ANOVA)和双因素方差(two-way ANOVA)分析, 当差异显著时(P<0.05), 进行 Tukey 多重比较。

2 结果

2.1 不同蛋白质能量比饲料对红鳍东方鲀幼鱼生长性能的影响

饲料中不同蛋白质能量比对红鳍东方鲀幼鱼生

长的影响见表 2。从表 2 可以看出, 蛋白质和脂肪对终末体重、存活率、FE 和 SGR 均无显著的交互作用(P>0.05)。由主效应分析可知, 饲料蛋白水平显著影响红鳍东方鲀的终末体重、SGR、FE、FI 和成活率(P<0.05), 随着饲料中粗蛋白从 36%升高到 48%, 终末体重、FE 和 SGR 呈先显著升高后趋于平缓的趋势(P<0.05); 存活率呈先显著下降后趋于平缓的趋势(P<0.05), FI 呈先显著降低后趋于平缓的趋势(P<0.05), 且拐点在饲料蛋白含量为 42%组。饲料脂肪水平显著影响终末体重、SGR、FE 和 FI (P<0.05), 随着饲料中粗脂肪由 8%升高到 16%, 终末体重、SGR 和 FE 呈先显著升高后趋于平缓的趋势(P<0.05), FI 呈显著降低后趋于平缓的趋势(P<0.05), 且拐点在饲

表 2 不同蛋白质能量比饲料对红鳍东方鲀幼鱼生长性能的影响
Tab.2 Effects of different protein and energy ratios on the growth performance of *T. rubripes*

饲料编号 Diet No. (protein/lipid)	终末体重 Final weight/g	存活率 Survival rate/%	饲料效率 Feed efficiency ratio	特定增长率 Specific growth rate/(%·d ⁻¹)	摄食率 Feeding Intake/(%·d ⁻¹)	蛋白质效率 Protein efficiency ratio	蛋白质沉积率 Protein productive value/%
Diet1(36/8)	56.29±1.38 ^a	86.67±1.92 ^{ab}	0.65±0.06 ^a	2.37±0.05 ^a	2.85±0.07 ^c	2.07±0.17 ^{ab}	32.38±2.71
Diet2(36/12)	61.08±2.64 ^{ab}	90.00±1.92 ^b	0.77±0.02 ^{ab}	2.50±0.07 ^{ab}	2.57±0.03 ^{bc}	2.21±0.06 ^{abc}	33.77±1.76
Diet3(36/16)	62.47±2.76 ^{abc}	85.56±2.22 ^{ab}	0.83±0.03 ^{bc}	2.54±0.07 ^{abc}	2.42±0.06 ^{ab}	2.46±0.08 ^c	37.25±1.36
Diet4(42/8)	68.19±2.51 ^{bcd}	77.78±2.22 ^a	0.85±0.04 ^{bcd}	2.71±0.06 ^{bcd}	2.45±0.09 ^{ab}	2.17±0.11 ^{abc}	32.87±2.10
Diet5(42/12)	70.67±2.14 ^{cd}	80.00±3.85 ^{ab}	0.92±0.02 ^{bcd}	2.77±0.05 ^{cd}	2.34±0.04 ^{ab}	2.30±0.06 ^{bc}	37.07±0.58
Diet6(42/16)	69.97±0.98 ^{bcd}	85.56±1.11 ^{ab}	0.96±0.01 ^{cd}	2.75±0.02 ^{cd}	2.27±0.03 ^{ab}	2.37±0.02 ^{bc}	35.65±0.97
Diet7(48/8)	66.49±1.10 ^{bcd}	78.89±1.11 ^a	0.84±0.04 ^{bcd}	2.66±0.02 ^{bcd}	2.47±0.13 ^{ab}	1.85±0.09 ^a	29.97±1.55
Diet8(48/12)	72.92±1.35 ^d	82.22±2.22 ^{ab}	1.01±0.03 ^d	2.83±0.03 ^d	2.21±0.07 ^a	2.18±0.07 ^{abc}	33.31±1.12
Diet9(48/16)	67.86±1.38 ^{bcd}	83.78±1.56 ^{ab}	0.99±0.03 ^{cd}	2.69±0.03 ^{bcd}	2.18±0.06 ^a	2.13±0.07 ^{abc}	33.98±2.52
主效应 Main effects							
粗蛋白 Crude protein/%							
36	59.95 ^A	87.41 ^B	0.75 ^A	2.47 ^A	2.61 ^B	2.27 ^B	34.73
42	69.09 ^B	81.11 ^A	0.91 ^B	2.74 ^B	2.35 ^A	2.28 ^B	35.19
48	69.61 ^B	81.63 ^A	0.95 ^B	2.73 ^B	2.29 ^A	2.06 ^A	32.42
粗脂肪 Crude lipid/%							
8	63.65 ^A	84.11	0.78 ^A	2.58 ^A	2.59 ^B	2.03 ^A	31.66 ^A
12	68.22 ^B	84.07	0.90 ^B	2.70 ^B	2.37 ^A	2.23 ^B	34.72 ^B
16	66.77 ^{AB}	84.96	0.93 ^B	2.66 ^{AB}	2.29 ^A	2.32 ^B	35.62 ^B
方差分析 ANOVA (P-value)							
粗蛋白 Crude protein/%	0	0	0	0	0	0	0.11
粗脂肪 Crude lipid/%	0.03	0.12	0	0.03	0	0	0.02
交互作用 Interaction	0.44	0.20	0.51	0.32	0.49	0.30	0.59
蛋白质能量比 P/E	0.03	0.01	0	0	0	0	0.12

注: 同列数值后不同上标小写、大写英文字母表示差异显著($P<0.05$), 同列未标注字母表示无显著差异($P>0.05$), 下同

Note: Values with different superscripts lowercase letters, capital letters in the same column are significantly different ($P<0.05$), values with no letter or the same letter superscripts are not significantly different ($P>0.05$), the same as below

料脂肪含量为 12%组。由单因素方差分析可以看出, 终末体重、FE 和 SGR 均是 Diet8(48/12)组最高, 显著高于 Diet1(36/8)、Diet2(36/12)和 Diet3(36/16)组($P<0.05$), 与 Diet4(42/8)、Diet5(42/12)、Diet6(42/16)和 Diet7(48/8)各组之间相比无显著差异($P>0.05$)。

不同蛋白质能量比饲料对红鳍东方鲀幼鱼蛋白质利用的影响见表 2。从表 2 可以看出, 饲料蛋白质和脂肪对 PER、PPV 均无显著交互作用($P>0.05$)。由主效应分析可知, 随着饲料蛋白水平的提高, PER、PPV 均呈下降趋势, 饲料蛋白水平从 36%提高至 48%时, 红鳍东方鲀的 PER 显著降低($P<0.05$), 且拐点在蛋白水平为 42%组, 但对 PPV 无显著影响($P>0.05$); 随着饲料脂肪水平提高, PPV 和 PER 呈先显著升高后趋于

平缓的趋势($P<0.05$), 且拐点在脂肪含量为 12%组。单因素方差分析表明, 蛋白效率在 Diet3(36/16)达到最高, 显著高于 Diet1(36/8)及 Diet7(48/8)组($P<0.05$), 与 Diet6(42/16)、Diet2(36/12)、Diet4(42/8)、Diet5(42/12)组相比无显著差异($P>0.05$)。

饲料蛋白水平和脂肪水平对红鳍东方鲀终末体重、SGR、FE、FI、PER、PPV 及存活率无交互作用($P>0.05$)。

2.2 不同蛋白能量比饲料对红鳍东方鲀幼鱼形体指标及鱼体化学成分的影响

饲料不同蛋白能量比对红鳍东方鲀幼鱼形体指标的影响见表 3。从表 3 可以看出, 饲料蛋白水平提

高,对红鳍东方鲀 HSI、VSI 和 CF 无显著影响 ($P>0.05$)。随着饲料粗脂肪水平的提高, VSI 呈先显著升高后趋于平缓趋势 ($P<0.05$); HSI 呈先升高后趋于平缓的趋势,且 8%粗脂肪组显著低于 16%粗脂肪

组 ($P<0.05$),与 12%粗脂肪组相比无显著差异 ($P>0.05$); CF 各处理组间无显著差异 ($P>0.05$)。饲料蛋白和脂肪对红鳍东方鲀的形体指标没有交互作用 ($P>0.05$)。

表3 不同蛋白质和能量含量饲料对红鳍东方鲀幼鱼形体指标的影响
Tab.3 Effects of different protein and energy levels on the body index of *T. rubripes*

饲料编号 Diet No. (protein/lipid)	肝体比 Hepatosomatic index/%	脏体比 Viscerosomatic index /%	肥满度 Condition factor
Diet1(36/8)	7.97±0.76	12.38±0.65	2.18±0.12
Diet2(36/12)	9.44±0.80	14.41±0.89	2.77±0.27
Diet3(36/16)	10.05±0.03	14.68±0.57	2.41±0.33
Diet4(42/8)	7.79±0.33	12.33±0.47	2.42±0.33
Diet5(42/12)	9.47±0.64	13.82±0.64	2.87±0.40
Diet6(42/16)	9.47±0.72	13.80±0.67	2.57±0.06
Diet7(48/8)	9.00±0.77	13.15±1.13	2.60±0.28
Diet8(48/12)	8.77±0.77	14.22±0.60	2.72±0.23
Diet9(48/16)	9.46±0.58	14.63±0.63	2.72±0.02
主效应 Main effects			
粗蛋白 Crude protein/%			
36	9.15	13.82	2.45
42	8.91	13.32	2.62
48	9.08	14.00	2.68
粗脂肪 Crude lipid/%			
8	8.25 ^A	12.62 ^A	2.40
12	9.23 ^{AB}	14.15 ^B	2.78
16	9.66 ^B	14.37 ^B	2.56
方差分析 ANOVA (<i>P</i> -value)			
粗蛋白 Crude protein/%	0.89	0.44	0.50
粗脂肪 Crude lipid/%	0.04	0.01	0.17
交互作用 Interaction	0.57	0.95	0.91
蛋白质能量比 P/E	0.30	0.20	0.70

从表4可以看出,随着饲料粗蛋白水平的提高,红鳍东方鲀鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分及能量各组间相比无显著差异 ($P>0.05$)。随着饲料粗脂肪水平的提高,鱼体粗脂肪水平也显著提高 ($P<0.05$),粗脂肪为 8%组显著低于 16%粗脂肪组 ($P<0.05$),与粗脂肪为 12%组相比无显著差异 ($P>0.05$);随着饲料粗脂肪水平的提高,对鱼体水分、粗蛋白、灰分及能量各组间相比无显著影响 ($P>0.05$)。不同蛋能比饲料中蛋白和脂肪对红鳍东方鲀幼鱼全鱼的水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分及能量的影响无显著交互作用 ($P>0.05$)。

3 讨论

Kim 等(2009)研究表明,红鳍东方鲀幼鱼(17.05 g)

的粗蛋白最适需求量为 41%;孙阳等(2013a、b)研究表明,红鳍东方鲀幼鱼(7.71 g)的粗脂肪最适需求量为 8.93%;Takii 等(1995)研究表明,红鳍东方鲀幼鱼(3.70 g)的粗脂肪最适需求量为 11.50%。本研究在此基础上设计 3 个蛋白水平分别为 36%、42%和 48%,3 个脂肪水平分别 8%、12%和 16%,配制 9 种不同蛋能比的饲料,探究红鳍东方鲀幼鱼的最适蛋能比。

根据 NRC(1993)的报道,对于大部分鱼类而言,其适宜蛋能比通常在 19~27 mg/kJ 之间。而本研究发现,饲料蛋白水平为 36%~42%时,相同蛋白水平中蛋能比越低,红鳍东方鲀的生长表现越好;但饲料蛋白水平为 48%时,相同蛋白水平中,红鳍东方鲀的生长随饲料蛋白能量比的降低呈先升高后下降的趋势;

表4 饲料不同蛋能比饲料对红鳍东方鲀幼鱼鱼体化学成分的影响(%湿重)

Tab.4 Effects of different protein and energy ratios on whole-body chemical composition of *T. rubripes* (% wet weight)

饲料编号 Diet No. (protein/lipid)	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	灰分 Ash	能量 Gross energy/(kJ·g ⁻¹)
Diet1(36/8)	75.37±0.31	16.26±0.40	4.96±0.12	2.85±0.06	23.62±0.16
Diet2(36/12)	74.49±0.37	16.15±0.26	5.81±0.11	2.70±0.04	23.11±0.52
Diet3(36/16)	78.45±0.38	16.04±0.48	6.66±0.23	2.63±0.03	23.65±0.36
Diet4(42/8)	75.53±0.44	15.95±0.11	5.21±0.33	2.71±0.09	23.29±0.29
Diet5(42/12)	73.45±0.19	16.73±0.23	5.91±0.24	2.78±0.06	23.47±0.41
Diet6(42/16)	74.08±0.83	15.89±0.23	5.95±0.27	2.61±0.03	23.99±0.45
Diet7(48/8)	73.50±1.46	16.87±0.65	5.63±0.45	2.90±0.17	24.27±0.37
Diet8(48/12)	74.73±0.52	16.01±0.22	6.15±0.81	2.57±0.03	23.56±0.29
Diet9(48/16)	72.75±1.23	16.56±0.54	6.65±0.25	2.57±0.07	22.65±0.71
主效应 Main effects					
粗蛋白 Crude protein/%					
36	74.72	16.15	5.81	2.72	23.46
42	74.36	16.19	5.69	2.70	23.58
48	73.66	16.48	6.14	2.64	23.49
粗脂肪 Crude lipid/%					
8	74.80	16.36	5.27 ^A	2.76	23.73
12	74.22	16.30	5.96 ^{AB}	2.68	23.38
16	73.71	16.16	6.42 ^B	2.63	23.43
方差分析 ANOVA (<i>P</i> -value)					
粗蛋白 Crude protein/%	0.27	0.55	0.29	0.30	0.95
粗脂肪 Crude lipid/%	0.26	0.83	0.00	0.05	0.62
交互作用 Interaction	0.29	0.30	0.73	0.12	0.11
蛋白质能量比 P/E	0.25	0.56	0.06	0.09	0.33

而脂肪水平同为 12% 时, 饲料蛋白水平越高, 鱼体生长情况越好。脂肪水平同为 8% 和 16% 时, 饲料蛋白水平越高, 鱼体生长呈先升高后下降的趋势, 这表明本研究设计的蛋白和脂肪水平能满足红鳍东方鲀适宜蛋能比的要求。再进一步分析, 本研究中红鳍东方鲀的 SGR 和 FE 相对 Diet1(36/8) 显著升高的饲料组发现, 包括 Diet4(42/8)、Diet5(42/12)、Diet6(42/16)、Diet7(P48/8)、Diet8(P48/12) 和 Diet9(P48/16) 共 6 个处理组, 其所对应的蛋能比分别为 21.27、20.75、19.88、24.20、23.94 和 22.87 mg/kJ, 这与 NRC(1993) 的研究结果相一致, 因此, 本研究结果表明, 红鳍东方鲀对适宜蛋能比应在 19.88~24.20 mg/kJ 范围内。

McGoogan 等(1999)研究表明, 高水平 and 高质量饲料蛋白源, 尤其对肉食性鱼类来说, 通常能促使鱼体快速生长。本研究所使用的蛋白源为鱼粉和豆粕, 生长最高的 4 个饲料处理组(Diet4(42/8)、Diet5(42/12)、Diet6(42/16)、Diet8(P48/12) 中红鳍东方鲀的 SGR 均达到 2.71%/d 以上, 表明本研究选用的鱼粉和豆粕都是红鳍东方鲀的优质蛋白源, 适用于

研究其适宜的蛋能比。本研究结果显示, 红鳍东方鲀生长性能与饲料中蛋白水平关系密切, 在相同脂肪水平下, 红鳍东方鲀鱼终末体重、SGR 都随饲料蛋白水平的增加, 呈先升高后趋于平缓的趋势, 且在饲料蛋白含量为 42% 时出现拐点, 这与 Deng 等(2011)、丁立云等(2010)、向泉等(2012)和张静等(2016)的研究结果相似, 表明 42% 的粗蛋白可以满足红鳍东方鲀幼鱼的生长需求。然而, 当饲料中蛋白质含量增加至 48% 时, 鱼体 SGR 虽然在 Diet8(48/12) 达到最高, 但与粗蛋白含量为 42% 组的 3 个不同脂肪处理组相比并未显著升高, 同时, 当饲料中粗蛋白水平升高到 48% 时, 红鳍东方鲀的 PER 和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*) 等鱼类一样显著降低(杨弘等, 2012; Ai *et al.*, 2003), 表明饲料中 48% 组过多的蛋白质可能并没有被用于合成新的蛋白质在鱼体内沉积, 起到加快鱼体生长的作用, 这在对双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*) 等其他鱼类的蛋能比研究中也发现类似结果(李文嘉, 2016; Barbara *et al.*, 2008), 进一步表明, 饲料中 42%

的蛋白可以满足红鳍东方鲀对蛋白质的需要量。

对于鱼类来说,蛋白、脂肪和碳水化合物都可以被其用于能量供应(Brauge *et al*, 1994),特别是肉食性鱼类,其对糖类的利用率较低,脂肪是其主要的能量来源,如果饲料中脂肪(能量)含量较低,将会导致饲料中部分蛋白质被分解用于供能,导致 PER 较低,鱼体生长缓慢(Kim *et al*, 2005),因此,研究饲料中适宜的脂肪水平,对于鱼类的生长具有重要意义(Thoman *et al*, 1999; Salhi *et al*, 2004; Sayed Hassani *et al*, 2011)。本研究结果也显示,在相同蛋白水平下,红鳍东方鲀生长性能随着饲料脂肪水平(8%~12%)的升高而上升,FI 则显著降低,继续提高脂肪水平(12%~16%),红鳍东方鲀生长指标趋于平缓,这表明增加饲料脂肪水平从 8%增加到 12%,有利于提高鱼体对脂肪的利用,但过高脂肪(16%)并不能进一步提高红鳍东方鲀的生长。这一结果在对鱼体脂肪和形体指标的分析中得到进一步验证。对于鱼体脂肪,研究表明,饲料脂肪水平是影响鱼体脂含量的首要因素,饲料中过多的脂肪含量能够导致鱼体脂肪的大量沉积(Page *et al*, 1973)。本研究根据双因素的主效应分析发现,鱼体脂肪随着饲料脂肪从 8%增加到 16%,也呈现与生长性能相似的先显著升高后趋于平缓的趋势;对于形体指标,由于肝脏为脂肪和糖原沉积的主要场所,HSI、VSI 一般作为肝脏或者内脏中脂肪或者糖原蓄积的表观指标(孙瑞建等, 2013)。在本研究中,根据双因素的主效应分析发现,脂肪水平提高时,HSI 和 VSI 均呈先升高后趋于平缓的趋势,且这一变化趋势与饲料脂肪含量呈正向相关关系,这与 Catacutan 等(1997)研究结果相似,说明饲料脂肪含量为 16%时,虽然对生长有一定的抑制作用,但仍在其自身调节可控范围内,因此,红鳍东方鲀在本研究中会随饲料脂肪的升高呈先升高后趋于平缓的趋势(杜振宇等, 2002)。

本研究中,最高的 SGR 出现在 Diet8(48/12) (48%蛋白, 12%脂肪)饲料组。然而,观察发现, Diet5(42/12)、Diet6(42/16)、Diet4(42/8)、Diet9(48/16)和 Diet7(48/8)组在 SGR 和 FE 中都无显著差异。一方面,考虑到蛋白源价格较高,会影响商业配合饲料成本,在相似体增重的情况下,优先选择 42%蛋白含量;另一方面,鱼类饲料中添加非蛋白质能源物质可部分替代蛋白质,不但能提高鱼类对饲料蛋白质的利用效率(Chou *et al*, 2001; Li *et al*, 2010; Lee *et al*, 2002; Shiau *et al*, 2001),而且,能达到节约蛋白质的效果(李文嘉, 2016; Salhi *et al*, 2004; Thoman *et al*, 1999)。这一结论也在本研究中得到验证。当粗脂肪由 8%提高至 12%和

16%时, PPV、PER 显著提高,表明适度提高脂肪含量,可使鱼体通过将更多的脂肪用于供能,提高 PER,适度节约蛋白质,从而起到脂肪节约蛋白质的效应(Ai *et al*, 2003; 陈壮, 2013; 李敬伟等, 2005; 刘兴旺, 2010)。但是,水产饲料中过多的脂肪含量会造成鱼类摄食率的下降(Lovell, 1979; Silva *et al*, 1991)。本研究也发现,随着饲料脂肪水平升高到 16%,显著降低了红鳍东方鲀的 FI,增加 HSI 及 VSI,这可能是当饲料脂肪较低时,红鳍东方鲀可以通过提高 FI 来弥补饲料能量的不足,而过高时则会产生相反的效果。因此,基于以上的分析综合考虑认为,红鳍东方鲀饲料中最适蛋白含量为 42%,脂肪含量为 12%,对应最适蛋能比为 20.75 mg/kJ。

4 结论

红鳍东方鲀幼鱼的最适蛋白能量比在 19.88~24.20 mg/kJ 范围内,考虑到红鳍东方鲀的生长效果及蛋白质节约效应,红鳍东方鲀幼鱼的最适蛋白能量比为 20.75 mg/kJ,蛋白水平为 42%,脂肪水平为 12%。

参 考 文 献

- AI Q H, MAI K S, LI H T, *et al*. Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 2004, 230(1/2/3/4): 507-516
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14th edn. Williams S (Eds), Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1984, 1141
- BARBARA G H, SHEARER K D, GATLIN D M, *et al*. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, protein digestibility, feed utilization and body composition of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 2008, 283: 156-162
- BRAUGC C, MEDALE F, CORRAZE G. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture*, 1994, 123(1/2): 109-120
- CATACUTAN M R, COLOSO R M. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. *Aquaculture*, 1997, 149(1/2): 137-144
- CHEN Z. The study on the optimum requirement of dietary protein and protein to energy ratio of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) in two different growth stages. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [陈壮. 鲈鱼中、后期饲料蛋白质需求量及最适蛋能比的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- CHOU R L, SU M S, CHEN H Y. Optimal dietary protein

- and lipid levels for juvenile coibia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 2001, 193(1/2): 81–89
- DENG D F, JU Z Y, DOMINY W, *et al.* Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture*, 2011, 316(1): 25–30
- DING L Y, ZHANG L M, WANG J Y, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, body composition and plasma biochemistry indices of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1285–1292 [丁立云, 张利民, 王际英, 等. 饲料蛋白水平对星斑川鲷幼鱼生长、体组成及血浆生化指标的影响. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1285–1292]
- DU Z Y, LIU Y J, ZHENG W H, *et al.* The effects of three oil sources and two anti-fat liver factors on the growth, nutrient composition and serum biochemistry indexes of *Lateolabrax japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(6): 542–550 [杜震宇, 刘永坚, 郑文晖, 等. 三种脂肪源和两种降脂因子对鲈生长、体营养成分组成和血清生化指标的影响. *水产学报*, 2002, 26(6): 542–550]
- FU S J, XIE X J, ZHANG W B, *et al.* The study on nutrition of *Silurus meridionalis*: III. The sparing effect of dietary lipid. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(1): 70–75 [付世建, 谢小军, 张文兵, 等. 南方鲇的营养学研究: III. 饲料脂肪对蛋白质的节约效应. *水生生物学报*, 2001, 25(1): 70–75]
- GAO L L, PAN Q. Research advances on the optimal dietary protein-energy ratio of fish. *Feed Review*, 2018(10): 16–21 [高柳玲, 潘庆. 鱼类饲料适宜蛋白能量比研究进展. *饲料博览*, 2018(10): 16–21]
- GONG X P, LI B S, ZHANG L M, *et al.* Effects of dietary protein and energy levels on growth, body composition and digestive enzymes activities of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. moara* ♀. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 85–95 [公绪鹏, 李宝山, 张立民, 等. 饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 85–95]
- HAN G M, ZHANG J H, KOU X M, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance and body composition of Chinese Sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(11): 3587–3596 [韩光明, 张家宏, 寇祥明, 等. 饲料中蛋白质和脂肪水平对胭脂鱼生长性能及体组成的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(11): 3587–3596]
- HE J X, DING F Q, SONG G T, *et al.* Effects of dietary protein levels and energy to protein ratios on growth and protease activity in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fisheries Science*, 2009, 28(12): 741–744 [何吉祥, 丁凤琴, 宋光同. 蛋白质水平及能量蛋白比对克氏螯虾生长与蛋白酶活力的影响. *水产科学*, 2009, 28(12): 741–744]
- KIM S S, LEE K J. Dietary protein requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Aquaculture*, 2009, 287(1/2): 219–222
- KIM L O, LEE S M. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 2005, 243: 323–329
- LEE S M, JEON I G, LEE J Y. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 2002, 211(1/2/3/4): 227–239
- LEGROW S M, BEAMISH F W H. Influence of dietary protein and lipid on apparent heat increment of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1986, 43(1): 19–25
- LI J Q, LIN J B, JIANG L L, *et al.* Effects of dietary energy-protein ratio and vitamin content on the growth of tilapia (*Oreochromis aurea*). *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 22(4): 382–387 [李金秋, 林建斌, 姜琳琳, 等. 饲料中不同能量蛋白比和维生素添加量对罗非鱼生长的影响. *福建农业学报*, 2007, 22(4): 382–387]
- LI J W, LI W K, LUO X N, *et al.* Requirement of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco* for dietary protein and energy. *Fisheries Science*, 2005, 24(9): 17–19 [李敬伟, 李文宽, 骆小年, 等. 黄颡鱼幼鱼对饲料中蛋白质和能量需要量的研究. *水产科学*, 2005, 24(9): 17–19]
- LI X F, LIU W B, JIANG Y Y, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels in practical diets on growth performance and body composition of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. *Aquaculture*, 2010, 303(1/2/3/4): 65–70
- LI W J. Study on dietary protein requirement, protein to energy ratio and replacement of plant protein sources in juvenile *Nibea diacanthus*. Doctoral Dissertation of Shantou University, 2016, 60–78 [李文嘉. 双棘黄姑鱼幼鱼蛋白质需求、蛋能比及植物蛋白源替代研究. 汕头大学博士研究生学位论文, 2016, 60–78]
- LIU X W. The study on protein nutrition physiology of turbot *Scophthalmus maximus* Linnaeus and half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [刘兴旺. 大菱鲆及半滑舌鳎蛋白质营养生理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- LOVELL R T. Factors affecting voluntary food consumption by channel catfish. *Proceedings of the Annual Conference Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies*, 1979, 33: 563–571
- MCGOOGAN B B, GATLIN III D M. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus* I. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture*, 1999, 178(3/4): 333–348
- MORAIS S, BELL J G, ROBERTSON D A, *et al.* Protein/lipid ratios in extruded diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Effects on growth, feed utilization, muscle composition and liver histology. *Aquaculture*, 2001, 203(1/2): 101–119
- NANKERVIS L, MATTHEWS S J, APPLEFORD P. Effect of

- dietary non-protein energy source on growth, nutrient retention and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 2000, 191(4): 323–335
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of fish. Washington: National Academy Press, 1993
- PAGE J W, ANDREES J W. Interaction of dietary levels of protein and energy on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, 1973, 103(9): 1339–1346
- SALHI M, BESSONART M, CHEDIAK G, *et al.* Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture*, 2004, 231(1): 435–444
- SAYED HASSANI M H, MOHSENI M, HOSSENI M R, *et al.* The effect of various levels of dietary protein and lipid on growth and body composition of *Acipenser persicus* fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(2): 737–742
- SHIAU S Y, LIN Y H. Carbohydrate utilization and its protein-sparing effect in diets for grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Animal Science*, 2001, 73(2): 299–304
- SILVA S S D, GUNASEKERA R M, SHIM K F. Interactions of varying dietary protein and lipid levels in young red tilapia: Evidence of protein sparing. *Aquaculture*, 1991, 95(3/4): 305–318
- SUN R J, ZHANG W B, XU W, *et al.* Effects of dietary protein level and feeding frequency on the growth, body composition and protein metabolism of juvenile large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* 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]
- SUN Y, JIANG Z Q, LI Y Q, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth, body composition and blood parameters of juvenile *Takifugu rubripes*. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2013a, 20(3): 14–18 [孙阳, 姜志强, 李艳秋, 等. 饲料脂肪水平对红鳍东方鲀幼鱼生长、体组成及血液指标的影响. *天津农学院学报*, 2013a, 20(3): 14–18]
- SUN Y, JIANG Z Q, LI Y Q, *et al.* Effects of dietary lipid on the liver antioxidant capacity and histology of *Takifugu rubripes* juvenile. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013b, 33(3): 27–32 [孙阳, 姜志强, 李艳秋, 等. 饲料脂肪水平对红鳍东方鲀幼鱼肝脏抗氧化酶活力及组织结构的影响. *广东海洋大学学报*, 2013b, 33(3): 27–32]
- TAKII K, UKAWA M, NAKAMURA M, *et al.* Suitable lipid level in brown fish meal diet for tiger puffer. *Fisheries Science*, 1995, 61(5): 841–844
- THOMAN E S, DAVIS D A, AMOLD C R. Evaluation of growout diets with varying protein and energy levels for reddrum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 1999, 176(3): 343–353
- TU Y Q, HAN D, ZHU X M, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of *Cyprinus longipectoralis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(1): 843–850 [涂永芹, 韩冬, 朱晓鸣, 等. 饲料中不同蛋白、脂肪水平对春鲤生长、饲料利用和体成分的影响. *水生生物学报*, 2012, 36(1): 843–850]
- WINFREE R A, STICKNEY R R. Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. *Journal of Nutrition*, 1981, 111(6): 1001–1012
- XIANG X, ZHOU X H, CHEN J, *et al.* Effects of dietary protein and animal protein levels on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile prenanant's schizothoracin (*Schizothorax prenanti*). *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(5): 74–80 [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料蛋白水平及鱼粉蛋白含量对齐口裂腹鱼生长、体组成及消化酶活性的影响. *中国粮油学报*, 2012, 27(5): 74–80]
- YANG H, XU Q C, YUE Y R, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, body composition, hematological indexes and hepatic non-specific immune indexes of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(12): 2384–2392 [杨弘, 徐起群, 乐贻荣, 等. 饲料蛋白质水平对尼罗罗非鱼幼鱼生长性能、体组成、血液学指标和肝脏非特异性免疫指标的影响. *动物营养学报*, 2012, 24(12): 2384–2392]
- ZHANG J, GAO T T, LI Y, *et al.* Effects of the protein level on the growth, ammonia-nitrogen excretion, and amino acid accumulation in the muscle of industrially-cultured juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 34–41 [张静, 高婷婷, 李勇, 等. 蛋白营养对工业养殖大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 34–41]

(编辑 陈 严)

Effects of Dietary Protein to Energy Ratios on Growth Performance, Feed Utilization and Body Composition of Juvenile Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*)

WANG Jianxue^{1,2}, WEI Yuliang¹, XU Houguo¹, SUN Shuguang¹, LIANG Mengqing¹①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract A growth experiment was conducted to determine the optimal dietary protein to energy (P/E) ratio for juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*) (initial average weight 14.95 g). Nine practical diets were formulated to contain three protein levels (36%, 42% and 48%), and three lipid levels (8%, 12% and 16%) in order to produce a range of P/E ratios (from 17.06 to 24.20 mg/kJ). Fish meal and soybean meal were used as main protein sources, and fish oil were used as the main oil source. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 30 fish with (14.95±0.37) g, stocked in polyethylene tanks (0.7 m×0.7 m×0.4 m) supplied with a flow through seawater. Fish were fed by hand to apparent satiation twice daily (08:00 and 17:00). During the feeding trial, water temperature ranged from 24°C to 28°C, salinity from 30 to 31, pH from 7.4 to 8.2, and dissolved oxygen from 5 to 7 mg/L. Juvenile tiger puffer was fed the experimental diets for 56 days. Based on two-way analysis of variance, the protein level, lipid level and protein to energy ratio of feed significantly affected the final weight, feed efficiency ratio (FER) and specific growth rate (SGR) ($P<0.05$). Those three growth parameters in the 42% and 48% protein groups was significantly higher than that in the 36% protein group ($P<0.05$), but there was no significant difference in the 42% and 48% protein groups ($P>0.05$). Those three growth parameters in the 8% lipid group was significantly lower than that of the 12% lipid group ($P<0.05$), while no significant difference was observed between the 12% and 16% lipid groups ($P>0.05$). In addition, there was no significant interaction between feed protein and fat levels on growth-related indexes. One-way analysis of variance showed that the final weight, FER, and SGR were the highest in the Diet8 (48/12) treatment, which were significantly higher than those in the Diet1 (36/8), Diet2 (36/12), and Diet3 (36/16) treatments ($P<0.05$), and was no significant difference compared with the Diet4 (42/8), Diet5 (42/12), Diet6 (42/16), and Diet7 (48/8) treatments ($P>0.05$). Considering growth performance and protein saving effect, these results suggest that the diet containing 42% protein and 12% lipid with P/E of 20.75 mg/kJ is optimal for juvenile tiger puffer.

Key words *Takifugu rubripes*; Protein to energy ratios; Protein; Energy

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200225001

http://www.yykxjz.cn/

孙敬诚, 李潇, 鲁康乐, 王玲, 宋凯, 张春晓. 饲料维生素 C 对急性降温后花鲈免疫、抗氧化及抗应激的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 126–133

SUN J C, LI X, LU K L, WANG L, SONG K, ZHANG C X. Effects of dietary vitamin C on the immune, antioxidant capacity and stress tolerance of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) after acute cooling. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 126–133

饲料维生素 C 对急性降温后花鲈免疫、 抗氧化及抗应激的影响*



孙敬诚 李 潇 鲁康乐 王 玲 宋 凯 张春晓^①

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

摘要 为研究饲料维生素 C(Vc)对急性降温后花鲈(*Lateolabrax maculatus*)免疫、抗氧化及抗应激的影响,以含有不同水平 Vc(6.85、46.90、88.24、167.43、329.21 和 658.69 mg/kg)的饲料饲养花鲈 56 d 后,进行急性降温(从 33℃ 水体转入 27℃ 水体)处理 24 h 和 48 h。结果显示,降温 24 h 和 48 h 时,各组血清补体 3(C3)水平高于 0 h,而补体 4(C4)水平低于 0 h。饲料 Vc 在 6.85~167.43 mg/kg 时,血清免疫球蛋白 M(IgM)水平随降温时间的增加,在 24 h 和 48 h 显著高于 0 h ($P<0.05$);当饲料 Vc 含量高于 167.43 mg/kg 时,各时间点 IgM 差异不显著。血清溶菌酶(LZM)活性在降温 48 h 后显著低于降温前($P<0.05$),而各 Vc 添加组显著高于对照组($P<0.05$)。肝脏丙二醛(MDA)含量在降温后显著高于降温前,但在降温后随着饲料 Vc 水平的升高而显著降低($P<0.05$)。肝脏总超氧化物歧化酶(T-SOD)含量随降温时间的增加,先增加后降低。在各时间点,花鲈肝脏谷胱甘肽(GSH)含量都随着饲料 Vc 水平的升高而升高。当饲料 Vc 为 6.85 mg/kg 时,肝脏血红素氧合酶(HO-1)活性在降温后显著高于降温前($P<0.05$);当饲料 Vc 为 88.24~167.43 mg/kg 时,肝脏 HO-1 活性在降温后显著低于降温前($P<0.05$)。花鲈血清热休克蛋白(HSP70)水平在降温后显著高于降温前($P<0.05$),而当降温时间达到 48 h 时,各 Vc 添加组 HSP70 含量显著低于对照组。研究表明,饲料中适量的 Vc (46.90~167.43 mg/kg)能提高花鲈肝脏的抗氧化能力,减轻脂质过氧化水平,缓解花鲈急性降温引起的应激反应。

关键词 花鲈; 维生素 C; 急性降温; 抗应激

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0126-08

鱼类属变温动物,水体温度的变化会影响鱼类的各种生命活动。鱼体对温度的变化有一定的适应能力,但也有耐受限度,尤其是水温剧变时,鱼体内稳态会被破坏(常玉梅等, 2006), 消化酶活性降低(Wang *et al*, 2006), 导致摄食率降低, 进而影响鱼体的生长

(陈松波, 2004; 黄国强等, 2010; Munillá-Moran *et al*, 1996; 罗奇等, 2010)以及免疫力(强俊等, 2012), 也会造成血清生理的变化(Wakeling *et al*, 2000)。

维生素 C(Vc)是水溶性维生素,又称为抗坏血酸,是鱼类必需的营养素。Vc 作为鱼类合成羟化酶和氧

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47)]. 孙敬诚, E-mail: 1397858950@qq.com

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

收稿日期: 2020-02-25, 收修改稿日期: 2020-04-26

合酶的基质, 参与鱼体胶原蛋白(Wilson *et al*, 1973)、肉碱、类固醇的合成(Tolbert, 1979), 最终促进皮肤、软骨和硬骨的生成(Darias *et al*, 2011), 在鱼类生长(Ai *et al*, 2004)、抗氧化(Padayatty *et al*, 2001)、机体免疫(廖畅宇等, 2012)和抗应激(Wan *et al*, 2014)等方面具有重要作用。Vc 能降低机体皮质醇的产生, 减缓动物体受到的外界应激(万金娟等, 2012)。在养殖过程中, 在饲料中添加 Vc, 可以提高鱼类的抗应激能力, 增强鱼类对高密度、低氧胁迫的耐受性, 并且显著提高养殖成活率(杨敬华等, 2004; 乔丽杰等, 2013)。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*), 别名海鲈、七星鲈, 我国北起渤海、南至东海以及各大河口遍布花鲈踪迹。花鲈因其适应性广、抗病性强、肉鲜味美、营养丰富、生长快速等优质特性(胡鹏莉等, 2019), 已成为养殖范围最广的海水鱼。在养殖生产中, 常出现持续高温和温度突变等不可控环境变化, 导致养殖花鲈生长减缓、摄食降低, 甚至引发疾病, 给养殖生产造成损失。管标等(2014)研究表明, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等冷水性鱼类对高温胁迫尤为敏感, 高低温急性变化会引起代谢速率的改变, 影响其健康养殖。鉴于此, 本研究旨在探讨饲料 Vc 对急性降温后花鲈免疫、抗氧化及抗应激的影响, 以期 Vc 在抗应激营

养调控中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、鸡肉粉、豆粕等作为主要蛋白源, 鱼油、豆油等为主要脂肪源, 配制粗蛋白水平为 43%、粗脂肪水平为 12% 的实验用饲料, 并以 L-抗坏血酸多聚磷酸酯(2APP)为 Vc 添加源(购买自山东天力药业有限公司维生素分公司, 有效含量为 34.1%, GB/T23882-2009), 配制 6 组等氮、等脂的实验饲料, 其配方及营养水平见表 1。各组饲料中 Vc 含量实际测定值分别为 6.85、46.90、88.24、167.43、329.21 和 658.69 mg/kg, 其中, 对照组为 6.85 mg/kg。饲料于集美大学水产学院饲料加工车间制备, 鱼粉、鸡肉粉、豆粕等原料均使用超微粉碎机粉碎。所有饲料原料均过 60 目筛, 然后采用逐级扩大法, 将各原料按配比定量混合均匀后, 加入 40% 左右的水搅拌。通过双螺旋杆饲料挤条机, 制作粒径为 2.5 mm 的硬颗粒饲料。然后在电热鼓风干燥箱中 43℃ 恒温干燥 8 h, 使实验饲料中的水分保持在 7%~9%, 并于 -20℃ 冰箱保存备用。

表 1 实验饲料组成及营养水平(干物质基础)

Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (dry matter basis) (g·kg⁻¹ diet)

原料 Ingredients	维生素 C 含量 Vitamin C level					
	6.85	46.90	88.24	167.43	329.21	658.69
鱼粉 Fish meal	250	250	250	250	250	250
鸡肉粉 Poultry by-product meal	100	100	100	100	100	100
豆粕 Soybean meal	260	260	260	260	260	260
面粉 Wheat flour	267	266.87	266.74	266.48	265.96	264.92
鱼油 Fish oil	30	30	30	30	30	30
豆油 Soybean oil	20	20	20	20	20	20
卵磷脂 Lecithin	20	20	20	20	20	20
虾膏 Shrimp paste	20	20	20	20	20	20
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	20	20	20	20	20	20
氯化胆碱 Choline chloride	5	5	5	5	5	5
矿物质预混料 Mineral premix ¹	5	5	5	5	5	5
维生素预混料 Vitamin premix ²	3	3	3	3	3	3
L-抗坏血酸多聚磷酸酯 2APP	0	0.13	0.26	0.52	1.04	2.08
营养水平 Nutrient level						
粗蛋白 Crude protein	428.00	431.60	424.20	424.90	422.50	423.10
粗脂肪 Crude lipid	111.00	112.30	115.40	116.10	112.20	113.10
粗灰分 Crude ash	80.40	79.80	80.40	80.30	80.20	79.90
维生素 C Vitamin C/(mg·kg ⁻¹)	6.85	46.90	88.24	167.43	329.21	658.69

注: 1 和 2 参考 Zhang 等(2018)

Note: 1 and 2 refer to Zhang *et al* (2018)

1.2 动物饲养与管理

实验所用花鲈鱼苗为当年同一批培育的鱼苗(购自福建省漳州市诏安县慧丰水产发展有限公司), 养殖实验于大北农水产科技集团海康养殖基地进行。鱼苗暂养使用水泥池, 并用对照组饲料驯养 10 d。将待分组鱼饥饿 24 h, 随机选择体质健壮、规格一致 (2.2 ± 0.2) g]的花鲈 720 尾, 随机分为 6 组, 每组 4 个生物学重复, 每桶(300 L)放养 30 尾鱼, 实验周期为 56 d。每天饱食投喂 2 次(08:30 和 17:30), 记录每桶鱼的摄食量, 并于投喂前后以虹吸管吸底排污。实验在控温的循环过滤水系统中进行, 通过调试温控系统和覆盖双层塑料薄膜的方式, 稳定控制缸内水温为 33℃, 盐度为 25~28, 溶氧 ≥ 9 mg/L。饲养 56 d 后, 每个实验桶保留规格相似的花鲈 8 尾, 通过换水、调试温控系统和覆盖双层塑料薄膜的方式, 在 2 h 内将实验桶水温稳定控制在 27℃, 进行为期 24 h 和 48 h 的急性降温实验, 实验期间不再投喂饲料。

1.3 样品采集与分析

分别在急性降温 0、24 和 48 h, 从每个实验桶各取 4 尾花鲈, 以丁香酚麻醉(1:10000)后尾静脉取血, 离心血清, -80℃ 保存, 用于检测血清生化指标; 取肝脏于-80℃ 保存, 用于肝脏抗氧化酶活性的测定。

肝脏总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性(羟胺法)、丙二醛(MDA)含量(TBA 法)、谷胱甘肽(GSH)含量(微量酶标法)、血红素氧合酶 HO-1 活性、肝脏组织蛋白含量的测定所使用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

血清溶菌酶(LZM)活性使用比浊法测定, 而血清中补体 3(C3)、补体 4(C4)、免疫球蛋白 M(IgM)、热休克蛋白(HSP70)等含量均通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

饲料中维生素 C 含量的测定采用 HPLC 法(Dabrowski *et al.*, 1989)。

1.4 数据统计与分析

实验数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素(one-way ANOVA)和双因素(two-way ANOVA)方差分析。若交互作用显著, 则通过使用 SPSS 的语法代码进行简单效应分析(simple effect test)。所有实验数据均以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)的形式来表示。

2 结果

2.1 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫指标的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫能力的影响见表 2。花鲈血清 C3、C4 和 IgM 均受饲料 Vc 水平显著

表 2 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫指标的影响

Tab.2 Effect of dietary vitamin C on serum immune index of spotted seabass after acute cooling

时间 Time/h	饲料维生素 C Vc/(mg·kg ⁻¹)	补体 3 C3/(μ g·mL ⁻¹)	补体 4 C4/(μ g·mL ⁻¹)	免疫球蛋白 M IgM/(mg·mL ⁻¹)	溶菌酶 LZM/(U·mL ⁻¹)
0	6.85	0.35 \pm 0.02	1.11 \pm 0.10	2.38 \pm 0.08	139.46 \pm 1.56
	46.90	0.32 \pm 0.01	1.30 \pm 0.07	2.56 \pm 0.04	149.91 \pm 3.70
	88.24	0.35 \pm 0.01	1.55 \pm 0.07	2.64 \pm 0.07	160.72 \pm 2.83
	167.43	0.39 \pm 0.01	1.67 \pm 0.04	2.86 \pm 0.02	162.52 \pm 6.72
	329.21	0.41 \pm 0.02	1.72 \pm 0.26	2.84 \pm 0.14	173.33 \pm 8.95
	658.69	0.36 \pm 0.01	1.77 \pm 0.07	2.89 \pm 0.21	189.73 \pm 1.74
24	6.85	0.58 \pm 0.02	1.02 \pm 0.04	3.49 \pm 0.29	141.98 \pm 8.22
	46.90	0.60 \pm 0.01	1.05 \pm 0.01	4.96 \pm 0.14	159.46 \pm 8.13
	88.24	0.55 \pm 0.02	0.89 \pm 0.01	3.60 \pm 0.48	154.23 \pm 6.24
	167.43	0.65 \pm 0.01	0.96 \pm 0.01	3.42 \pm 0.42	169.73 \pm 4.20
	329.21	0.77 \pm 0.01	1.04 \pm 0.05	2.63 \pm 0.09	161.98 \pm 1.78
	658.69	1.06 \pm 0.01	0.97 \pm 0.03	2.40 \pm 0.07	165.40 \pm 13.77
48	6.85	0.66 \pm 0.06	0.99 \pm 0.02	2.67 \pm 0.04	131.17 \pm 0.65
	46.90	0.73 \pm 0.05	0.88 \pm 0.04	2.35 \pm 0.03	148.83 \pm 3.28
	88.24	0.75 \pm 0.02	1.05 \pm 0.02	3.65 \pm 0.07	152.25 \pm 1.78
	167.43	0.81 \pm 0.06	1.12 \pm 0.01	4.90 \pm 0.02	155.32 \pm 11.82
	329.21	0.53 \pm 0.01	0.92 \pm 0.01	2.26 \pm 0.04	147.57 \pm 9.92
	658.69	0.51 \pm 0.01	0.82 \pm 0.03	2.71 \pm 0.13	137.66 \pm 12.64
<i>P</i> -value					
Vc		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
降温时间 Cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Vc \times 降温时间 Vc \times cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

影响($P<0.05$), 也受降温时间显著影响($P<0.05$), 且 Vc 水平和降温时间存在显著交互作用($P<0.05$), 而血清 LZM 活性受饲料 Vc 水平和降温时间显著影响, 但不受二者交互作用的影响。降温 24 h 和 48 h 时, 各组 C3 水平高于 0 h, 而饲料 Vc 水平为 167.43 和 658.69 mg/kg 组的血清 C3 显著高于对照组($P<0.05$)。血清 C4 水平在 0 h 高于降温后 24 h 和 48 h, 且在 0 h 时, 随着饲料 Vc 水平的升高而升高。当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 血清 IgM 水平在降温 24 h 和 48 h 后显著高于 0 h ($P<0.05$); 当饲料 Vc 水平在 329.21~658.69 mg/kg 时, 各时间点 IgM 差异不显著。与 0 h 相比, 血清 LZM 活性在降温 24 h 后没有显著变化($P>0.05$), 而在 48 h 后显著降低($P<0.05$), 随着饲料 Vc 水平的增加, 血清 LZM 活性在 88.24~658.69 mg/kg 实验组显著高于对照组($P<0.05$)。

2.2 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响如表 3 所示。花鲈肝脏 T-SOD、MDA 和 GSH 均受

饲料 Vc 水平显著影响($P<0.05$), 也受降温时间显著影响($P<0.05$), 且饲料 Vc 水平和降温时间存在显著交互作用($P<0.05$), 而肝脏 HO-1 含量不受饲料 Vc 水平影响, 但受降温时间和二者交互作用的显著影响($P<0.05$)。肝脏 T-SOD 含量随降温时间的增加, 先增加后降低, 在降温 24 h, 当饲料 Vc 水平为 329.21 mg/kg 时最低, 而在降温 48 h, 当饲料 Vc 水平为 167.43 mg/kg 时最低。肝脏 MDA 含量在降温 24 h 和 48 h 时显著高于 0 h, 但在降温后随着饲料 Vc 水平的升高而显著降低($P<0.05$)。在各时间点, 花鲈肝脏 GSH 含量都随着饲料 Vc 水平的升高而升高, 而当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 肝脏 GSH 含量随着降温时间的增加先升高后降低($P<0.05$)。在降温前, 肝脏 HO-1 含量随着饲料 Vc 水平的升高而先升高后降低, 当饲料 Vc 水平为 6.85 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 含量在降温后显著高于降温前($P<0.05$), 当饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 含量在降温后显著低于降温前($P<0.05$)。

表 3 饲料 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

Tab.3 Effect of dietary vitamin C on antioxidant capacity of spotted seabass after acute cooling

时间 Time/h	饲料维生素 C Vc/(mg·kg ⁻¹)	总-超氧化物歧化酶	丙二醛	还原型谷胱甘肽	血红素氧合酶
		T-SOD /(U·mg ⁻¹ prot)	MDA /(nmol·mg ⁻¹ prot)	GSH /(μmol·g ⁻¹ prot)	HO-1 /(ng·mg ⁻¹ prot)
0	6.85	426.61±7.27	4.53±0.44	2.86±0.09	15.70±1.15
	46.90	428.00±14.67	5.50±0.43	3.60±0.07	23.65±2.05
	88.24	446.53±3.53	5.001±0.35	3.70±0.13	24.65±3.02
	167.43	475.44±13.41	4.68±0.26	3.82±0.14	22.87±2.68
	329.21	443.54±7.48	5.15±0.59	5.32±0.46	19.24±1.22
	658.69	438.62±12.28	4.54±0.04	5.27±0.02	18.74±0.97
24	6.85	548.30±2.70	13.45±0.19	4.43±0.11	20.64±0.69
	46.90	575.61±6.33	7.71±0.18	8.66±0.14	20.14±0.71
	88.24	550.93±13.83	8.52±0.16	4.48±0.07	18.27±0.45
	167.43	559.90±6.35	7.80±0.17	5.11±0.09	20.36±0.61
	329.21	508.95±3.21	5.66±0.16	4.65±0.13	19.10±0.56
	658.69	535.94±5.44	6.11±0.15	5.29±0.03	22.12±0.10
48	6.85	430.20±3.50	8.33±0.15	2.47±0.05	24.51±0.89
	46.90	433.99±5.34	7.16±0.10	2.48±0.05	21.18±1.16
	88.24	416.28±3.32	6.34±0.14	2.63±0.06	20.26±1.52
	167.43	410.21±3.72	6.66±0.10	2.89±0.03	19.68±1.18
	329.21	412.10±4.39	5.87±0.11	3.00±0.02	24.54±1.10
	658.69	445.77±4.30	5.22±0.11	3.99±0.06	25.39±0.42
P-value					
Vc		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
降温时间 Cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Vc×降温时间 Vc×cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 Vc 对急性降温后花鲈血清抗应激能力的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清抗应激能力的影响如图 1 所示。花鲈血清 HSP70 水平受饲料 Vc 水平显著影响($P<0.05$), 也受降温时间显著影响($P<0.05$)。花鲈血清 HSP70 水平在降温前显著低于降温后。降温 0 h 时, 花鲈血清 HSP70 水平在 88.24~167.43 mg/kg Vc 实验组显著高于对照组($P<0.05$), 且在 167.43 mg/kg 组达到最大值; 降温 24 h 时, 在 88.24 mg/kg 实验组 HSP70 水平最高, 显著高于其他各组($P<0.05$), 而 46.90 和 658.69 mg/kg 实验组的 HSP70 水平显著低于对照组($P<0.05$); 降温 48 h 时, 各实验组血清 HSP70 水平均显著低于对照组, 且在 167.43 mg/kg 达到最小值($P<0.05$)。

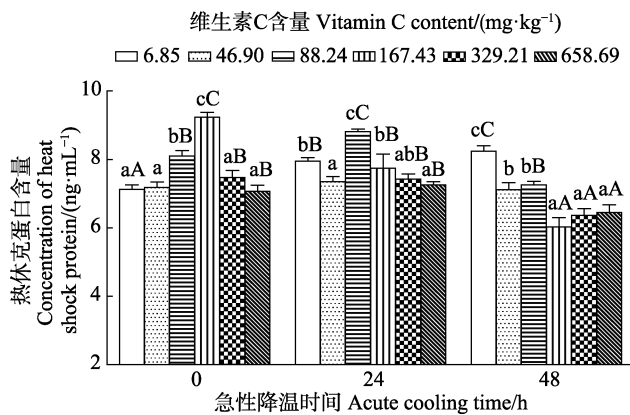


图 1 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清热休克蛋白含量的影响

Fig.1 Effect of dietary vitamin C on serum HSP70 concentration of spotted seabass after acute cooling

不同大写字母表示同一 Vc 水平组在不同时间差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示不同 Vc 水平组在同一时间差异显著($P<0.05$)

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$) at different time of same Vc group.

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$) at the same time in different Vc groups

3 讨论

3.1 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫的影响

补体系统在鱼类非特异性免疫机制中具有重要意义(Boshra *et al*, 2006), IgM 是鱼类特异性免疫最主要的效应分子(Scapigliati *et al*, 1999)。万金娟等(2012)研究表明, pH 胁迫 10 d 后, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)血清 C3、C4 水平均显著降低, 而饲料添加 Vc 组 C3、C4 水平均显著高于对照组。其他研究也发现, 应激源会抑制鱼类补体活性(Sunyer *et al*, 1995; Tort *et al*, 1996; Ortuno *et al*, 2001、2002)。本研

究发现, 急性降温后, 血清 C3 水平升高, C4 水平在降温后下降, LZM 活性在降温 48 h 显著降低, 但饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时活性显著提高, 说明急性降温应激降低了 C4 和 LZM 的活性, 而饲料 Vc 添加可以提高二者活性。Magnadóttir 等(1999)发现, 鱼类免疫受水温的影响, 低温会延缓免疫应答的发生。本研究中, 当饲料 Vc 水平在 329.21~658.69 mg/kg 时, 各时间点血清 IgM 差异不显著。血清 IgM 水平随降温时间的增加, 在 24 h 和 48 h 后显著高于 0 h。何杰等(2014)研究发现, 当水温由 26℃ 降到 20℃ 时, 吉富罗非鱼(genetic improvement of farmed tilapia, GIFT)、奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)与奥里亚罗非鱼(*Tilapia aureus*)的血清 IgM 水平上升。而 Klesius 等(1990)研究表明, 温度变化对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)血清 IgM 水平无影响。上述研究结果的不同, 可能与实验环境、鱼的种类等因素有关。

3.2 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

SOD 可以清除体内过高的超氧阴离子自由基, SOD 活性可以反映生物体受到环境氧化胁迫的程度。GSH 是重要的水溶性抗氧化剂, 在动物机体解毒代谢中具有重要作用(陈剑杰等, 2018)。而 Vc 是体内重要的抗氧化剂, 可以将氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH)。本研究结果显示, 肝脏 MDA 含量在 0 h 低于降温后 24 h 和 48 h, 随着饲料 Vc 水平的升高而降低。说明急性温度变化对花鲈产生了氧化应激, 导致 MDA 含量升高, 激活花鲈体内抗氧化系统参与清除 ROS, 饲料中添加 Vc 能降低 MDA 含量、减少脂质过氧化反应。Wan 等(2014)研究发现, 当受到 pH 胁迫时, 团头鲂肝脏 SOD 活性显著上升。本研究也发现, 当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 肝脏 T-SOD 活性和 GSH 含量在降温 24 h 后升高, 而当降温 48 h 时, 随着抗氧化系统作用和对温度的适应, 花鲈机体氧化应激水平降低, 说明花鲈对环境温度有很强的适应能力。血红素氧合酶(HO-1)是生物体内一种关键的限速酶, 除了有降解血红素的功能外, 还在许多生理和病理过程中发挥重要的调节作用, 各种应激源均可增加 HO-1 的表达(Butler *et al*, 2020)。本研究中, 对照组花鲈肝脏 HO-1 活性随着急性降温时间增加而升高, 当饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 活性随着低温应激时间的增加而显著降低, 说明肝脏 HO-1 含量是花鲈急性降温的敏感指标, 饲料中添加 Vc 可有效提高花鲈的抗急性降温应激的能力。相似研究结果已有

大量报道(Kitabchi *et al.*, 1967; Montero *et al.*, 1999; Deane *et al.*, 2005; Henrique *et al.*, 2005)。

3.3 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清 HSPs 的影响

HSP70 是细胞内的一类庞大蛋白质家族, 当动物体受到应激或者胁迫时, 它们在体内可以大量迅速表达(Hartl *et al.*, 2002)。正常情况下, HSP70 含量占细胞蛋白总量的 5%~10%, 但当机体处于应激状态时, HSP70 的表达量会增加到 15%甚至更高, 并发挥其蛋白质质量调节的功能, 维持细胞活性, 保护抗氧化酶(如 SOD 等)活性, 增强细胞抗自由基能力(Martín *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2008)。Wan 等(2014)研究表明, 当受到高 pH 胁迫时, 24 h 内, 团头鲂 HSP60、HSP70 和 HSP90 表达量会升高, 而高 Vc 组上调作用更显著, 但当胁迫达到 15 d 后, 它们的表达量下调。Deane 等(2005)将热应激 2 h 的银鲷置于常温条件下 24 h 后, 肝脏 HSP70 基因表达下调。本研究中, 不添加 Vc 组花鲈血清 HSP70 含量随急性降温时间的增加而显著升高, 说明降温导致花鲈产生应激, 而 Vc 添加组 HSP70 含量先升高后降低, 表明饲料 Vc 可增强花鲈对抗温度应激的能力, 并促进机体更快适应温度变化。

4 结论

急性降温胁迫实验(从 33℃ 水体转入 27℃ 水体)会在短时间内引起花鲈产生应激反应, 适量补充饲料维生素 C (46.90~167.43 mg/kg)能提高花鲈肝脏抗氧化能力, 减轻脂质过氧化水平, 提高花鲈抗应激能力。

参 考 文 献

- AI Q H, MAI K S, ZHANG C X, *et al.* Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 2004, 242(1/2/3/4): 489–500
- BOSHRA H, LI J, SUNYER J O. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20: 239–362
- BUTLER M W, ARMOUR E M, MINNICK J A, *et al.* Effects of stress-induced increases of corticosterone on circulating triglyceride levels, biliverdin concentration, and heme oxygenase expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2020, 240: 110608
- CHANG Y M, KUANG Y Y, CAO D C, *et al.* Effects of cooling temperature stress on hematology and serum chemistry values of *Cyprinus carpio*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(5): 701–706 [常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣, 等. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响. *水产学报*, 2006, 30(5): 701–706]
- CHEN J J, CAO J L, LI X, *et al.* Effects of fluoride on the activities of antioxidant enzymes and MDA levels in hepatopancreas of *Cipangopaludina cahayensis*. *Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(1): 268–273 [陈剑杰, 曹谨玲, 李潇, 等. 氟对中华圆田螺肝脏抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响. *生态毒理学报*, 2018, 13(1): 268–273]
- CHEN S B. Study on feeding rhythm and respiratory metabolism of common carp at different temperature. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2004 [陈松波. 不同温度条件下鲤鱼摄食节律与呼吸代谢的研究. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2004]
- DABROWSKI K, HINTERLEITNER S. Simultaneous analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and ascorbic sulfate in biological material. *Analyst*, 1989, 114: 83–87
- DARIAS M J, MAZURAS D, KOUMOUNDOUROS G, *et al.* Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 2011, 315: 49–60
- DEANE E E, WOO N Y S. Cloning and characterization of the HSP70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 776–783
- DONG Y W, DONG S L, MENG X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and *Hsp70* in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, 2008, 276(1/2/3/4): 179–186
- GUAN B, WEN H S, LIU Q, *et al.* Effects of acute temperature stress on metabolic enzyme activity and gene expression related to growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 29(6): 566–571 [管标, 温海深, 刘群, 等. 急性温度胁迫对虹鳟肝脏代谢酶活性及生长相关基因表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(6): 566–571]
- HARTL F U, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, 295: 1852–1858
- HE J, QIANG J, XU P, *et al.* Change in serum cortisol and immune-related indices in four strains of tilapia during low-temperature acclimation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 266–274 [何杰, 强俊, 徐跑, 等. 低温驯化下 4 种不同品系罗非鱼血清皮质醇与免疫相关指标的变化. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 266–274]
- HENRIQUE M M F, GOMES E F, GOUILLOU-COUSTANS M F, *et al.* Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 1998, 161: 415–426
- HU P L, WU R, LU K L, *et al.* Effects of replacing fish meal with composite protein on growth, diet digestibility, and gut health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 56–65 [胡鹏莉, 吴瑞, 鲁

- 康乐, 等. 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 56–65]
- HUANG G Q, WEI L Z, ZHANG X M, *et al.* The growth and energy allocation of the brown flounder (*Paralichthys olivaceus*) during thermal manipulation. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2010, 40(2): 38–46 [黄国强, 韦柳枝, 张秀梅, 等. 温度操作对褐牙鲈幼鱼的生长和能量分配的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(2): 38–46]
- KITABCHI A E. Ascorbic acid in steroidogenesis. Nature, 1967, 215: 1385–1386
- KLESZIUS P H. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1990, 24(2): 187–195
- LIAO C Y, SHAO L, WANG X X. Influence of dietary vitamin C on non-specific immunity of larval and juvenile *Symphysodon aequifasciatus*. Process in Fishery Sciences, 2012, 33(3): 54–59 [廖畅宇, 邵力, 王旭霞. 饲料中维生素 C 对七彩神仙鱼仔幼鱼非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 54–59]
- LUO Q, OU Y J, AI L, *et al.* Effects of temperature and pH on the digestive enzymes activities of juvenile striped beakperch (*Oplegnathus fasciatus*). Journal of Tropical Oceans, 2010, 29(5): 154–158 [罗奇, 区又君, 艾丽, 等. 温度和 pH 对条石鲷幼鱼消化酶活力的影响. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 154–158]
- MAGNADÓTTIR B, JÓNSDÓTTIR H, HELGASON S, *et al.* Humoral immune parameters in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.): I. The effects of environmental temperature. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 122(2): 173–183
- MARTÍN M, HERNÁNDEZ C, BODEGA G, *et al.* Heat-shock proteins expression in fish central nervous system and its possible relation with water acidosis resistance. Neuroscience Research, 1998, 31(2): 97–106
- MONTERO D, MARRERO M, IZQUIERDO M S, *et al.* Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 1999, 171: 269–278
- MUNILLÁ-MORAN R, SABORIDOREY F. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 113(2): 395–402
- ORTUNO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish and Shellfish Immunology, 2001, 11(2): 187–197
- ORTUNO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 84(1/2): 17–27
- PADAYATTY S J, LEVINE M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. Canadian Medical Association Journal, 2001, 164: 353–355
- POLJSAK B, GAZDAG Z, JENKO-BRINOVEC S, *et al.* Pro-oxidative vs antioxidant properties of ascorbic acid in Chromium (VI) -induced damage: An *in vivo* and *in vitro* approach. Journal of Applied Toxicology, 2005, 25(6): 535–548
- QIANG J, YANG H, WANG H, *et al.* The effect of acute temperatures stress on biochemical indices and expression of liver *HSP70* mRNA in gift Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(5): 943–953 [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 *HSP70* mRNA 表达的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(5): 943–953]
- QIAO L J, WANG Y R, ZHANG M. Research progress of Nrf2/HO-1 pathway in mechanism of oxidative damage and protection. Chinese Occupational Medicine, 2013, 40(1): 82–84 [乔丽杰, 王延让, 张明. Nrf2/HO-1 通路在氧化损伤保护机制中研究进展. 中国职业医学, 2013, 40(1): 82–84]
- SCAPIGLIATI G, ROMANO N, ABELLI L. Monoclonal antibodies in fish immunology: Identification, ontogeny and activity of T- and B-Lymphocytes. Aquaculture, 1999, 172(1/2): 3–28
- SUNYER J O, GOMEZ E, NAVARRO V, *et al.* Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead seabream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52: 23–39
- TOLBERT B M. Ascorbic acid metabolism and physiological function. International Journal Vitamin Nutrition Research Supplement, 1979, 19: 127–142
- TORT L, GÓMEZ E, MONTERO D, *et al.* Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immune competence: Their suitability in stress and dietary studies. Aquaculture International, 1996, 4(1): 31–41
- WAKELING J M, COLE N J, KEMP K M, *et al.* The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp (*Cyprinus carpio*). American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2000, 279(2): 657–665
- WAN J J, GE X P, LIU B, *et al.* Effect of dietary vitamin C on non-specific immunity and mRNA expression of three heat shock proteins (Hsps) in juvenile *Megalobrama amblycephala* under pH stress. Aquaculture, 2014, 434: 325–333
- WAN J J. Effects of dietary vitamin C levels on growth and immunity of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). Master's Thesis of Nanjing Agricultural University [万金娟. 维生素 C 对团头鲂幼鱼生长及免疫

- 的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- WANG C F, XIE S Q, ZHU X M, *et al.* Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvhideaco* larvae. *Aquaculture*, 2006, 254(1/2/3/4): 554–562
- WILSON R P, POE W E. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *Journal of Nutrition*, 1973, 103(9): 1359–1364
- YANG J H, XU Z F, YIN Z W, *et al.* Experimental study on effects of vitamin C and vitamin E on the acute nephrotoxicity of mercury. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2004, 17(2): 91–93 [杨敬华, 徐兆发, 尹忠伟, 等. 维生素 C、E 对汞急性肾毒作用影响的实验研究. *中国工业医学杂志*, 2004, 17(2): 91–93]
- ZHANG C X, RAHIMNEJAD S, WANG Y R, *et al.* Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 2018, 483: 173–182

(编辑 冯小花)

Effects of Dietary Vitamin C on the Immune, Antioxidant Capacity, and Stress Tolerance of Spotted Seabass (*Lateolabrax maculatus*) after Acute Cooling

SUN Jingcheng, LI Xiao, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao^①

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

Abstract The purpose of this study was to investigate the effects of dietary vitamin C on the immunity, antioxidant capacity, and stress tolerance of juvenile *Lateolabrax maculatus* under acute cooling stress. An 8-week feeding trial was conducted with experimental diets containing 6.85, 46.90, 88.24, 167.43, 329.21, and 658.69 mg/kg vitamin C (Vc). Some fish were then exposed to acute cooling stress for 24 h and 48 h (transferred from 33°C water to 27°C water). The results showed that the serum levels of Complement 3 (C3) in each group after cooling were higher than before cooling, while the levels of serum Complement 4 (C4) showed the opposite pattern. When dietary Vc was 6.85~167.43 mg/kg, the levels of serum immunoglobulin M (IgM) at 24 h and 48 h were higher than at 0 h ($P<0.05$). However, there were no differences among the treatments with higher dietary Vc supplementation (329.21~658.69 mg/kg; $P>0.05$). After acute cooling for 48 h, the levels of serum lysozyme (LZM) were lower than at 0 h, but the Vc-supplemented groups were higher than the control group ($P<0.05$). The concentration of hepatic malondialdehyde (MDA) were higher in all groups after cooling stress than before cooling stress, but decreased with increasing levels of dietary Vc ($P<0.05$). Total superoxide dismutase (T-SOD) activity initially increased but then decreased with greater cooling time, and the glutathione (GSH) content increased with increasing dietary Vc supplementation. Heme oxygenase-1 (HO-1) activity in the 6.85 mg/kg Vc group was higher after cooling stress, but the groups supplemented with 88.24 to 167.43 mg/kg Vc had lower activities after cooling ($P<0.05$). The levels of heat shock proteins (HSP70) were higher before acute cooling, and when cooled for 48 h, HSP70 levels in the Vc-supplemented groups were lower than the control group ($P<0.05$). These results suggest that dietary Vc supplementation (46.90~167.43 mg/kg) may improve antioxidant capacity, reduce lipid peroxidation, and enhance the resistance to acute cooling in *L. maculatus*.

Key words *Lateolabrax maculatus*; Vitamin C; Acute cooling stress; Stress tolerance

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200115001

http://www.yykxjz.cn/

张艳珍, 付龙威, 隋智海, 王咏星, 刘云国. 一株河鲈源致病性虫草菌 *Cordyceps confragosa* CHL02 菌株的全基因组测序及比较基因组分析. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 134–144

ZHANG Y Z, FU L W, SUI Z H, WANG Y X, LIU Y G. Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of a pathogenic *Cordyceps confragosa* CHL02 strain isolated from *Perca fluviavilis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 134–144

一株河鲈源致病性虫草菌 *Cordyceps confragosa* CHL02 菌株的全基因组测序及比较基因组分析*

张艳珍^{1,2#} 付龙威^{1,2#} 隋智海² 王咏星¹ 刘云国^{2①}

(1. 新疆大学生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 临沂大学生命科学学院 山东 临沂 276000)

摘要 致病性虫草菌 *Cordyceps confragosa* CHL02 菌株是从患病河鲈(*Perca fluviavilis*)鱼体分离鉴定的一株昆虫致病菌,其无性阶段蜡蚧轮枝菌(*Lecanicillium lecanii*)广泛用于农业中昆虫防治。本研究基于 Illumina PE150 测序平台进行 CHL02 菌株的全基因组测序,对测序数据进行组装和组分分析,进行基因预测与功能注释,预测次级代谢产物合成基因簇,并进行病原宿主互作以及比较基因组分析。测序结果显示,CHL02 基因组大小为 36.17 Mb,GC 含量为 53.09%;预测包含 8093 个编码基因、1618 个转座因子(TEs)、4572 个串联重复序列及 114 个 tRNA;共注释 7724 个基因,其中,1985 个基因获得 KOG 注释,GO 聚类分析中,2687 个基因参与代谢过程,预测到 22 个次级代谢产物合成基因簇,1162 个基因参与病原宿主互作机制中。基因聚类分析和系统发育树均显示,CHL02 菌株与参考菌株昆虫源粗糙虫草菌(*C. confragosa*) RCEF 1005 具有较高的同源性。本研究首次报道了河鲈源致病性虫草菌 *C. confragosa* CHL02 菌株的全基因组序列并分析其基本特征,与参考菌株进行比较基因组分析,为后续深入开展该病菌侵染河鲈的作用机制等相关研究奠定理论基础。

关键词 虫草菌 *Cordyceps confragosa*; 全基因组测序; 基因注释; 比较基因组分析

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0134-11

虫草属(*Cordyceps*)真菌是一大类昆虫病原真菌,分布于不同的地理区域,其不同生长时期都能侵染节肢动物和昆虫(Sung *et al.*, 2007)。据估计,全球共有蛹虫草(*Cordyceps militaris*)、中华虫草(*C. sinensis*)、细虫草(*C. gracilis*)等 500 余种虫草属真菌,寄主范围广泛且多样性丰富(Zheng *et al.*, 2011)。近几十年里,对虫草属物种进行了大量研究,涉及到虫草种类的区域探索、人工培育、微生物群落组成和活性成分的代谢机制等(Shrestha *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Kramer

et al., 2017; Xia *et al.*, 2019)。一些变形虫草物种,如拟青霉属(*Paecilomyces*)、绿僵菌属(*Metarhizium*)和白僵菌属(*Beauveria*)在昆虫的生物防治中也发挥了重要作用(Zimmermann, 1993; Meyling *et al.*, 2007)。*Cordyceps confragosa* 是虫草属的一种,具有广泛地理分布,其变形阶段蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)在农业实践中被用作昆虫的生物防治剂(Doug *et al.*, 2012)。实验室在新疆昌吉地区某养殖场内,从患病河鲈(*Perca fluviavilis*)病灶处分离纯化到 1 株 *C. confragosa* 菌株

* 国家自然科学基金项目(31560047)资助 [This work was supported by National Natural Sciences Foundation of China (31560047)]. #共同第一作者: 张艳珍, E-mail: zyz0521@163.com; 付龙威, E-mail: 445322966@qq.com

① 通讯作者: 刘云国, 教授, E-mail: yguoliu@163.com

收稿日期: 2020-01-15, 收修改稿日期: 2020-04-10

CHL02。经柯赫氏法则验证, CHL02 菌株为患病河鲈的病原菌, ITS rDNA 分子方法鉴定为 *C. confragosa*。该菌使健康河鲈出现游动迟缓、食欲不振等症状, 在河鲈体表形成溃疡, 覆有白色微黄的菌斑, 直至河鲈衰歇死亡(魏冬梅, 2018)。

全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)已被广泛应用于流行病学、疫苗开发、微生物进化等领域, 为微生物特异性生物学的研究提供分子生物学基础, 如致病机制、共生机制、独特的代谢机制等, 还为病原-宿主相互作用的发病机制提供深刻见解(Yu *et al.*, 2017; Rantsiou *et al.*, 2017)。迄今为止, 一些虫草种类已经被测序并发表在 Ensembl 真菌数据库中, 包括蛹虫草、布氏虫草(*C. brongniartii*)、广东虫草(*C. guangdongensis*) (Zhang *et al.*, 2018)等, 以便探索虫草属的种间进化关系及其生物活性物质的生物合成机制和代谢途径(Vongsangnak *et al.*, 2017)。2016年, Shang 等(2016)报道了昆虫源 *C. confragosa* RCEF 1005 的全基因组测序, 并结合其他动植物病原真菌探究真菌致病性的趋同进化。

本研究首次报道了河鲈源 *C. confragosa* CHL02 的全基因组测序, 并进行了比较基因组分析。基于组装水平, 通过基因预测获得 *C. confragosa* 基因组组成, 利用一系列功能数据库进行基因功能注释、次级代谢产物基因簇预测, 并进行病原宿主互作以及比较基因组学分析, 旨在为 *C. confragosa* 的基因组组成和功能研究奠定一定基础, 也为了解该病原菌感染河鲈的发生机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C. confragosa CHL02 菌株来自实验室前期保存菌株(魏冬梅, 2018), 用于全基因组测序分析。沙堡氏液体(蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 40 g/L)培养基, 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基, 购于青岛海博生物技术公司; 抗生素青霉素和链霉素购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 菌株培养及 DNA 提取

从实验室低温(4℃)保藏的 PDA 斜面培养基上刮取适量待测菌株, 接种于 200 mL 沙堡氏液体培养基, 25℃培养 72 h, 离心收集菌体。采用 SDS 法提取基因组 DNA, 所得 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, Qubit®2.0 荧光仪(Thermo Scientific)定量, 检测合格的 DNA 样品送北京康普森生物公司进行后续测序分析。

1.3 基因组测序与组装

随机打断 DNA 样品, 构建小片段测序文库(350 bp), 基于 Illumina PE150 平台进行双末端测序。对测序得到的原始数据进行低质量过滤处理, 分别去除超过 40 bp 低质量碱基(质量值 ≤ 38)、N 碱基达到 10 bp、与连接物之间 overlap 超过 15 bp 以及样品宿主的 reads, 然后去除 duplication 污染, 得到有效数据, 进行碱基含量和质量分布分析。基因组组装前, 采用 K-mer 统计分析来估计基因组大小, 用 SOAP de novo (V.2.04) 软件组装有效数据(Li *et al.*, 2008), 并使用 CISA 软件进行整合(Lin *et al.*, 2013)。原始 reads 与组装好的基因组序列进行比对, 通过统计组装序列的 GC 含量和 reads 覆盖深度, 总结基因组的 GC 偏向性和重复序列情况, 判断组装结果是否正常。

1.4 基因组组分分析

通过基因预测软件 Augustus (V.2.7)(Stanke *et al.*, 2008)对组装结果进行基因 de novo 预测, 同时, 运用 GeneMark 软件(V.4.17) (Besemer *et al.*, 2001)进行比较, 获得基因组蛋白编码基因, 用于后续的基因功能注释分析。通过 TRF (Tandem Repeats Finder, V.4.07) 和 RepeatMasker (V.4.0.5)软件分别预测串联重复序列和转座子 TE (Benson, 1999; Saha *et al.*, 2008); 采用 tRNAscan-SE (V.1.3.1)和 rRNAmmer 软件分别进行 tRNA 和 rRNA 的预测(Lowe *et al.*, 1997; Lagesen *et al.*, 2007)。

1.5 基因功能注释

将 CHL02 菌株的基因序列分别与已知的各功能数据库进行比对($e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$), 对于每一条序列的比对结果, 选取 score 最高的比对结果(identity $\geq 40\%$, coverage $\geq 40\%$)进行基因功能注释。主要参考 Nr (non-redundant protein database, 非冗余的蛋白质数据库)(Li *et al.*, 2002)、GO (gene ontology, 基因本体论)(Ashburner *et al.*, 2000)、KOG (cluster of orthologous groups of proteins, 蛋白相邻类的聚簇)(Tatusov *et al.*, 2000)和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, 京都基因和基因组百科全书)(Kanehisa *et al.*, 2000)功能数据库。

1.6 专有数据库注释

通过碳水化合物相关酶数据库 CAZy (carbohydrate-active enzymes database)进行碳水化合物酶分类注释(Cantarel *et al.*, 2000); 采用 antiSMASH 软件(v.2.0.2)预测次级代谢产物基因簇(Medema *et al.*, 2011); PHI

(pathogen host interaction, 病原与宿主互作数据库)进行相关致病基因的注释分析(Martin *et al*, 2015)。

1.7 比较基因组分析

从 GenBank 数据库中获得参考菌株蛹虫草(*C. militaris* CM01)、粗糙虫草菌(*C. confragosa* RCEF 1005)、文森虫草菌(*C. fumosorosea*)、爪哇虫草菌(*C. javanica*)和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)的基因组信息,与菌株 CHL02 的基因组序列直接进行比较分析,统计其基本特征。利用 OrthoVenn2 在线工具(<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/task/create>)对测序和参考菌株基因组的蛋白序列进行直系同源聚类分析(默认参数: $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$, $\text{inflation value} \leq 1.5$) (Wang *et al*, 2010),通过 CVTree3 在线工具(<http://life.fudan.edu.cn/cvtree/cvtree/>)对这些菌株的全基因组构

建组分矢量(氨基酸短串 K 值取 6),利用 neighbor-joining 系统发育树进行系统发育分析(Wang *et al*, 2010)。

2 结果与分析

2.1 基因组数据概况

基于 Illumina PE150 测序平台, CHL02 菌株获得原始数据 6.982 Gb。过滤低质量的序列片段后,得到 6.188 Gb 的有效数据,有效数据的 GC 含量为 52.96%, Q20 和 Q30 值分别为 97.51% 和 93.25%,测序质量较好。有效数据的碱基分析图显示(图 1),碱基 A 与 T 曲线重合, G 与 C 曲线重合,碱基所在 reads 位置上的平均错误率百分比低,说明碱基组成平衡,质量良好。

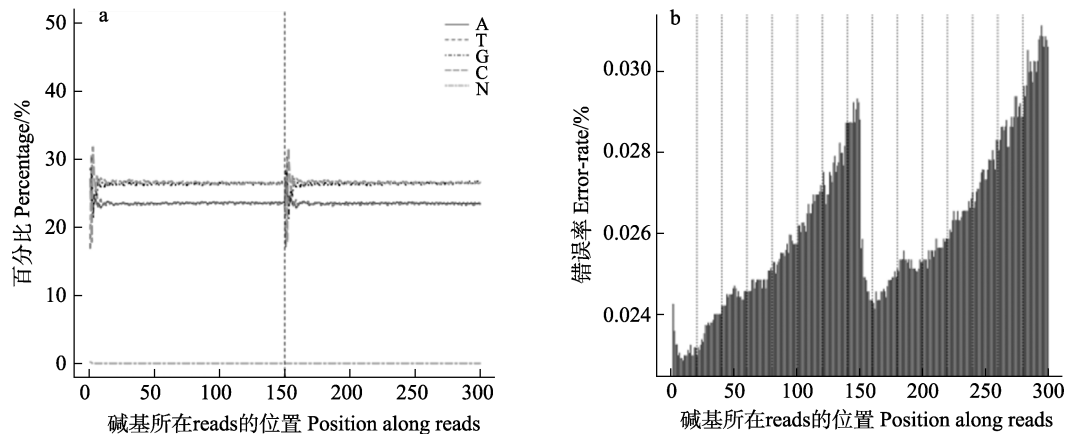


图1 碱基含量(a)和质量分析(b)

Fig.1 Analysis of base content(a) and quality(b)

2.2 基因组概况

组装前,通过 K-mer 分析判断样品的基因组大小、杂合情况和重复序列信息,如图 2 所示,15-mer 统计图显示只有 1 个主峰出现,且主峰后面无明显的拖尾现象,表明基因组无明显的重复序列, CHL02 基因组大小约 38.09 Mb,覆盖深度为 27.33 X。通过组装构建,获得 521 个 contig, 407 个 scaffold, 组装后的基因组大小为 36.17 Mb, GC 含量为 53.09% (GenBank 登录号: WHIX00000000.1)。GC-Depth 分析显示,菌株呈泊松分布, GC 无明显偏向性,在 GC 含量为 20%~30% 处存在 1 处散点区域,可能是受线粒体 DNA 影响(图 3)。

2.3 基因组组分

通过不同软件预测,获得 CHL02 菌株的基因组组分。预测到 8093 个编码基因,基因长度分布集中

在 400~1700 bp 及大于 2500 bp,其中,大于 2500 bp 的基因分布最多,达到 678 个,约占编码基因的 8.4% (图 4)。还预测到 1618 个 TEs (1140 个逆转录转座子、461 个 DNA 转座子以及 17 个未知 TEs)、4571 个串联重复序列、114 个 tRNA、25 个 rRNA、2 个 sRNA 以及 16 个 snRNA。

2.4 基因功能注释

Nr 库基因功能注释显示,8093 个编码基因中,有 7724 个匹配到已知功能蛋白,与 CHL02 菌株最相关的物种为 *C. confragosa*。共有 5303 个基因获得 GO 功能注释(图 5),包括 3 个功能方面的内容,分子功能主要与催化活性(catalytic activity)和结合(binding)有关,细胞组分主要与细胞(cell)和细胞部分(cell part)有关,而生物过程主要与代谢过程(metabolic process)和细胞进程(cellular process)有关。1985 个基因成功注释到

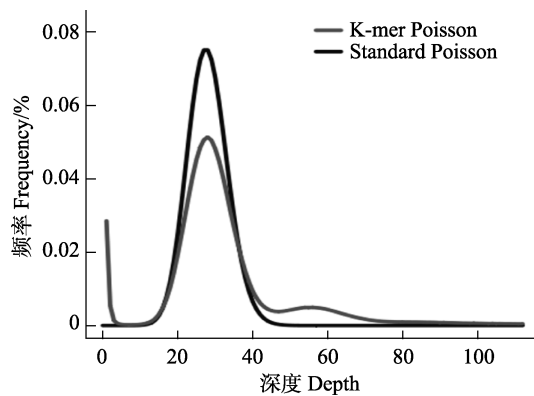


图 2 15-mer 分析统计分布

Fig.2 15-mer depth-frequency distribution

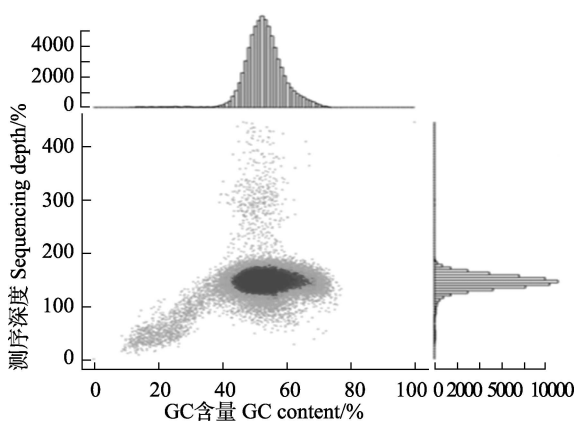
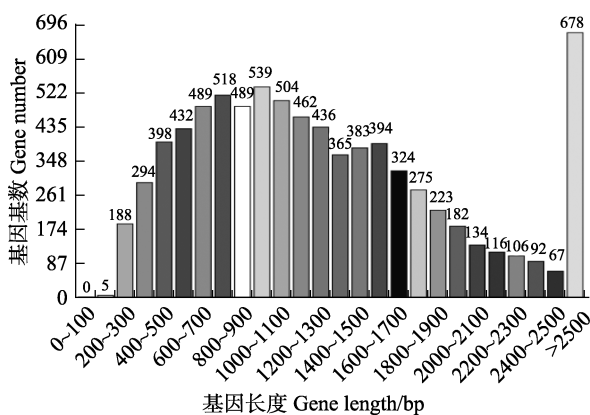


图 3 GC 含量与测序深度关联分布

Fig.3 Distribution of GC content and sequence depth

图 4 *C. confragosa* CHL02 基因长度分布Fig.4 Gene length distribution of *C. confragosa* CHL02

KOG 数据库(图 6), 其中, 翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣 (posttranslational modification, protein turnover, chaperones, O)、一般功能预测 (general function prediction only, R)、翻译核糖体结构和生物合成 (translation, ribosomal structure and biogenesis, J) 占据比例较大。KEGG 富集分析(图 7)显示, 预测的 5057

个编码蛋白共涉及 378 条代谢途径, 主要集中在萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、运输和分解代谢以及转录途径中。

2.5 碳水化合物活性酶类

CAZy 是能催化碳水化合物降解、修饰以及生物合成的相关酶系家族。共预测到 392 个潜在的编码碳水化合物活性酶相关的基因, 分布于不同的酶家族, 占编码基因的 4.84%。其中含量最高的是糖苷水解酶家族 (glycoside hydrolase, GH) (226), 占全部碳水化合物酶的 57.65%, 其余依次为糖苷转移酶 (glycosyl transferases, GT) (87)、碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBM) (51)、氧化还原酶 (auxiliary activities, AA) (34)、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterases, CE) (22) 以及多糖裂解酶家族 (polysaccharide lyases, PL) (3), 所占比例分别为 22.19%、13.01%、8.67%、5.61% 和 0.76%。识别数目最多是 GH 家族的第 3 大组群 GH18, 为 25 个, 它含有许多真菌的几丁质酶, 主要负责和其他的降解酶共同改造和回收真菌自身细胞壁。

2.6 次级代谢产物合成基因簇分析

次级代谢产物的编码基因通常成簇存在于基因组中, 编码具有多种功能的复合酶。共预测到 22 个次级代谢产物合成基因簇, 涉及到萜烯类 (terpene)、Type 1 聚酮合酶 (t1PKS)、非核糖体肽合成酶 (NRPS)、t1PKS-NRPS、羊毛硫肽类化合物 (lantipeptide)、Terpene-NRPS 以及其他化合物的合成, 表明 CHL02 菌株具有合成多种化合物的能力。其中, 涉及到 NRPS 合成以及未知化合物的基因簇数目最多都为 6 个。与已知次级代谢产物进行 Blast 比对发现, CHL02 菌株通过部分 NRPS 途径、t1PKS-NRPS 混合代谢途径以及 t1pks 途径可以产生白僵菌素 (beauvericin)、镰刀菌素 (fusarin) 及胞外嗜铁素 (epichloenin) 等。

2.7 病原宿主互作相关基因

病原宿主互作基因数据库, 包括微生物致病菌对不同类寄主的致病相关基因, 对寻找药物干预的靶基因研究有重要作用。通过基因注释, 菌株 CHL02 共有 1162 个 PHI 相关基因, 主要分布在毒性降低 (reduced virulence)、致病性不变 (unaffected pathogenicity)、致病性丧失 (loss of pathogenicity)、混合功能 (mixed outcome)、致病因子 (lethal)、毒性增强 (increased virulence)

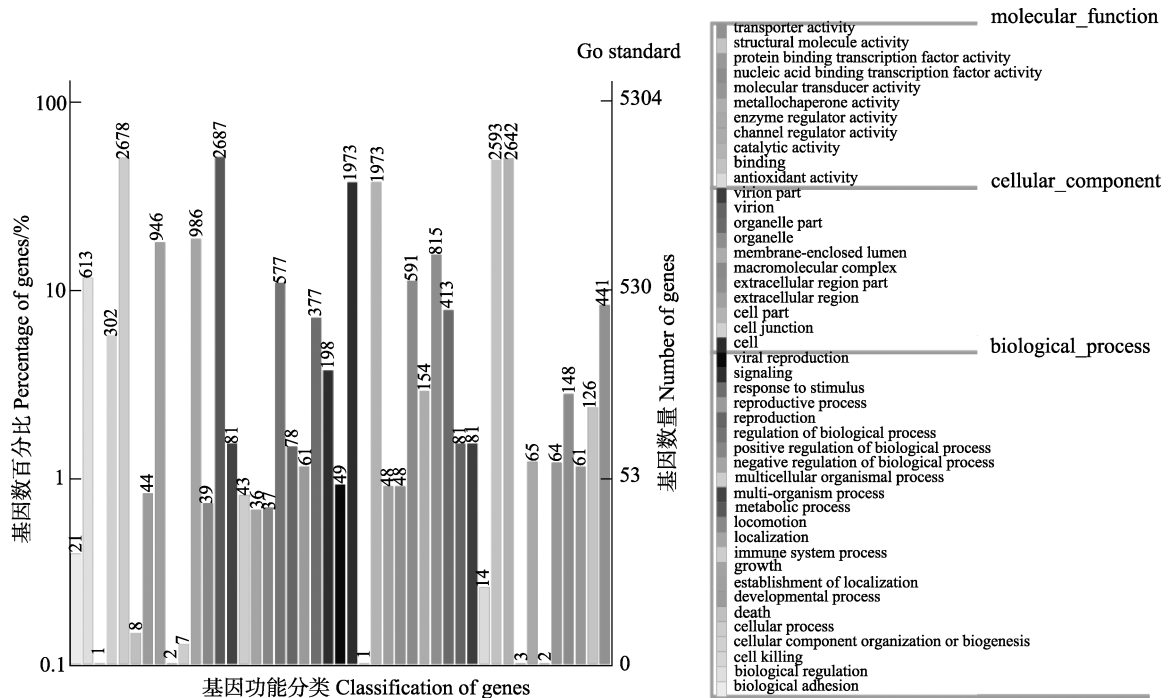


图 5 *C. confragosa* CHL02 蛋白质 GO 功能聚类分析

Fig.5 GO cluster analysis of *C. confragosa* CHL02 proteins

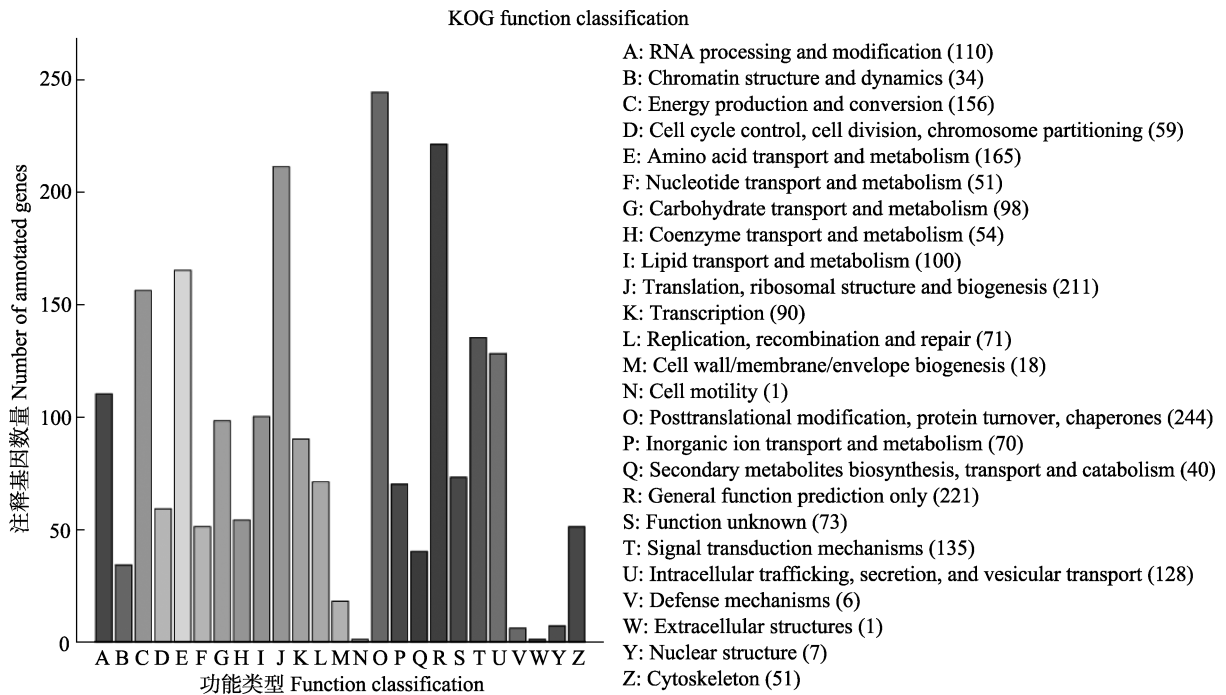
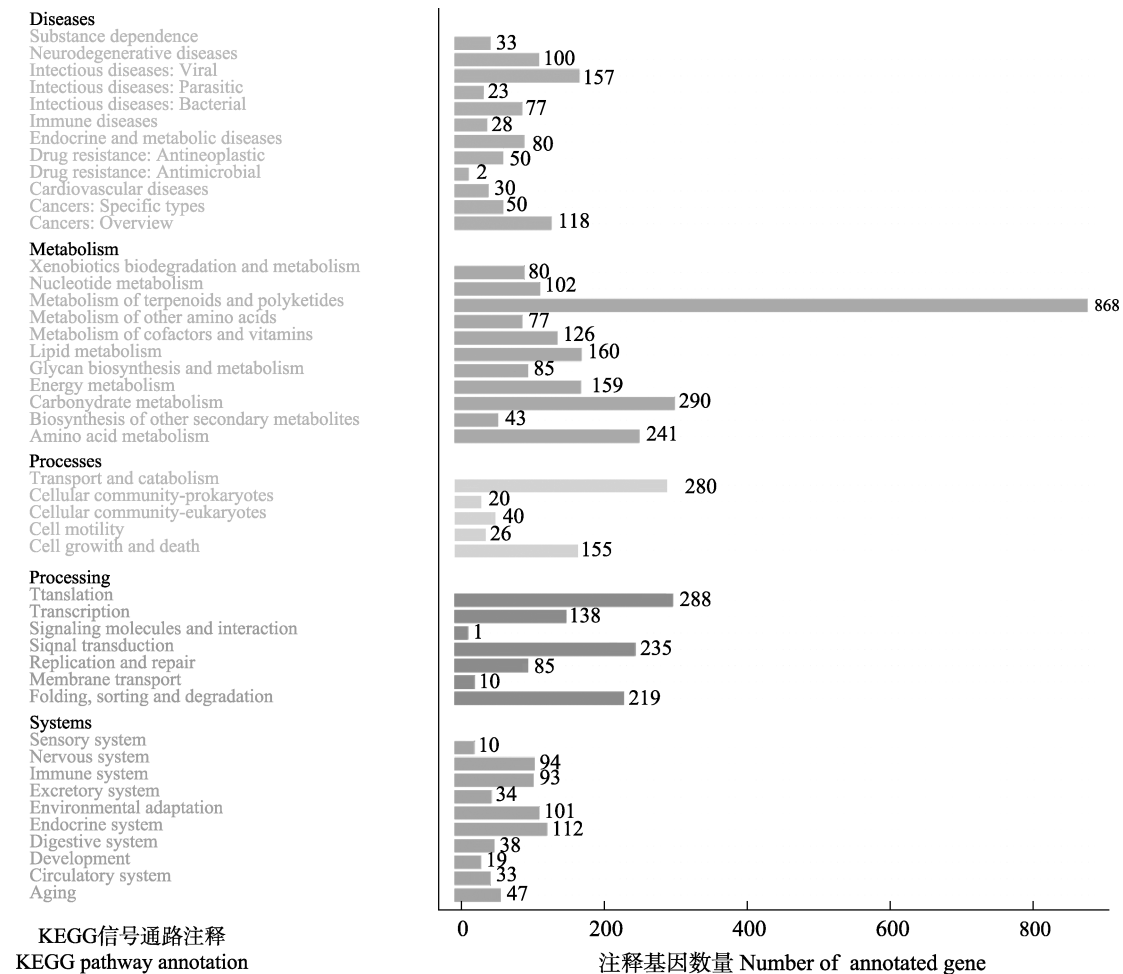


图 6 *C. confragosa* CHL02 蛋白质 KOG 聚类分析

Fig.6 KOG cluster analysis of *C. confragosa* CHL02

A: RNA 加工和修饰; B: 染色质结构和动力学; C: 能量生产与转换; D: 细胞周期调控, 细胞分裂, 染色体划分;
 E: 氨基酸运输与代谢; F: 核苷酸转运和代谢; G: 碳水化合物转移和代谢; H: 辅酶转运和代谢; I: 脂质运输和代谢;
 J: 翻译, 核糖体结构和生物起源; K: 转录; L: 复制, 重组和修复; M: 细胞壁/膜/被膜生物合成; N: 细胞运动;
 O: 翻译后修饰, 蛋白质转换, 分子伴侣; P: 无机离子运输和代谢; Q: 次级代谢产物的生物合成, 转运和代谢;
 R: 一般功能预测; S: 功能未知; T: 信号转导机制; U: 胞内运输, 分泌和囊泡运输;
 V: 防御机制; W: 胞外结构; Y: 核心结构; Z: 细胞骨架

图 7 *C. confragosa* CHL02 KEGG 代谢通路分类Fig.7 KEGG classification of metabolic pathways map of *C. confragosa* CHL02

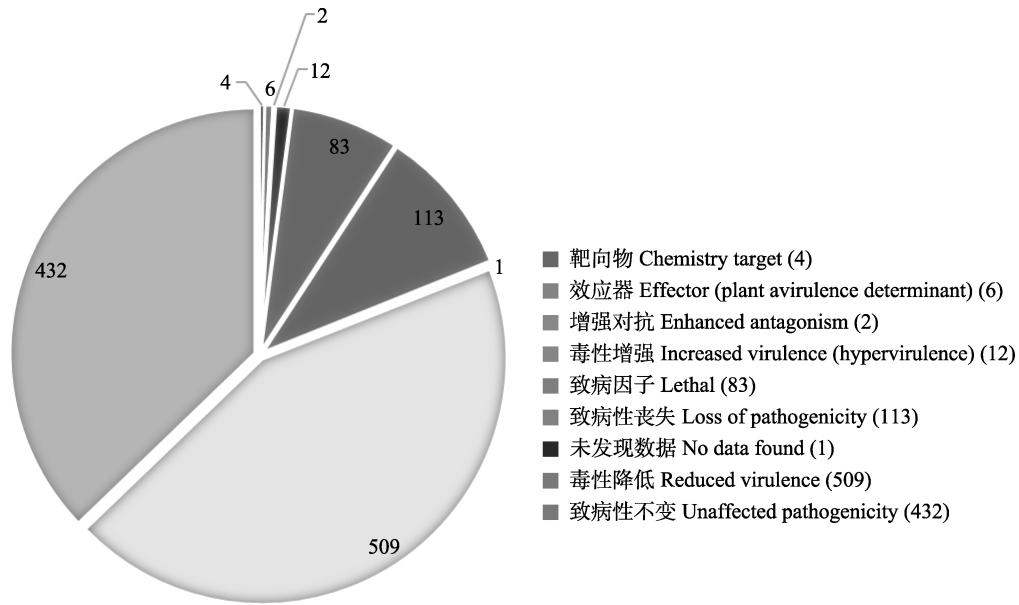
(hypervirulence)、效应器(effector) (plant avirulence determinant)和靶向物(chemistry target)等模块中(图 8)。大部分的基因表达减弱导致病原菌对相应寄主致病能力降低,并在病原菌与寄主互作过程中发挥不同的作用,包括防御机制、转录因子、碳水化合物运输和代谢、细胞内转运、无机离子运输和代谢、分泌和膜泡运输等。83 个致病因子基因主要来自于禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)以及球孢白僵菌,尤其是球孢白僵菌中几丁质酶基因 *BbCHIT1* 过表达导致致病性增强。与毒性增强相关的致病基因 *Ops3* 和 *Ohmm* 基因也源自球孢白僵菌,分别具有转录因子和跨膜蛋白作用。而效应器中的 *Blys2* 和 *Blys5* 基因,同样存在于球孢白僵菌中,作为效应分子介导真菌-昆虫的相互作用。

2.8 比较基因组分析

CHL02 菌株与 5 株参考菌株的基因组信息进行

直接比较分析,其基本特征见表 1。结果显示,CHL02 菌株组装的 Scaffold 数目仅次于文森虫草菌,远多于其他参考菌株,可能是因为在测序 gaps; 基因组最大,与其较接近的是昆虫源粗糙虫草菌 RCEF 1005; CHL02 菌株的 GC 含量为 53.09%,高于参考菌株蛹虫草 CM01、爪哇虫草菌和球孢白僵菌; 编码蛋白基因数量最少,虽然具有虫草菌的基本基因特征,但在进化上可能存在一定差异。

OrthoVenn2 直系同源聚类分析发现,共得到 10,829 个基因 clusters, 5309 个直系同源基因 clusters(至少含有 2 个物种)以及 5520 个单拷贝基因 clusters。6 株菌的共有基因簇(核心基因组)有 5742 个,占总基因的 53.02%,CHL02 菌株的特有基因簇最少,为 7 个,而其他参考菌株的特有基因簇分别是球孢白僵菌 51 个,文森虫草菌 24 个,粗糙虫草菌 RCEF 1005 23 个,爪哇虫草菌 18 个,蛹虫草 CM01 12 个。此外,CHL02 菌株与粗糙虫草菌 RCEF 1005 的共有基因簇最多,为 7679 个,基因组成对比较相似矩阵热图也

图 8 *C. confragosa* CHL02 在 PHI 数据库中的匹配结果Fig.8 The match result of *C. confragosa* in PHI database表 1 *C. confragosa* CHL02 与参考菌株的全基因组特征比较Tab.1 Comparison of genomic features of the *C. confragosa* CHL02 genome and with reference strains

菌株名称 Sample name	INSDC ID	组装类型 Seq type	总数 Total number	大小 Size /Mb	GC 含量 GC content (%)	编码蛋白 CDS (No.)
<i>C. confragosa</i> CHL02	WHIX00000000.1	Scaffold	407	36.17	53.09	8093
<i>C. confragosa</i> RCEF 1005	AZHF00000000.1	Scaffold	130	35.59	53.10	11,030
<i>C. militaris</i> CM01	AEVU00000000.1	Scaffold	32	32.21	51.40	9651
<i>C. fumosorosea</i>	AZHB00000000.1	Scaffold	430	33.49	53.60	10,061
<i>C. javanica</i>	SPUL00000000.1	Scaffold	173	34.97	52.50	11,142
<i>B. bassiana</i>	ADAH00000000.1	Scaffold	237	33.6	51.40	10,364

显示二者具有较高的聚类(图 9)。系统发育树(图 10)显示, CHL02 菌株与粗糙虫草菌 RCEF 1005 的遗传距离最近, 其次是爪哇虫草菌和文森虫草菌。

3 讨论

生物信息学和基因组测序的发展, 有利于理解微生物的多样性、进化以及物种间相互作用等(吴明林等, 2018; 吴欢欢等, 2019)。全基因组测序技术已广泛用于动植物病原菌的鉴定与分析, 可在分子水平上系统研究致病菌的遗传进化信息、致病机制和与寄主的互作机制等, 为病原菌的鉴别分类、耐药性的检测、防病策略的制定及疫苗开发提供有价值的参考数据(孙静等, 2019; Yu *et al.*, 2017)。除实验室前期从新疆昌吉地区某养殖场内患病河鲈分离得到的病原菌 *C. confragosa* CHL02 分离株外, 未见其他鱼源 *C. confragosa* 的相关报道。因此, 本研究旨在通过全基因组测序和比较基因组分析, 了解河鲈源 *C. confragosa*

CHL02 菌株的基因组序列信息, 为深入研究其致病机制提供一定的理论基础。

CHL02 菌株基因组测序结果显示, 组装后的基因组大小为 36.17 Mb, 预测到 8093 个编码基因, 有 7724 个匹配到已知功能蛋白, 涉及调控、转运、环境适应和次级代谢活动等。GO 注释表明 CHL02 菌株的蛋白功能主要集中在生物学过程, 参与大量的代谢过程, 以及对自身或外界环境的催化活性, 为蛋白质的分泌过程和功能发挥奠定分子基础。KOG 分类具有局限性, 有很多基因没有在 KOG 里分类或功能未知, 更深层次的基因功能信息还有待进一步研究。KEGG 注释表明, 菌株具有丰富完整的代谢途径, 使生物体不断进行物质和能量交换, 保持它们自身活动需要物质和对外界环境及时做出反应, 增强病原菌的环境适应性。涉及菌株次级代谢产物生物合成的相关基因也比较丰富, 这些基因代谢途径与基因在细胞内发挥的作用有着密切关系。

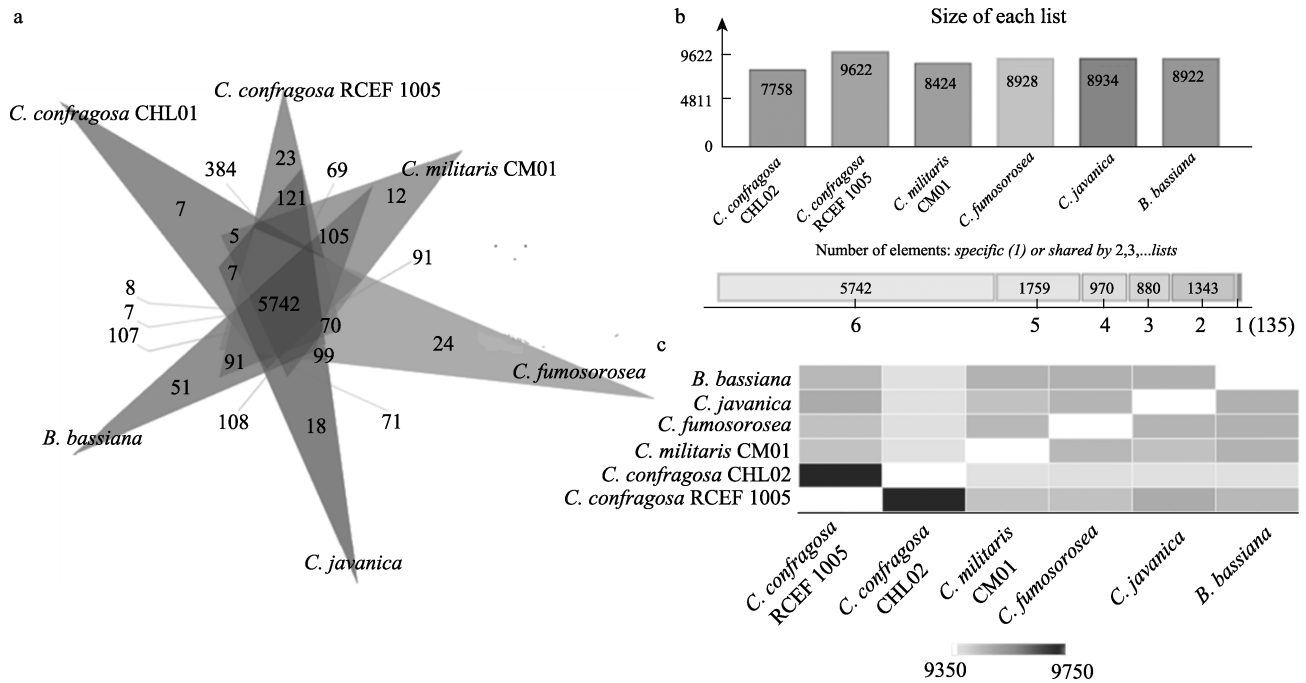


图 9 菌株直系同源聚类分析
Fig.9 Cluster analysis of strains direct homology

a 为菌株间基因集合的韦恩图, b 为各菌株对应的基因数目, c 为成对比较热图

Fig.a is the Venn diagram of gene clusters among strains, Fig.b is the number of gene clusters corresponding to each strain, and Fig.c is the pairwise heatmap

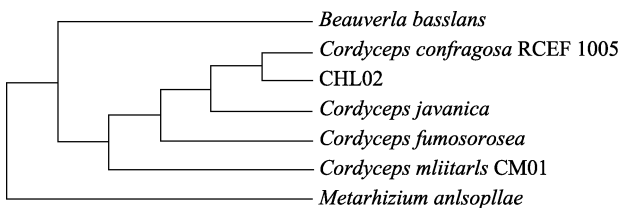


图 10 菌株 CVTree 系统进化分析树
Fig.10 Phylogenetic analysis tree of strain by CVTree

CHL02 菌株的逆转录转座子包含一些常见的转座子亚群 Gypsy、R1、Copia、Jockey、ERV1、Pao 和 DIRS 等, 这些亚群也是真菌中比较丰富的转座子类型(Kempken *et al*, 1998)。DNA 转座子中 Hat、CMC-EnSpm、TcMar 和 MULE-MuDR 在真菌中较为丰富, 而 Maverick、Novosib、PIF-Harb 和 piggyBac 的分布较为罕见, 仅存在于少数真菌类群中, P、Ginger 和 Merlin 转座子也仅在少数物种中被识别(Muszewska *et al*, 2017)。转座子具有影响基因编码能力、破坏基因功能的作用, 对 CHL02 菌株转座子分类注释有助于研究 *C. confragosa* 基因组的大小和进化(Wessler, 2006), 也为发现与其致病性及进化相关基因研究提供了思路(McCue *et al*, 2012)。

CHL02 菌株 CAZymes 基因的分布与蛹虫草不同, 表示虫草属菌不同种在基因组水平上存在进化差

异和环境适应性, 可为进一步研究 CHL02 菌株的遗传和分子机制奠定基础(Zheng *et al*, 2011)。随着水产养殖业越来越多地使用豆粕、各种谷类等植物源性饲料, 鱼类更易受到真菌感染(Matejova *et al*, 2016)。次级代谢产物合成基因簇预测结果显示, 预测的 22 个次级代谢产物合成基因簇涉及多种化合物合成途径, 其中, PKS、NRPS 和 PKS-NRPS 混合代谢途径是大多数真菌毒素合成的关键代谢途径, CHL02 菌株能够合成白僵菌素和镰刀菌素等真菌毒素。KEGG 富集分析中有 868 个基因参与了 CHL02 菌株的萜类和聚酮类化合物的代谢, 而萜类化合物的代谢过程中也会产生多种真菌毒素(Yun *et al*, 2015)。此外, 存在 6 个未知化合物的基因簇, 可为后续发掘未知的具有特殊作用化合物的研究奠定基础。几乎所有与疾病相关的基因都在 KEGG 代谢通路中被注释, 这些基因在病原体与宿主的相互作用中发挥着不同的作用, 如防御机制、复制、重组与修复、信号转导、碳水化合物运输与代谢、无机离子运输与代谢等。CHL02 菌株和其他病原菌一样, 通过释放致病因子(胞外酶、激素和毒素)等来完成对寄主的侵染, 而 CoRAS1 基因、转录因子、泛素蛋白、蛋白磷酸酶、蛋白激酶直接或间接参与致病过程(柳凤等, 2018), 这将有助于进一步研究 CHL02 菌株的发病机制。

Nr 库同源注释发现, CHL02 菌株与粗糙虫草菌 RCEF 1005 具有很高的同源性(91.6%), 基因组直接比较发现, 二者在基因组组装和编码蛋白上具有一定的差异, 这可能是因为相同物种的不同来源分离株的进化和环境适应性不同。同样, 与参考菌株基因组相比, CHL02 菌株的基因组越大, 其包含的遗传信息中涉及代谢相关基因和压力耐受基因的可能性就越大, 这为适应不同的生存环境提供了特有的基因组代谢机制。基因聚类分析和系统发育树均显示, CHL02 菌株与粗糙虫草菌 RCEF 1005 具有很高的同源性, 亲缘关系较近, 但病原宿主互作分析结果显示, CHL02 菌株的致病基因 BbCHIT1、Ops3、Ohmm、Blys2 和 Blys5 同样存在于球孢白僵菌而不是粗糙虫草菌 RCEF 1005, 所涉及的致病机制还有待进一步研究。

综上所述, 本研究通过全基因组测序和比较基因组分析, 初步掌握了河鲈源致病菌 *C. confragosa* CHL02 菌株基因组的整体分布、基因组成、蛋白功能、致病因子和进化地位等, 为后续该菌株侵染河鲈的作用机制和防治等相关研究提供了分子水平上的参考依据。

参 考 文 献

- ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, *et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25–29
- BENSON G. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(2): 573–580
- BESEMER J, LAMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes: Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2607–2618
- CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl 1): D233–D238
- DOUG J, SKILLMAN J, VANDERMEER J. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 2012, 61(1): 89–97
- KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, *et al.* The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(suppl 1): D277–D280
- KEMPKEN F, ULRICH K. Transposons in filamentous fungi: Facts and perspectives. *BioEssays*, 1998, 20(8): 652–659
- KRAMER GJ, NODWELL JR. Chromosome level assembly and secondary metabolite potential of the parasitic fungus *Cordyceps militaris*. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 912
- LAGESEN K, HALLIN P, RØDL E A, *et al.* RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100–3108
- LEE J O, SHRESTHA B, SUNG G H, *et al.* Cultural characteristics and fruiting body production in *Cordyceps bassiana*. *Mycobiology*, 2010, 38(2): 118–121
- LI R Q, LI Y R, KRISTIANSEN K, *et al.* SOAP: Short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713–714
- LI W, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases. *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 77–82
- LIN S H, LIAO Y C. CISA: Contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60843
- LIU F, OU X C, ZHAN R L. Complete genome sequencing of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* XC01 in mango. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(10): 86–94 [柳凤, 欧雄常, 詹儒林. 芒果细菌性角斑病病原菌 XC01 菌株的全基因组测序及序列分析. *果树学报*, 2018, 35(10): 86–94]
- LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955–964
- MARTIN U, RASHMI P, ARATHI R, *et al.* The pathogen-host interactions database (PHI-base): Additions and future developments. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: 645–655
- MATEJOVA I, SVOBODOVA Z, VAKULA J, *et al.* Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, 48(2): 186–200
- MCCUE A D, SLOTKIN R K. Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends in Genetics*, 2012, 28(12): 616–623
- MEDEMA M H, BLIN K, CIMERMANCIC P, *et al.* AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl 2): W339–W346
- MEYLING N V, EILENBERG J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 2007, 43(2): 145–155
- MUSZEWSKA A, STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA M, GINALSKI K. Cut-and-paste transposons in fungi with diverse lifestyles. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(12): 3463–3477
- RANTSIOU K, KATHARIOU S, WINKLER A, *et al.* Next generation microbiological risk assessment opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 287: 3–9
- SAHA S, BRIDGES S, MAGBANUA Z V, *et al.* Empirical comparison of *ab initio* repeat finding programs. *Nucleic*

- Acids Research, 2008, 36(7): 2284–2294
- SHANG Y, XIAO G, PENG Z, *et al.* Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8(5): 1374–1387
- SHRESTHA B, SUNG J M. Notes on cordyceps species collected from the central region of Nepal. *Mycobiology*, 2005, 33(4): 235–239
- STANKE M, DIEKHANS M, BAERTSCH R D. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve *de novo* gene finding. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 637–644
- SUN J, WAN X Y, YANG Q, *et al.* Case studies: Pathogenic agent and microbiome analysis for zoea of *Litopenaeus vannamei* suffering from an unknown disease. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 134–144 [孙静, 万晓媛, 杨倩, 等. 病例研究: 未知病因的凡纳滨对虾溞状幼体的病原和微生物组分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 134–144]
- SUNG G H, HYWEL-JONES N L, SUNG J M, *et al.* Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 2007, 57(1): 5–59
- TATUSOV R L, FEDOROVA N D, JACKSON J D, *et al.* The COG database: An updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4(1): 41–54
- VONGSANGNAK W, RAETHONG N, MUJCHARIYAKUL W, *et al.* Genome-scale metabolic network of *Cordyceps militaris* useful for comparative analysis of entomopathogenic fungi. *Gene*, 2017, 626: 132–139
- WANG H, XU Z, GAO L, *et al.* A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9(1): 195
- WANG Y, COLEMAN-DERR D, CHEN G, *et al.* OrthoVenn: A web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): 78–84
- WEI D M. The research progress on the diversity of fish saprolegniasis pathogens. Master's Thesis of Xinjiang University, 2018, 1–113 [魏冬梅. 新疆鱼类水霉病病原菌多样性研究. 新疆大学硕士研究生学位论文, 2018, 1–113]
- WESSLER S R. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(47): 17600–17601
- WU H H, WANG W J, LÜ D, *et al.* Turbot (*Scophthalmus maximus*) biodiversity assessment using high-throughput Illumina sequencing to analyze juvenile turbot intestines and their bacterial cultures. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 84–94 [吴欢欢, 王伟继, 吕丁, 等. 应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 84–94]
- WU M L, LI H Y, JIANG H, *et al.* Genomic characterization and phylogenetic analysis of grass carp reovirus AH528 strain. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 36–43 [吴明林, 李海洋, 江河, 等. 草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组特征及进化分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 36–43]
- XIA F, ZHOU X, LIU Y, *et al.* Composition and predictive functional analysis of bacterial communities inhabiting Chinese cordyceps insight into conserved core microbiome. *BMC Microbiology*, 2019, 19: 105
- YU Z H, GENG Y, WANG K Y, *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio mimicus* strain SCCF01 with potential application in fish vaccine development. *Virulence*, 2017, 8(6): 1028–1030
- YUN C S, MOTOYAMA T, OSADA H. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nature Communications*, 2015, 6: 8758
- ZHANG C H, DENG W Q, YAN W J, *et al.* Whole genome sequence of an edible and potential medicinal fungus, *Cordyceps guangdongensis*. *G3 Genesgenetics*, 2018, 8(6): 1863–1870
- ZHENG P, XIA Y, XIAO G, *et al.* Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*, 2011, 12(11): R116
- ZIMMERMANN G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pest Management Science*, 1993, 37(4): 375–379

(编辑 冯小花)

Whole-Genome Sequencing and Comparative Genome Analysis of a Pathogenic *Cordyceps confragosa* CHL02 Strain Isolated from *Perca fluviavilis*

ZHANG Yanzhen^{1,2#}, FU Longwei^{1,2#}, SUI Zhihai², WANG Yongxing¹, LIU Yunguo^{2①}

(1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China;

2. College of Life Sciences, Linyi University, Linyi, Shandong 276005, China)

Abstract *Cordyceps confragosa* is an entomopathogenic fungus that was isolated and identified from the disease *Perca fluviavilis*. The anamorphic stage, *Lecanicillium lecanii*, has been widely used as an insect biocontrol agent in agriculture. To date, whole-genome sequencing of *C. confragosa* isolated from fish has never been reported. This study used the Illumina PE150 sequencing platform to whole-genome sequence CHL02 strain, and the sequencing data were assembled and analyzed by the corresponding software. Gene prediction and functional annotation were conducted, secondary metabolite synthesis gene clusters were predicted, and pathogen-host interactions and comparative genomic analyses were performed. The sequencing results showed that the CHL02 genome is 36.17 Mb with a GC content of 53.09%. There were 8093 identified genes, 1618 TEs (Transposable elements), 4572 tandem repeats, and 114 transfer RNAs (tRNAs). A total of 7724 genes were annotated, 1985 of which were obtained by KOG annotation, and 2687 genes were involved in metabolic processes in the Gene Ontology (GO) cluster analysis. Twenty-two secondary metabolite synthesis gene clusters were predicted, and 1162 genes were involved in the pathogen-host interaction mechanisms. Gene cluster analysis and the phylogenetic tree showed high homology with the reference strain *C. confragosa* RCEF 1005 of insect origin. This study, for the first time, reported the whole genome sequencing and comparative analysis of *C. confragosa* CHL02 isolated from *P. fluviavilis*. These results provide an important theoretical foundation for further research into the mechanisms of perch pathogen infections.

Key words *Cordyceps confragosa*; Whole-genome sequencing; Gene annotation; Comparative genomics

① Corresponding author: LIU Yunguo, E-mail: yguoliu@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200113002

http://www.yykxjz.cn/

李晓东, 曾宥维, 冷晓飞, 张明付, 李新正, 逢少军. 辽宁大连裙带菜虫害生物调查及其系统发育分析. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 145-157

LI X D, ZENG Y W, LENG X F, ZHANG M F, LI X Z, PANG S J. Phylogenetic analysis of algal pests of the economic alga *Undaria pinnatifida* in the farming region of Dalian. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 145-157

辽宁大连裙带菜虫害生物调查及其系统发育分析*

李晓东^{1,2,3,4,5} 曾宥维^{1,3,4,5} 冷晓飞⁶ 张明付⁶
李新正^{1,3,4,5} 逢少军^{1,2,3,4}

- (1. 中国科学院海洋研究所 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东 青岛 266071; 4. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266071; 5. 中国科学院大学 北京 100049; 6. 大连海宝渔业有限公司 辽宁 大连 116045)

摘要 2019年10月下旬,辽宁省大连市裙带菜(*Undaria pinnatifida*)遭受大面积虫害,受灾面积不少于15.36 hm²。本研究通过现场调查和形态学鉴定,确定了虫害为丹氏麦杆虫(*Caprella danilevskii* Czerniavski, 1868)为代表的麦杆虫属(*Caprella* spp.)动物暴发生长导致。麦杆虫常见污损于养殖海藻和海水养殖设备上,近年来对我国福建地区的羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)养殖业、山东地区的龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)养殖业造成了巨大损失,而我国渤海养殖海区此前未见遭受麦杆虫虫害的严重影响的报道。本研究讨论了气候变暖和漂浮铜藻(*Sargassum horneri*)在此次虫害暴发中起到的作用,并首次描述了我国同一海区采集到的不同麦杆虫属物种的形态学特征。生产上建议将碳酸氢铵(NH₄HCO₃, 俗称“碳铵”)制作为传统“挂袋肥”的方式悬挂在养殖筏架上,能够驱散、杀死麦杆虫并提供藻类生长所需的氮元素。采用贝叶斯法基于线粒体DNA细胞色素氧化酶亚基I(*CO I*)基因片段构建了麦杆虫属物种的系统发育树。序列分析显示,该*CO I*基因片段长度为479 bp, AT含量为63%, 转换/颠换偏倚率*R*值为1.130, 序列未发生缺失或插入现象; 种间遗传距离平均值为0.231(0.210~0.279), 种内遗传距离平均值为0.014(0~0.030)。本研究表明,线粒体*CO I*基因序列具有适宜的变异信息,种内保守、种间存在差异,适用于麦杆虫属的物种识别,并为开发麦杆虫属DNA条形码技术奠定了基础。

关键词 裙带菜; 麦杆虫; 污损生物; 害虫; 线粒体*CO I*基因

中图分类号 S968.42+3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0145-13

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)是在亚洲国家常见的大型食用褐藻。在我国,裙带菜作为出口导向型产品在辽东半岛和山东半岛广泛种植。裙带菜的叶片及孢子囊叶几乎全部出口日本,柄部深加工产品深受国

* 财政部和农业农村部: 现代农业产业技术体系、国家科技支撑计划课题(2015BAD13B05)、山东省泰山学者特聘专家计划、中国科学院海洋研究所汇泉学者计划、国家自然科学基金项目(41876178)和中国科学院战略性先导科技专项(A类)子课题(XDA23050304)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA, National Key Technology Support Program (2015BAD13B05), Taishan Scholar Program of Shandong Province, Huiquan Scholar Program of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, National Natural Science Foundation of China (41876178), and Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA23050304)]. 李晓东, E-mail: xdli@qdio.ac.cn

① 通讯作者: 李新正, 研究员, E-mail: lixzh@qdio.ac.cn; 逢少军, 研究员, E-mail: sjpang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2020-01-13, 收修修改稿日期: 2020-03-18

内市场喜爱,近10年来,内销产值不断攀升,目前已占裙带菜总产值的50%。根据2019年中国渔业统计年鉴报道,辽宁省年产裙带菜115,725 t,占我国总产量的65.9%,是我国裙带菜生产第一大省(农业农村部渔业渔政管理局等,2019)。

辽宁省大连市旅顺口区柏岚子海域和黄金山海域是我国仅有的2个裙带菜新品种“海宝1号”和“海宝2号”的主产区,也是我国传统的裙带菜养殖区(Shan *et al.*, 2016; 许淑芬等, 2015)。每年10月下旬,裙带菜全人工育苗的幼苗开始由海上暂养阶段进入海上养殖阶段。2019年11月1日,据国家藻类体系大连综合试验站报导,柏岚子海域下海养殖的裙带菜出现大面积脱苗,部分养殖区受灾严重,苗绳上裙带菜幼苗几乎不可见,且养殖设施上发现大量节肢动物聚集。

节肢动物门(Arthropoda)中的端足目(Amphipoda)生物如麦杆虫(*Caprella* spp.)、藻钩虾(*Ampithoe* spp.)等均为海藻养殖中常见的污损生物,2019年之前未见污损生物对旅顺地区的裙带菜养殖造成严重影响的报道。随着气候变暖、海水温度上升和沿海工业、海水养殖业的迅猛发展(吕兑安等, 2019; 柳春福, 2019; 胡婉彬等, 2015),养殖生态环境正发生巨大变化,外来物种入侵和铜藻(*Sargassum horneri*)金潮等

生态灾害对我国的海藻养殖业造成了严重的经济损失(Gonzalez *et al.*, 2011; 苏丽, 2018; 吕芳等, 2018),我国裙带菜养殖业正面临着前所未有的挑战。本研究通过对受灾海域实地调查,采集虫害样品并结合形态学鉴定和分子生物学手段,探究造成本次灾害的主要原因,并提出相应的解决方案。

1 材料与方法

1.1 调查地点及受灾概况

虫害受灾海区位于辽宁省大连市旅顺口区。实验共设立3个采样站点,分布如图1所示。旅顺口区柏岚子海域设立2个采样地点:受灾严重的养殖三队海区;与三队相隔20 m 航道未受灾的养殖二队海区。在距离养殖三队3 km 的黄金山海域未受灾的养殖一队海区设立第3个采样点。

此次养殖三队受灾裙带菜共16,000 绳,受灾面积达15.36 hm²。

养殖三队裙带菜夹苗下海时间为2019年10月25~27日;初次发现海上裙带菜异常脱苗时间为10月28日;至11月1日发现裙带菜苗已经全部脱光,同时开始裙带苗补种工作;11月4日现场调查发现补种裙带苗状态正常。

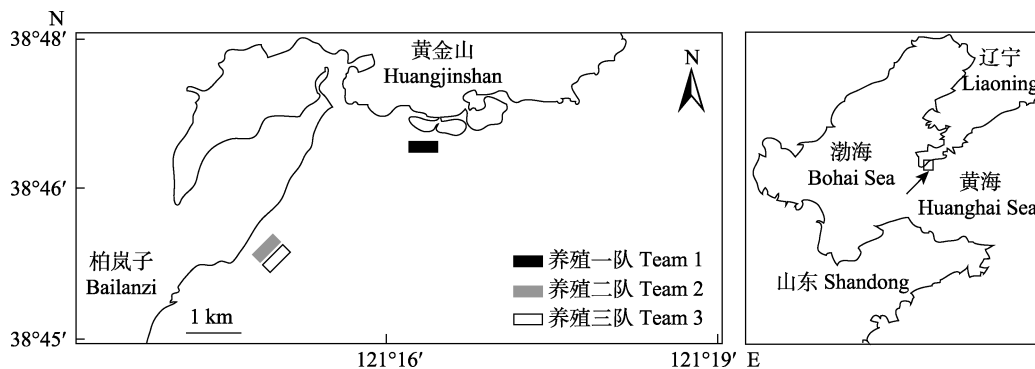


图1 采样站点分布

Fig.1 Location of sampling stations

1.2 调查方法

2019年11月2日—5日,在设立的3处采样站点进行污损生物的采集和现场调查,详细调查养殖裙带菜的受害情况,记录危害状况、发生地点、危害程度,拍摄污损生物图片。每个采样站点随机选取3处取样,将长度为5 cm的苗绳上附着的所有害虫标本带回计数。虫害鉴定依据成虫形态特征,辅助分子标记手段。对采集到的活体样本带回实验室进行养殖培养实验。虫害危害程度依据田间病虫发生实地估测

法,根据单位长度苗绳上采集到的害虫数量分别以轻度(0只/cm<计数<1只/cm)、中度(1只/cm≤计数≤5只/cm)和重度(计数>5只/cm)记录,分别以“+”、“++”、“+++”符号表示。

1.3 虫害生物基因组提取和CO I基因的扩增

从完成形态学分类的所有麦杆虫采集样本中,选择具有形态代表性的个体及形态学鉴定特征不明显的个体共12只,采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取基因组

DNA。使用麦杆虫属专用 *CO I* 基因扩增引物 (Cabezas *et al*, 2013) 对上述 DNA 分别进行 PCR 扩增: 上下游引物分别为 Cp_ *CO I* F2 (5'-GGAGATGAYCA AATTTATAATG-3') 和 Cp_ *CO I* R1 (5'-AATATAYACT TCTGGRTGACC-3')。使用 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶 (宝日医生物技术有限公司, 北京) 进行 PCR 反应: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 48℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 40 次; 最后, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测确认扩增成功后, 将产物原液送交北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

1.4 测序数据处理与系统发育分析

使用 MEGA-X (Kumar *et al*, 2018) 对得到的序列进行校正, 计算 *CO I* 基因片段的碱基含量、种间和种内 Kimura2-paramter 遗传距离、保守位点 (conserved sites, C)、变异位点 (variable sites, V)、简约信息位点 (parsimony informative sites, Pi) 和单突变位点 (singleton sites, S), 分析碱基组成及转换颠换率。将获得的 *CO I* 基因序列在 NCBI 上通过 BLAST (Johnson *et al*, 2008) 进行同源性比对分析, 从检索到的麦杆虫属不同种中分别选择同源性最高的 2 条核苷酸序列下载, 共下载包含 *Caprella acanthifera* 和 *Caprella linearis* 等在内的 36 条序列, 使用 MEGA-X 软件进行多重比对分析和手工校正。核苷酸序列的最佳碱基替换模型使用 jModelTest (Darriba *et al*, 2012) 进行计算。选择麦杆虫总科 (Caprelloidea) 的 *Dulichia falcata* 作为外群, 使用贝叶斯法通过 MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck *et al*, 2001) 软件构建系统发育树。测序所得 *CO I* 基因序列上传至 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

2 结果与分析

2.1 裙带菜苗种来源

黄金山养殖场暂养了来自大连海宝渔业有限公司苗场的裙带菜品种“家系”(以下简称 cultivar1), 于 2019 年 10 月 24 日交付养殖一队和养殖二队在各自海域进行养殖。同时期, 养殖三队受灾裙带菜苗种来自金石滩某育苗场, 品种为“海宝 1 号”(以下简称 HB1) 和某未知种裙带菜品种(以下简称 cultivar2)。上述裙带菜苗由金石滩运输至黄金山养殖场进行下海暂养。2019 年 10 月 24 日, HB1 和部分 cultivar2 裙带菜交付养殖三队, 剩余 HB1 交付养殖一队。

2.2 现场调查结果

养殖一队海域(黄金山): HB1 于 10 月 24 日夹苗,

生长状态良好, 有轻微脱苗现象; cultivar2 养殖区裙带菜正常生长, 状态好于 HB1; 2 个养殖区苗绳上同样发现节肢动物附着, 平均密度为 5.8 只/cm。该养殖海区裙带菜筏架未发现漂浮铜藻。

养殖二队海域(柏岚子): cultivar1 于 10 月 25 日夹苗, 生长状态良好; 裙带菜苗绳上同样发现节肢动物存在, 密度为 6.0 只/cm。漂浮铜藻内同样发现大量节肢动物, 平均密度为 6.0 只/cm。

养殖三队海域(柏岚子): HB1 养殖区, 每根养殖绳上仍有少量 10 月 25 日下海的裙带菜小苗存活生长 (<30%), 个体较大(8~10 cm); cultivar2 养殖区大苗全部脱落; 2 个养殖区养殖绳上均发现大量节肢动物聚集, 平均密度为 8.0 只/cm。在养殖海区发现大量漂浮铜藻缠绕在养殖筏上, 铜藻内发现大量节肢动物, 平均密度为 9.6 只/cm。

3 处调查海域近年开始出现少量的节肢动物聚集生长现象, 但未对裙带菜生长造成影响, 且历年裙带菜苗下海时期未观察到节肢动物暴发生长的现象。

2.3 虫害生物种类及危害程度

本次调查共获得标本 663 个, 其中, 在一队、二队和三队养殖苗绳中分别采集 139、60 和 290 个, 二队和三队漂浮铜藻中分别采集 131 和 43 个, 分属 2 目 3 科 12 种(任先秋等, 2016)。其中 7 种鉴定到种, 分别为丹氏麦杆虫 (*Caprella danilevskii* Czerniavski, 1868)、尖额麦杆虫 (*Caprella penantis* Leach, 1814)、多棘麦杆虫 (*Caprella acanthogaster* Mayer, 1890)、长颈麦杆虫 (*Caprella equilibra* Say, 1818)、背棘麦杆虫 (*Caprella scaura* Templeton, 1836)、强壮藻钩虾 (*Ampithoe valida*) 和理石叶钩虾 (*Jassa marmorata* Holmes, 1905); 1 种鉴定到属, 麦杆虫一种 (*Caprella* sp.1); 另有 4 种鉴定到科, 其中, 钩虾科 (Gammaridae) 3 种, 团水虱科 (Sphaeromatidae) 1 种。此次采集的标本中, 团水虱为等足目 (Isopoda), 其余均为端足目 (Amphipoda)。麦杆虫属物种显微照片如图 2 所示。

上述鉴定到的物种中, 在三队养殖海区及漂浮铜藻中观察到重度发生 1 种, 为丹氏麦杆虫; 中度发生 3 种, 分别是尖额麦杆虫(于养殖三队采集统计)、麦杆虫一种(于漂浮铜藻采集统计)、理石叶钩虾(于养殖一队、二队采集统计); 其他虫害均为轻度发生(表 1)。实验室培养中发现, 麦杆虫能以裙带菜幼苗为唯一食物来源进行正常的生长和产卵繁殖, 推断以丹氏麦杆虫为代表的麦杆虫属动物暴发生长和啃食是造成此次虫害的主要原因。

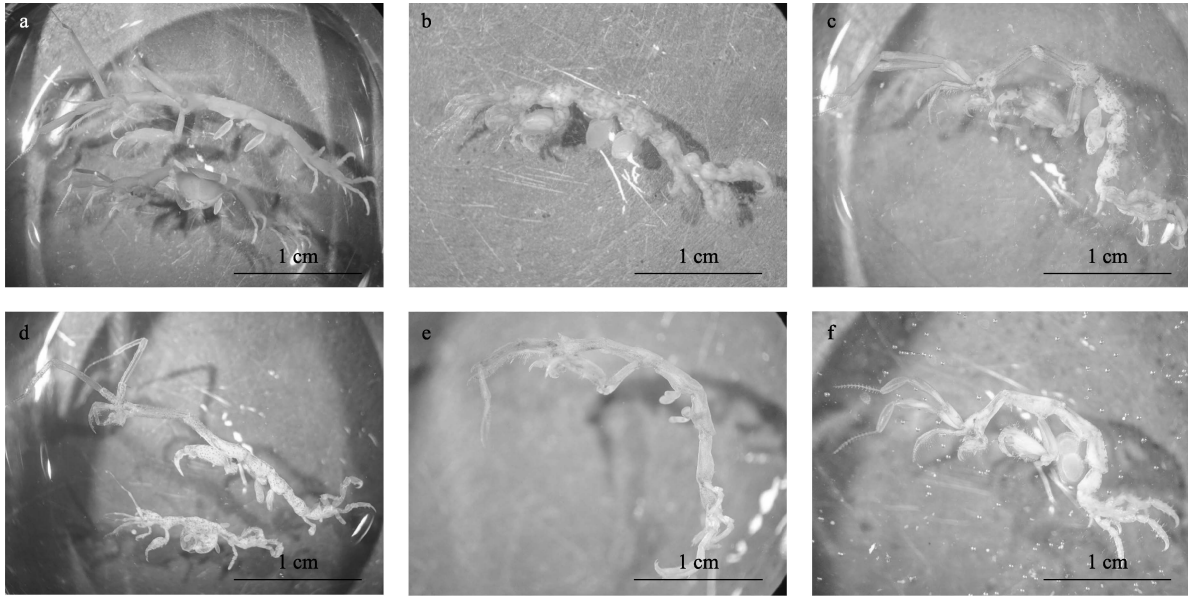


图 2 麦杆虫属物种显微照片

Fig.2 Microscopic pictures of *Caprella* spp.

a: 丹氏麦杆虫; b: 尖额麦杆虫; c: 多棘麦杆虫; d: 长颈麦杆虫; e: 背棘麦杆虫; f: 麦杆虫一种
 a: *C. danilevskii* Czerniavski, 1868; b: *C. penantis* Leach, 1814; c: *C. acanthogaster* Mayer, 1890;
 d: *C. equilibra* Say, 1818; e: *C. scaura* Templeton, 1836; f: *Caprella* sp.1

表 1 辽宁裙带菜养殖区采集点污损生物名录

Tab.1 List of fouling organisms of sampling sites in the *U. pinnatifida* farms, Liaoning Province, China

序号 No.	种类 Species	养殖一队 Team 1	养殖二队 Team 2	二队铜藻 Floating <i>S. horneri</i> in Team 2	养殖三队 Team3	三队铜藻 Floating <i>S. horneri</i> in Team 3
1	丹氏麦杆虫 <i>C. danilevskii</i> Czerniavski, 1868	++	+	+++	+++	+++
2	尖额麦杆虫 <i>C. penantis</i> Leach, 1814	-	+	+	++	-
3	多棘麦杆虫 <i>C. acanthogaster</i> Mayer, 1890	+	+	-	+	+
4	长颈麦杆虫 <i>C. equilibra</i> Say, 1818	-	-	-	-	+
5	背棘麦杆虫 <i>C. scaura</i> Templeton, 1836	-	-	-	+	-
6	麦杆虫一种 <i>Caprella</i> sp.1	-	-	++	-	++
7	强壮藻钩虾 <i>A. valida</i>	-	-	+	+	+
8	理石叶钩虾 <i>J. marmorata</i> Holmes, 1905	++	++	-	+	-
9	钩虾 1 Gammaridae sp.1	-	+	-	+	-
10	钩虾 2 Gammaridae sp.2	+	-	-	-	-
11	钩虾 3 Gammaridae sp.3	+	-	-	-	-
12	团水虱一种 Sphaeromatidae sp.1	+	+	-	-	-

注: -: 未观察到; +: 轻度(0 只/cm<计数<1 只/cm); ++: 中度(1 只/cm≤计数≤5 只/cm); +++: 重度(计数>5 只/cm)

Note: -: Absent; +: Mild (0 < count number < 1 ind./cm); ++: Moderate (1 ≤ count number ≤ 5 ind./cm); +++: Severe (count number > 5 ind./cm)

2.4 麦杆虫属物种形态特征描述

本研究采集的麦杆虫属物种标本主要鉴别特征描述如下:

丹氏麦杆虫身体细长, 雄性体长可达 17 mm 以上, 雌性体长可达 10 mm 以上, 采集样本的体色呈深红色至深棕色。无明显额角。鳃为长卵形。第 5~7 胸足掌节没有抓捕刺(图 3a)。雄性腹部明显, 且第 2 鳃足指节较短(Guerra-García *et al*, 2002、2004)。

尖额麦杆虫体型粗壮, 雄性体长可达 11 mm 以上, 雌性体长可达 6 mm 以上, 采集样本的体色呈紫红色或密布橘红色花纹。头部前端有粗壮明显的额角。第 1 触角柄的第 1、第 2 节较细(雄性第 1 触角柄的第 1 节有时较粗壮)。第 2 鳃足掌节的毒牙位于近端。第 3、第 4 胸节侧甲十分发达(图 3c)。鳃呈卵圆形略延长。第 5~7 胸足掌节未膨大, 抓捕刺位于近端。在全球范围内均有报道发现(Cabezas *et al*, 2013; Guerra-García *et al*, 2004、2006; Masunari *et al*, 2006; Rueckert *et al*, 2011)。

多棘麦杆虫采集样本的体色呈粉红或浅黄色, 胸节及鳃足多具有红色或橘红色斑点。雄性第 1、第 2

胸节较长。第 1、第 2 胸节及第 2 鳃足密布绒毛。第 2~7 胸节上有许多小棘。第 5~7 胸足掌节有抓捕刺(图 3b、图 3d)。鳃呈长卵形。多棘麦杆虫是我国海藻养殖业常见的污损生物(曹善茂等, 2013; 魏龔伟, 2014)。

长颈麦杆虫身体细长, 雄性体长可达 12 mm 以上, 雌性体长可达 7 mm 以上, 采集样本的体色呈浅黄至半透明, 带有深色斑点。前额略呈角状。雄性第 1、第 2 胸节较长。第 2 胸节腹侧第 2 鳃足之间有一个明显的尖椎状突起(图 3e), 第 2 鳃足基部前缘亦各有 1 个小齿。第 2 鳃足腕节腹面突出 1 个齿, 掌节宽大。鳃为长卵形。第 5~7 胸足掌节有 2 对抓捕刺(Guerra-García *et al*, 2004)。

背棘麦杆虫体色不明。头部顶端有 1 个尖锐额角。鳃为长条形。第 5~7 胸足掌节有抓捕刺。此次采集中仅发现 1 只(Guerra-García *et al*, 2004)。

麦杆虫一种雄性体长可达 11 mm 以上, 雌性体长可达 5 mm 以上, 体色呈粉色或淡黄色半透明且带有红色或橘红色斑点。胸节光滑。雄性第 2 鳃足掌节密布刚毛, 毒牙强而锐利, 位于腹侧中部。鳃大而圆(图 3f)。在铜藻中中度发生, 数量仅次于镇氏麦杆虫。通过形态学观察未能鉴定到具体种。

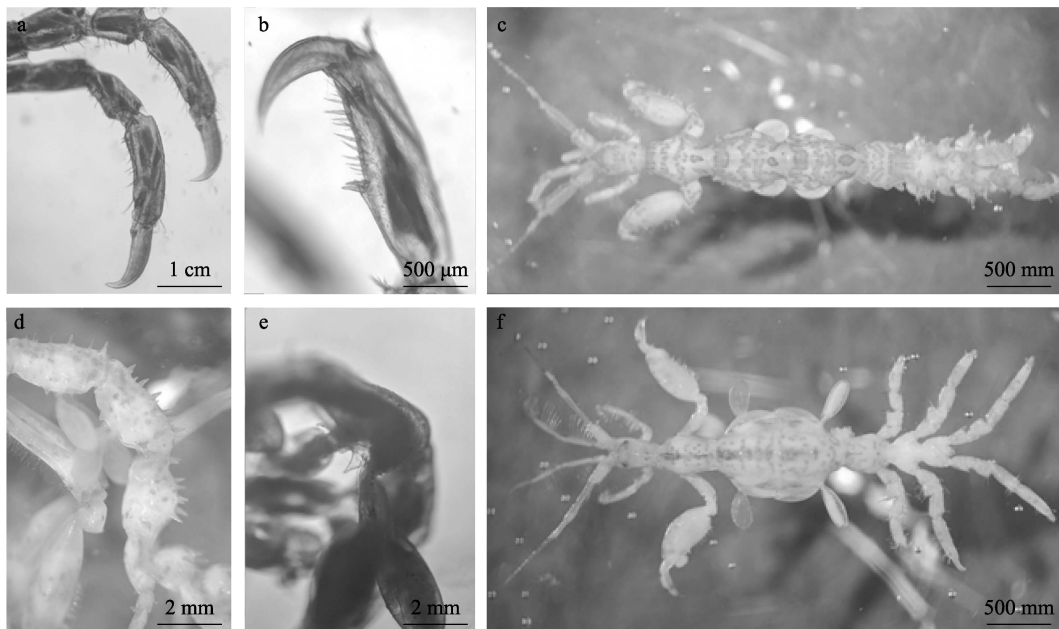


图 3 几种麦杆虫的形态特征

Fig.3 Morphological features of *Caprella* spp.

- a: 丹氏麦杆虫; b、d: 多棘麦杆虫; c: 尖额麦杆虫; e: 背棘麦杆虫; f: 麦杆虫一种
 a: *C. danilevskii* Czerniavski, 1868; b, d: *C. acanthogaster* Mayer, 1890;
 c: *C. penantis* Leach, 1814; e: *C. scaura* Templeton, 1836; f: *Caprella* sp.1

2.5 CO I 基因序列分析

以 12 只麦杆虫的基因组 DNA 为模板, 分别进行

CO I 基因的扩增, 校正后序列长度为 479 bp, BLAST 比对证实为线粒体 CO I 基因。未检测到缺失或插入

现象,保守位点共300个,变异位点共179个,简约信息位点共136个,单突变位点共43个。各碱基平均含量分别为T(38%)、C(19%)、A(25%)和G(18%)。

12只麦秆虫 *CO I* 基因的碱基颠换率[sv/(si+sv)]为46.914%, 低于转换率[si/(si+sv)] (53.086%), 转换/颠换偏倚率 *R* 值为1.130。碱基的转换以TC为主(66.667%), AG间的转换为33.333%。颠换主要发生在TA间(57.895%), TG、CA和CG分别占颠换总数的18.421%、18.421%和5.263% (表2)。

2.6 种间和种内的遗传关系

基于Kimura2-parameter模型分析12只麦秆虫的 *CO I* 基因,计算种间及种内的遗传距离,结果见表3。由表3可知,种间遗传距离平均值为0.231,其中,丹氏麦秆虫与长颈麦秆虫的遗传距离最小,为0.210;尖额麦秆虫与麦秆虫一种的遗传距离最大,为0.279。种内遗传距离平均值为0.014,介于0~0.030之间。

2.7 系统发育分析

采用BI法构建基于 *CO I* 基因(表4)的系统进化树,系统发生分析使用的核苷酸最佳模型为GTR+I+G,结果如图4所示。麦秆虫属的所有物种聚为一支,与外群分开,并分化为2大支,第1支由 *Caprella acanthifera* 和 *C. linearis* 聚为1个单元,其余物种组成第2支位于系统树基部的位点。本研究由3个采集点收集的丹氏麦秆虫聚为一支, *Caprella danilevskii* MK7642641与 *C. verrucosa* 亲缘关系最近,聚为一支, *Caprella danilevskii* KX2240021单独为一支,三者互为姐妹群。GenBank收录的尖额麦秆虫聚为一支,与本研究采集的尖额麦秆虫分开,且支持率为0.900。多棘麦秆虫与 *C. mutica* 亲缘关系最近,聚为一支。麦秆虫一种聚为一支,位于系统树的基部。除上述物种外,其余实验采集样品可很好地与NCBI检索到的同种麦秆虫聚为一支,且支持率均 ≥ 0.87 。

表2 麦秆虫属物种 *CO I* 基因片段碱基替换
Tab.2 Base substitution in *CO I* genes of *Caprella* spp.

密码子位点 Codon site	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG	总数 Total
平均频率 Average frequency	398	43	38	1.13	153	28	22	7	71	7	2	99	14	74	479
第1位点 The first position	145	13	2	8.1	31	10	0	0	24	0	0	47	2	43	160
第2位点 The second position	158	1	1	0.74	73	1	0	0	39	0	0	18	0	28	160
第3位点 The third position	95	29	35	0.81	49	17	21	7	9	6	2	34	11	4	159

注: ii: 一致序列; si: 转换数; sv: 颠换数; R: si/sv; TT: 一致碱基T; TC: TC间转换; TA: TA间颠换; TG: TG间颠换; CC: 一致碱基C; CA: CA间颠换; CG: CG间颠换; AA: 一致碱基A; AG: AG间转换; GG: 一致碱基G

Note: ii: Identical pairs; si: Transition; sv: Transversion; R: si/sv; TT: Identical base T; TC: TC transition; TA: TA transversion; TG: TG transversion; CC: Identical base C; CA: CA transversion; CG: CG transversion; AA: Identical base A; AG: AG transition; GG: Identical base G

表3 麦秆虫属物种的种间和种内遗传距离
Tab.3 The interspecific and intraspecific genetic distance of the *CO I* gene in *Caprella* spp.

物种 Species	丹氏麦秆虫 <i>C. danilevskii</i>	麦秆虫一种 <i>C. sp.1</i>	长颈麦秆虫 <i>C. equilibra</i>	背脊麦秆虫 <i>C. scaura</i>	尖额麦秆虫 <i>C. penantis</i>	种内遗传距离 Intraspecies genetic distance
丹氏麦秆虫 <i>C. danilevskii</i>						0.013
麦秆虫一种 <i>C. sp.1</i>	0.232					0.000
长颈麦秆虫 <i>C. equilibra</i>	0.210	0.212				0.020
背脊麦秆虫 <i>C. scaura</i>	0.227	0.242	0.226			n/c
尖额麦秆虫 <i>C. penantis</i>	0.228	0.279	0.259	0.235		n/c
多棘麦秆虫 <i>C. acanthogaster</i>	0.246	0.218	0.266	0.212	0.269	n/c

表4 本研究获得的序列
Tab.4 List of sequences obtained in this study

物种 Species	样品编号 ID of specimen	注册号 GenBank accession number
多棘麦秆虫 <i>C. acanthogaster</i>	DLCA7	MT151835
丹氏麦秆虫 <i>C. danilevskii</i>	DLCD2(Team3-1)	MT151836
	DLCD3(Team2-1)	MT151837
	DLCD13(Team1-1)	MT151838
	DLCD16(Team3-2)	MT151839
长颈麦秆虫 <i>C. equilibra</i>	DLCE11(1)	MT151840
	DLCE22(2)	MT151841
	DLCE23(3)	MT151842
尖额麦秆虫 <i>C. penantis</i>	DLCP18	MT151843
背脊麦秆虫 <i>C. scaura</i>	DLCS31	MT151844
麦秆虫一种 <i>Caprella</i> sp.1	DLCS10(1)	MT151845
	DLCS21(2)	MT151846

3 讨论

3.1 麦秆虫属基础生态学研究

麦秆虫属(*Caprella*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳亚门(Crustacea)、软甲纲(Malacostraca)、囊虾总目(Peracarida)、端足目(Amphipoda)、麦秆虫总科(Caprelloidea)。在温度为 2℃~28℃、盐度高于 19 的环境中均可生存,是海水养殖设施上的常见种类,以海藻或浮游动植物为食,为常见小型污损生物。麦秆虫繁殖力强,生殖周期短(一代可产卵 4~6 次,平均间隔 20 d),能连续世代繁殖。其胚胎发育时间一般为 5~8 d,性成熟时间为 15~20 d(在 14℃~18℃范围内,发育及性成熟时间随温度升高而缩短)。麦秆虫摄食率随温度升高而逐渐增加,当温度高于 18℃时,摄食率随温度升高而下降,在温度为 14℃~20℃内均有较高的摄食率(Takeuchi *et al.*, 1991; 魏龔伟, 2014)。

麦秆虫与藻类养殖之间存在着脆弱的平衡关系。近年来,随着海水养殖规模的不断扩增及沿海工业化的迅猛发展,海水富营养化加剧,我国原有自然藻场的生态环境遭到不同程度的破坏。裙带菜等大型海藻作为海洋生态系统的初级生产者,同时也是环境自我修复的重要一环。大型海藻为端足目动物提供了栖息地和庇护所,同时,藻体上的附生生物群落(epiphyte)也为其提供了大量的食物;而端足类动物的摄食作用能够清除遮挡在海藻表面的遮蔽物,减少附生植物对光和营养盐的竞争,从而促进大型海藻的生长(Brawley *et al.*, 1987; Duffy, 1990; 郑新庆, 2008)。对枸杞岛岩礁生境的调查发现,褐菖鲈(*Sebastes marmoratus*)、斑头鱼(*Agrammus agrammus*)、大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)等以麦秆虫为主食的狭食

性鱼类是麦秆虫在自然界中的常见天敌(王凯等, 2012),沿海养殖水体单一的养殖模式对自然藻场原有的生态平衡造成了一定程度的破坏,压缩了鱼类等麦秆虫天敌的生存空间。

蒋日进等(2015)在对烟台近海海域典型污损生物调查中发现,麦秆虫的食物来源主要是附生微藻、底栖微藻及颗粒有机物等。在钩虾和麦秆虫的同位素研究中,钩虾稳定同位素值与大型海藻稳定同位素值更为接近,麦秆虫稳定同位素值与浮游植物更为接近,二者在对海藻食用层面的利用存在差异,说明钩虾主要以大型海藻作为其栖息场所及营养来源,而麦秆虫则主要以大型海藻作为其栖息场所(刘书荣等, 2018)。研究表明,藻钩虾和麦秆虫能够明显抑制马尾藻上附生植物的生长(郑新庆, 2008); Brawley 等(1987)在青岛沿岸开放性海藻养殖场中引入不规则麦秆虫(*Caprella irregularis*)和雷氏藻钩虾(*Ampithoe lacertosa*),研究发现,二者能有效抑制附生植物在江蓠(*Gracilaria asiatica*)上的大量生长。端足类、宿主海藻、附生藻类相互作用,啃食者对附生藻类的摄食偏好使大型海藻在竞争中得到解放并获得生长优势。

然而,端足类生物一旦密度过高或可选择的食物有限,也会大量啃食宿主海藻,甚至对藻场造成毁灭性的破坏(郑新庆, 2008)。2012 年夏季,在山东荣成桑沟湾龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)养殖区,多种麦秆虫大量栖居在龙须菜枝条上并啃食龙须菜,使龙须菜出现负生长,给养殖产业造成巨大损失(魏龔伟, 2014)。麦秆虫和藻钩虾是硃洲马尾藻幼苗海区培育的主要危害,它们会摄食藻苗枝叶,当数量大时会造成幼苗残缺,影响幼苗生长发育,严重时甚至导致人工育苗失败。麦秆虫还常挂于藻苗分枝上,当其大

麦秆虫等端足类动物提供了稳定的栖息地。麦秆虫常见于我国北方牡蛎、扇贝、贻贝养殖设施上,该生态环境中大量的贝类排泄物可能是麦秆虫的食物来源之一;麦秆虫的大量繁殖会影响养殖网袋中海水与外界的交流,也易造成缺氧等问题(曹善茂等,2013)。

直到近年来,才开始频繁在旅顺地区海上养殖中观察到麦秆虫,其在一定密度范围内会优先啃食附生在大型海藻上的微藻(Brawley *et al*, 1987; 郑新庆, 2008),直至本次虫害暴发前,未对裙带菜的正常养殖造成危害,故附生在裙带菜养殖设施上的麦秆虫未得到重视。20世纪80年代,李传燕等(1982)对旅顺海区附着生物进行了调查,冬季低温月份几乎没有发现生物附着,在统计全年调查结果时仅发现1只长颈麦秆虫,出现频率为0.002%。麦秆虫的游泳能力弱,只能依靠海藻被动扩散,且附着性海藻物种可以为其提供栖息场所(陈义华等,2019)。

本调查发现,大量铜藻缠绕在养殖筏架上,其中附生大量虫害生物。铜藻是一种常见的潮下带大型褐藻,是西北太平洋特有的一种大型褐藻,在我国南北方沿海较常见,藻体由固着器、主干、侧枝、叶片、气囊和生殖托构成;其幼苗阶段固着生长在岩石上或低潮带石沼中,成体阶段通过发达的气囊可实现漂浮生长和远距离迁移(Su *et al*, 2018)。推测此次导致虫害的麦秆虫可能由漂浮铜藻携带而来。

3.2 导致虫害暴发的因素

根据水温记录,2019年10月25日—11月1日,平均水温为16.37℃,最高水温为17.24℃(10月25日,11:49:05),最低水温为15.61℃(2019年11月1日,19:52:01);2018年同期,平均水温为15.77℃,最高水温为16.60℃(2018年10月25日,15:23:11),最低水温为14.93℃(2018年10月31日,03:25:23)。水温均呈逐渐下降趋势。2019年水温明显高于去年同期,且满足麦秆虫摄食、繁殖的最佳水温要求(魏龔伟,2014)。

裙带菜幼苗下海养殖时的藻体长度为1~3 cm,藻体脆弱,在实验室培养发现,麦秆虫能以裙带菜幼苗为唯一食物来源进行正常的生长和产卵繁殖。三队裙带菜从第1天夹苗(10月25日)到虫害暴发全部被啃食殆尽(11月1日)共144 h,不满足麦秆虫爆发性繁殖、生长所需时间(Takeuchi *et al*, 1991);3个养殖队养殖的裙带菜均在黄金山海区进行统一暂养,其中cultivar1裙带菜在二队可正常生长,HB1裙带菜在一队养殖区可正常生长,而三队养殖区的HB1(受灾比例70%)和cultivar2(受灾比例100%)均受灾严重。因

此,造成本次虫灾的大量麦秆虫来源不是苗种上附着的,而是本身存在于柏岚子三队养殖海区,推测漂浮铜藻为麦秆虫的传播提供了栖息地和食物来源。目前,裙带菜抗虫害原理研究尚属空白。养殖观察发现,麦秆虫的啃食对藻体较大的裙带菜影响较小,推测不同品种的抗虫害能力强弱与生长速度存在一定关系,下海前期生长速度较快的品种抗虫害能力更强。

二队与三队养殖海区近,相隔20 m,具有相似的水文环境,但此次并未受到虫灾影响,推测原因如下:麦秆虫本身的游泳能力弱,需要借助铜藻等漂浮藻类进行传播(陈义华等,2019),而铜藻又是一种具有食用价值的经济藻类,二队养殖工人会定期从海上打捞漂浮铜藻,一定程度上阻断了麦秆虫的传播途径。

综上所述,大量的漂浮铜藻为麦秆虫提供了栖息生长和繁殖的场所,当温度适宜且有充足适宜的食物来源时,麦秆虫开始暴发生长,最终导致本次虫害的发生。

3.3 麦秆虫的防除

碳酸氢铵简称碳铵,是农作物养殖中常见的化肥,具有速效、价廉、经济等优点。碳酸氢铵还可为大型藻类提供生长所需的氮元素,促进藻类的光合作用,起到增产的效果。碳酸氢铵对直接栖居在生物表面的麦秆虫有很强的急性毒性作用,在短时间内有很高的脱落率和致死率。碳酸氢铵已用于龙须菜养殖中多棘麦秆虫的防除:碳酸氢铵溶液浓度为7.360 g/L(对应的非离子氨浓度为37.720 mg/L),浸泡时间为5 min,可达到对麦秆虫100%的致死效应(魏龔伟等,2014)。

裙带菜的养殖中可以借鉴“挂袋肥”(张海灵,2001)的施肥方法,将碳酸氢铵封装于表面有小孔的塑料袋中,挂于养殖筏架上,起到对麦秆虫的防除作用,具体的剂量和挂袋密度需要进一步的实验研究。

3.4 基于CO I基因的麦秆虫系统发育分析

本研究扩增得到麦秆虫属6个物种线粒体CO I基因序列,GC含量明显低于AT含量,表现出对AT含量的偏斜,说明该序列碱基存在明显的偏向性,符合后生动物的线粒体基因组AT含量普遍高的特点(Beard *et al*, 1993)。碱基替换是DNA序列重要的进化方式,转换/颠换偏倚率R值是序列进化的重要指标(王茜等,2017)。转换和颠换伴随进化进程的推进不断发生,转换首先趋于饱和,R值不断下降,当序列差异达到最大时,R值最小(DeSalle *et al*, 1987)。本研

究中, *CO I* 基因的 *R* 值为 1.130, 远高于 Holmquist 等 (1983) 提出的系统学分析的临界值 0.400, 说明 *CO I* 基因能够提供系统发育信息。

Hebert 等 (2003a) 对包含脊椎动物和无脊椎动物在内的动物界 *CO I* 基因序列的比较分析得出: 98% 的物种种间平均遗传距离可达 0.113, 可有效地用于动物鉴定。基于 *CO I* 基因的遗传距离分析显示, 种间遗传距离为种内遗传距离的 16.500 倍, *CO I* 基因可有效地进行麦杆虫属种间鉴定 (Hebert *et al*, 2003b)。

基于 BI 法构建的系统发生树拓扑结构显示, 本研究采集的丹氏麦杆虫样品很好地聚为一支, 且与其他种的种间遗传距离在 0.200 以上, 大于种内距离 16 倍以上。本研究采集的尖额麦杆虫与 *C. andreae* 和 *C. dilatata* 互为姐妹群, 亲缘关系更接近。尖额麦杆虫世界广布, 与 *C. andreae* 和 *C. dilatata* 的形态十分相似。然而, *C. andreae* 第 1 触角十分粗壮, 鳃大而圆, 第 5~7 胸足掌节膨大, 抓捕刺位于中间位置, 生活于龟壳或漂流物上; *C. dilatata* 体型较大, 鳃大而圆, 第 2 鳃足掌节近端的毒牙仅出现于雌性及未成熟雄性个体, 成熟雄性第 2 鳃足掌节近端的毒牙消失, 但于中间位置多出 1 个小刺, 且生活于浮标和绳索上 (Guerra-García, 2014; Guerra-García *et al*, 2002、2004、2006; Masunari *et al*, 2006)。尖额麦杆虫不具有上述 2 种特征, 并且在各种栖地都有发现 (表 1, 图 3f)。GenBank 中未曾收录多棘麦杆虫的 *CO I* 基因序列, 拓扑结构显示本研究采集的多棘麦杆虫与 *C. mutica* 亲缘关系最近。麦杆虫一种无法通过形态学和 *CO I* 基因鉴定到已知种, 麦杆虫一种在铜藻中的丰度仅次于丹氏麦杆虫, 且种间遗传距离均在 0.210 以上。其他种的形态鉴定结果与 *CO I* 基因鉴定结果一致。

麦杆虫作为典型的海水养殖入侵污损生物, 曾经在世界范围内引起关注 (Ashton *et al*, 2007; Takeuchi *et al*, 2001), 并对我国的龙须菜和羊栖菜养殖业造成严重影响 (李生尧等, 2009; 魏龔伟, 2014)。麦杆虫属的物种种类繁多, 基于麦杆虫线粒体 *CO I* 基因的 DNA 条形码技术能够为我国的海水养殖虫害检测提供可靠的鉴定方法, 对保障我国海水养殖农业生产安全具有重要意义。

本次采集中同时收集到虫害发生中度的钩虾科 (Gammaridae) 种类。韩永望 (2012) 和郑新庆等 (2013) 研究表明, 强壮藻钩虾的主要食物为大型藻类和水体中的有机质碎屑, 且表现出端足类常见的补偿性摄食现象, 即对于高含水量、低碳含量的藻类, 只能通过增加摄食来满足自身代谢需求。Duffy 等 (1991) 对藻

钩虾属 (*Ampithoe* spp.) 种类的研究表明, 藻钩虾对海藻的摄食选择并不是以海藻的营养价值为优先考量标准。本调查中, 丰度最高的物种为丹氏麦杆虫, 但不能忽略钩虾对裙带菜的啃食作用。关于钩虾与麦杆虫对裙带菜的摄食作用以及钩虾科物种的分子鉴定工作将在后续研究中进一步完善和讨论。

全球气候变暖趋势的加剧带来的海水温度上升、沿海水体富营养化和单一养殖模式 (吕兑安等, 2019; 柳春福, 2019; 胡婉彬等, 2015) 造成养殖水体生态失衡是未来辽东半岛裙带菜养殖业乃至全国海水养殖业要面临的巨大考验。开发耐高温、抗虫害、生长速度快、产量高的新品种裙带菜是应对挑战的有效措施; 同时, 根据海区环境承载力合理分配养殖密度和搭配养殖品种, 对环境修复和可持续发展具有重要意义。

参 考 文 献

- ASHTON G V, BURROWS M T, WILLIS K J, *et al*. Seasonal population dynamics of the non-native *Caprella mutica* (Crustacea, Amphipoda) on the west coast of Scotland. *Marine and Freshwater Research*, 2010, 61(5): 549–559
- ASHTON G V, WILLIS K J, COOK E J, *et al*. Distribution of the introduced amphipod, *Caprella mutica* Schurin, 1935 (Amphipoda: Caprellida: Caprellidae) on the west coast of Scotland and a review of its global distribution. *Hydrobiologia*, 2007, 590(1): 31–41
- BEARD C, HAMM D M, COLLINS F H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 1993, 2(2): 103–124
- BRAWLEY S H, FEI X G. Studies of mesoherbivory in aquaria and in an unbarricaded mariculture farm on the Chinese coast. *Journal of Phycology*, 1987, 23(4): 614–623
- CABEZAS M P, NAVARRO-BARRANCO C, ROS M, *et al*. Long-distance dispersal, low connectivity and molecular evidence of a new cryptic species in the obligate rafter *Caprella andreae* Mayer, 1890 (Crustacea: Amphipoda: Caprellidae). *Helgoland Marine Research*, 2013, 67(3): 483–497
- CAO S M, HAO S, GAO X, *et al*. Effect of different ecological factors on the oxygen consumption rate of *Caprella acanthogaster*. *Hebei Fisheries*, 2013(6): 5–7 [曹善茂, 郝帅, 高雪, 等. 不同生态因子对多棘麦杆虫耗氧率的影响. *河北渔业*, 2013(6): 5–7]
- CHEN Y H, DONG Z G, LI X Y, *et al*. Study on fouling organisms in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) culture area of the Haizhou Bay. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(4): 1572–1579 [陈义华, 董志国, 李晓英, 等. 海州湾

- 长牡蛎养殖区污损生物研究. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1572–1579]
- DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, *et al.* jModelTest 2: More models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772
- DESALLE R, FREEDMAN T, PRAGER E M, *et al.* Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 1987, 26(1/2): 157–164
- DUFFY J E, HAY M E. Food and shelter as determinants of food choice by an herbivorous marine amphipod. *Ecology*, 1991, 72(4): 1286–1298
- DUFFY J E. Amphipods on seaweeds: Partners or pests? *Oecologia*, 1990, 83(2): 267–276
- Fishery Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 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]
- GONZALEZ M L, PEREZ-SCHULTHEISS J, LOPEZ D A. Exotic amphipods in aquaculture systems: Presence and potential use. *Crustaceana*, 2011, 84(7): 769–775
- GUERRA-GARCÍA J M, TAKEUCHI I. The Caprellidea (Crustacea: Amphipoda) from Ceuta, North Africa, with the description of three species of *Caprella*, a key to the species of *Caprella*, and biogeographical discussion. *Journal of Natural History*, 2002, 36(6): 675–713
- GUERRA-GARCÍA J M, TAKEUCHI I. The Caprellidea (Crustacea: Amphipoda) from Tasmania. *Journal of Natural History*, 2004, 38(8): 967–1044
- GUERRA-GARCÍA J M, REDONDO-GÓMEZ S, ESPINA Á G, *et al.* *Caprella penantis* Leach, 1814 and *Caprella dilatata* Kroyer, 1843 (Crustacea: Amphipoda) from the Strait of Gibraltar: A molecular approach to explore intra-and interspecific variation. *Marine Biology Research*, 2006, 2(2): 100–108
- GUERRA-GARCÍA J M. Caprellidea. Identification guide to British caprellids v.3.2. NMBAQC 2012 Taxonomic Workshop Dove Marine Laboratory. NMBAQC Workshop 2012, 1–17. NMBAQC; 2014
- HAN Y W, LI J, CHEN P, *et al.* Analysis of the feeding habits of *Ampithoe valida* and its response to different temperature and salinity. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 53–58 [韩永望, 李健, 陈萍, 等. 强壮藻钩虾食性分析及其对温度、盐度变化的响应. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 53–58]
- HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003a, 270(1512): 313–321
- HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003b, 270 (supp 1): S96–S99
- HOLMQUIST R. Transitions and transversions in evolutionary descent: An approach to understanding. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(2): 134–144
- HU W B, DUAN L Z, CHANG Y Q, *et al.* Review on the response of marine organisms to the change of marine environmental limiting factors. *Hebei Fisheries*, 2015, 41(11): 71–77 [胡婉彬, 段立柱, 常亚青, 等. 海洋生物对海洋环境限制因子变化的响应. 河北渔业, 2015, 41(11): 71–77]
- HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2001, 17(8): 754–755
- JIA C, YANG B, XIE E Y. Studies on the prevention and cure for predators and rivals in artificial breeding of *Sargassum naozhouense* Tseng et Lu. *Journal of Aquaculture*, 2012, 33(7): 35–39 [贾桢, 杨彬, 谢恩义. 硃洲马尾藻人工育苗常见敌害生物及防治初探. 水产养殖, 2012, 33(7): 35–39]
- JIANG R J, ZHANG S Y, BI Y X, *et al.* Food sources of small invertebrates in the macroalgal bed of Gouqi Island. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1487–1498 [蒋日进, 章守宇, 毕远新, 等. 枸杞岛海藻场小型无脊椎动物的食物来源. 水产学报, 2015, 39(10): 1487–1498]
- JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y, *et al.* NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(web server issue): W5–W9
- KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549
- LI C Y, HUANG Z G, ZHANG L X, *et al.* Studies on the ecology of fouling organisms in Lushun harbor, Liaoning Province, China. *Acta Ecologica Sinica*, 1982, 2(1): 59–65 [李传燕, 黄宗国, 张良兴, 等. 旅顺港附着生物生态的研究. 生态学报, 1982, 2(1): 59–65]
- LI S Y, YE D S, GUO W L, *et al.* Investigation and prevention of harmful organisms for the cultivation of *Sargassum fusiforme* (Harv.) Okam. *Modern Fisheries Information*, 2009, 24(9): 19–22 [李生尧, 叶定书, 郭温林, 等. 羊栖菜栽培敌害生物调查及其防治. 现代渔业信息, 2009, 24(9): 19–22]
- LIN W L. The raft cultivation of *Sargassum fusiforme*. *Fujian Agriculture*, 2008, 67(7): 31 [林位琅. 羊栖菜浮筏栽培技术. 福建农业, 2008, 67(7): 31]
- LIU C F. Research on the development strategy of ecological aquaculture and new aquaculture model. *Peasant Staff*, 2019, 35(11): 152 [柳春福. 水产生态养殖与新养殖模式发展战略探究. 农家参谋, 2019, 35(11): 152]
- LIU S R, ZHOU X J, ZHANG S Y, *et al.* Relationship between

- epiphytic seaweeds and two seaweed-associated amphipods in mussel raft culture area. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(9): 2737–2744 [刘书荣, 周曦杰, 章守宇, 等. 贻贝筏式养殖区附生大型海藻与两种附着端足目的关系. *生态学杂志*, 2018, 37(9): 2737–2744]
- LÜ D A, CHENG J, MO W, *et al.* Pollution and ecological restoration of mariculture. *Ocean Development and Management*, 2019, 36(11): 43–48 [吕兑安, 程杰, 莫微, 等. 海水养殖污染与生态修复对策. *海洋开发与管理*, 2019, 36(11): 43–48]
- LV F, GUO W, DIND G, *et al.* Analysis of the similarity of *ITS* and *coxI* sequences of *Sargassum horneri* along the offshore of China. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 141–146 [吕芳, 郭文, 丁刚, 等. 中国近海铜藻 *ITS* 与 *coxI* 序列相似性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 141–146]
- MASUNARI S, TAKEUCHI I. Redescription of *Caprella dilatata* Krøyer, 1843 (Caprellidae: Amphipoda: Crustacea) from Brazil, with note on its biogeographical distribution in South America. *Zootaxa*, 2006, 1298(1): 49–60
- REN X Q, SHA Z L. The Benthic Amphipoda (Crustacea) of the Yellow Sea. Beijing: Science Press, 2016 [任先秋, 沙忠立. 黄海底栖端足类. 北京: 科学出版社, 2016]
- RUECKERT S, SIMDYANOV T G, ALEOSHIN V V, *et al.* Identification of a divergent environmental DNA sequence clade using the phylogeny of Gregarine parasites (Apicomplexa) from crustacean hosts. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18163
- SHAN T F, PANG S J, LI J, *et al.* Breeding of an elite cultivar Haibao No. 1 of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) through gametophyte clone crossing and consecutive selection. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(4): 2419–2426
- SU L, SHAN T F, PANG S J, *et al.* Analyses of the genetic structure of *Sargassum horneri* in the Yellow Sea: Implications of the temporal and spatial relations among floating and benthic populations. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1417–1424
- 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 Oceanology, 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(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2018]
- TAKEUCHI I, HIRANO R. Growth and reproduction of *Caprella danilevskii* (Crustacea: Amphipoda) reared in the laboratory. *Marine Biology*, 1991, 110(3): 391–397
- TAKEUCHI I, TAKAHASHI S, TANABE S, *et al.* *Caprella* watch: A new approach for monitoring butyltin residues in the ocean. *Marine Environmental Research*, 2001, 52(2): 97–113
- WANG K, ZHANG S Y, WANG Z H, *et al.* Dietary composition and food competition of six main fish species in rocky reef habitat off Gouqi Island. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(2): 536–544 [王凯, 章守宇, 汪振华, 等. 枸杞岛岩礁生境主要鱼类的食物组成及食物竞争. *应用生态学报*, 2012, 23(2): 536–544]
- WANG Q, WANG X H. Phylogenetic analysis on several genera of the subfamily Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) based on 16S rDNA. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol*, 2017, 48(3): 284–290 [王茜, 王新华. 直突摇蚊亚科(双翅目: 摇蚊科)部分属基于 16S rDNA 序列的系统发育研究. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2017, 48(3): 284–290]
- WEI Y W, ZHANG J H, WU W G. Removal of the biofouling organism *Caprella acanthogaster* attached on cultivated seaweed *Gracilaria lemaneiformis* using ammonium bicarbonate. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 97–102 [魏龔伟, 张继红, 吴文广. 碳酸氢铵对龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 污损生物多棘麦杆虫 (*Caprella acanthogaster*) 的防除效果. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 97–102]
- WEI Y W. Basic ecology research on biofouling *Caprella acanthogaster* in Sungo Bay. Master's Thesis of Ocean University of Shanghai, 2014 [魏龔伟. 桑沟湾污损生物—多棘麦杆虫的基础生态学研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- XU S F, LI D, ZHANG X C, *et al.* The *Undaria pinnatifida* cultivar No. 2 Haibao. *China Fisheries*, 2015, 56(11): 55–57 [许淑芬, 李丹, 张喜昌, 等. 裙带菜“海宝 2 号”. *中国水产*, 2015, 56(11): 55–57]
- ZHANG H L. Scientific fertilization of *Saccharina japonica*. *Journal of Aquaculture*, 2001(6): 17 [张海灵. 海带的科学施肥. *水产养殖*, 2001(6): 17]
- ZHENG X Q, HUANG L F, LI Y C, *et al.* The feeding selectivity of an herbivorous amphipod *Ampithoe valida* on three dominant macroalgal species of Yundang Lagoon. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(22): 7166–7172 [郑新庆, 黄凌风, 李元超, 等. 啃食性端足类强壮藻钩虾对筲筈湖三种大型海藻的摄食选择性. *生态学报*, 2013, 33(22): 7166–7172]
- ZHENG X Q. A preliminary study on the impacts of amphipods' grazing on the macroalgal community in Yundang Lagoon. Master's Thesis of Xiamen University, 2008 [郑新庆. 端足类啃食作用对筲筈湖大型海藻群落影响的初步研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2008]

Phylogenetic Analysis of Algal Pests of the Economic Alga *Undaria pinnatifida* in the Farming Region of Dalian

LI Xiaodong^{1,2,3,4,5}, ZENG Youwei^{1,3,4,5}, LENG Xiaofei⁶, ZHANG Mingfu⁶,
LI Xinzheng^{1,3,4,5}①, PANG Shaojun^{1,2,3,4}①

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 6. Dalian Haibao Fishery Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116045, China)

Abstract Dalian is the principal farming region for the economic alga *Undaria pinnatifida*, producing 65% of the national annual biomass. In late October 2019, insect pests caused serious damage to seedlings of *U. pinnatifida* in this region. We performed field investigation excursions and analyzed pest samples through the sequencing of the mitochondrial *CO I* gene. The results showed that explosive growth of *Caprella danilevskii* was the major cause. *Caprella* spp. are considered common biofouling organisms that usually inhabit the surface of maricultural algae and maricultural facilities, such as cultural rope and oyster nets. Steadily increasing seawater temperatures and the drifting brown alga *Sargassum horneri* biomass also played a role in the explosion of the pests. To the best of our knowledge, this is the first description of the morphological characteristics of different *Caprella* spp. collected in the same area in China. *Caprella* spp. are commonly found on the surface of cultured seaweed and marine aquaculture facilities, which has caused enormous losses to the *Sargassum fusiforme* farming industry in Fujian Province and *Gracilaria lemaneiformis* farming industry in Shandong Province for the past few years. We conclude with a proposal for dispersing or killing *Caprella* species through a traditional ammonium bicarbonate fertilizer application method. Sequence analysis revealed that these *CO I* gene fragments were 479 bp in length and showed an obvious AT-skewness. The transition/transversion bias (1.130) was much higher than the critical value (0.4), which could offer effective phylogenetic information. There was no insertion or deletion that occurred in each fragment. The average inter-species genetic distance was 0.231 (0.210~0.279) and the average intra-species genetic distance was 0.014 (0~0.030). The phylogenetic relationships among *Caprella* species were represented. The results proved that the cloned *CO I* gene contains rich information on gene variations. This gene is conserved in intra-species and is different among species. It is a suitable DNA barcode for identifying species in the genus *Caprella*.

Key words *Undaria pinnatifida*; *Caprella* spp.; Fouling organism; Pest; Mitochondrial *CO I* gene

① Corresponding author: LI Xinzheng, E-mail: lixzh@qdio.ac.cn; PANG Shaojun, E-mail: sjpang@qdio.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200220004

http://www.ykxjz.cn/

孙小雨, 王祎哲, 李旻, 徐旭, 周文礼, 邵蓬, 高金伟, 窦勇, 贾旭颖. 多氯联苯(PCB₁₅₃)对湛江叉鞭金藻生理生态和超微结构的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 158-167

SUN X Y, WANG Y Z, LI Y, XU X, ZHOU W L, SHAO P, GAO J W, DOU Y, JIA X Y. Effects of polychlorinated biphenyls (PCB₁₅₃) on the physiological ecology and ultrastructure of *Dicrateria zhanjiangensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 158-167

多氯联苯(PCB₁₅₃)对湛江叉鞭金藻 生理生态和超微结构的影响*



孙小雨 王祎哲 李旻 徐旭 周文礼
邵蓬 高金伟 窦勇 贾旭颖^①

(天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384)

摘要 为研究多氯联苯对海洋微藻的生理生态毒性,以湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)为研究对象,进行7 d的六氯联苯(PCB₁₅₃)胁迫实验,比较其生长、光合色素含量、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量以及藻细胞超微结构的变化情况。结果显示,PCB₁₅₃胁迫对湛江叉鞭金藻的生长、光合色素含量及抗氧化解毒相关指标均有显著影响($P<0.05$)。随着 PCB₁₅₃浓度的增大,其对湛江叉鞭金藻生长抑制作用不断增大,250 μg/L胁迫组藻细胞在第5天全部死亡。PCB₁₅₃胁迫后,湛江叉鞭金藻叶绿素 a、叶绿素 c、类胡萝卜素和总光合色素均显著下降($P<0.05$),且随着 PCB₁₅₃浓度的增加,各实验组光合色素含量下降比例增大。PCB₁₅₃胁迫后,各胁迫组藻细胞 MDA 含量显著增加;低浓度 PCB₁₅₃(< 25 μg/L)胁迫显著诱导 SOD 和 GST 活性的提高;而高浓度 PCB₁₅₃(> 25 μg/L)胁迫则显著抑制 2 种酶活性。短期低浓度 PCB₁₅₃胁迫会改变金藻细胞超微结构,使细胞器形态改变、聚缩;高浓度 PCB₁₅₃胁迫则会直接破坏细胞膜的完整性,使细胞破裂,导致细胞自溶死亡。研究表明,PCB₁₅₃抑制叉鞭金藻的生长和光合色素合成,低浓度 PCB₁₅₃激活抗氧化解毒系统,提高其自我保护水平,高浓度 PCB₁₅₃加剧脂质过氧化,破坏抗氧化解毒系统正常功能,导致细胞破裂死亡。

关键词 湛江叉鞭金藻; 六氯联苯 PCB₁₅₃; 光合色素; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 谷胱甘肽 S-转移酶; 超微结构

中图分类号 X826 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0158-10

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是国际上广泛存在的一大类人为污染物,共有 209 种具有不同理化和毒理学性质的同系物(Grilo *et al*, 2014),对生物内分泌、神经、免疫和生殖系统等均能产生生理毒

* 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810061008)、天津市自然科学基金青年项目(18JCQNJC14800)、天津市 131 人才工程项目(J01009030726)和天津市水产产业技术体系创新团队项目(ITFRS2017005)共同资助 [This work supported by College Students' Innovative Entrepreneurial Training (201810061008), Youth Fund of Tianjin Natural Science Foundation (18JCQNJC14800), Project of Tianjin "131" Cultivation of Innovative Talents(J01009030726), and Tianjin Aquatic Industry Technology System Innovation Team Project (ITFRS2017005)]. 孙小雨, E-mail: sunsunny110@163.com

^① 通讯作者: 贾旭颖, 副教授, E-mail: jiaxyuying1109@sina.com

收稿日期: 2020-02-20, 收修改稿日期: 2020-04-03

性。多氯联苯可以通过废弃的工业设备以及建筑材料等释放到环境中,广泛存在于大气、土壤和水环境中,从而对环境造成了潜在的威胁(Kohler *et al.*, 2005; Hassan, 2018)。尽管自20世纪70年代,国际上普遍禁止多氯联苯的使用,但由于其理化性质稳定、不易降解的特点,在大多数工业化国家,多氯联苯不仅仍然存在于环境中,而且还可以通过食物网迁移、积累和生物放大(Freitag *et al.*, 1982; Ulbrich *et al.*, 2004)。由于多氯联苯的疏水性和低降解性,相对于水环境中的浓度,多氯联苯可在生物群中累积数千或数万倍的浓度,从而对从浮游植物到海洋哺乳动物等多种物种产生毒理学影响(Song *et al.*, 2012; Filipkowska, 2013)。PCB₁₅₃(2,2',4,4',5,5'-六氯联苯)属于非二噁英类(非共面)同类物(胡芳等, 2012; 陈曦, 2014),是人体脂肪组织中含量最多的PCBs之一,与人类关系密切(Duartedavidson *et al.*, 1994; Kimbrogh, 1995; Ghosh *et al.*, 2003)。六氯联苯是常见的环境内分泌干扰物之一,能够使生物体多巴胺、雌激素等代谢异常,扰乱免疫系统。六氯联苯在我国东海岸水体中污染程度较高(徐添翼等, 2016)。梅婕(2014)通过探究Cd-PCB₁₅₃对海水青鳉(*Oryzias melastigma*)仔鱼的影响时发现,随着水中Cd-PCB₁₅₃浓度的增大,鱼体中Cd-PCB₁₅₃浓度增大, RNA/DNA 和 *Shh* 基因相对表达量降低。韩现芹等(2019)探究 PCB₁₅₃ 对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)抗氧化酶影响时发现,暴露24 h和48 h时,半滑舌鳎体内超氧化物歧化酶(SOD)活性呈先诱导后抑制的趋势。李娜(2012)研究 PCBs 在水生食物链中生物毒性及富集效应,发现大型蚤(*Daphnia magna*)、斑马鱼(*Brachydanio rerio* var)体内的 PCBs 主要来源于摄食食物藻类等,在探究 PCB₁₅₃ 对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)的影响时发现, PCB₁₅₃ 对藻细胞内的叶绿素 *a*、*b* 等均有抑制作用,低浓度 PCB₁₅₃ 可提高2种微藻的 SOD 活性,高浓度 PCB₁₅₃ 抑制2种微藻的 SOD 活性。

微藻是一种指示生物,常用指标有生长速率、细胞密度和叶绿素含量等,这些指标具有可靠、快速和重复性好等优点,常被用于评价水体中重金属和其他新型污染物的毒性,是进行环境风险评价和确定水环境中有毒化学物质释放限值的重要依据(Monteiro *et al.*, 2011; Stauber *et al.*, 2011; Ebenezer *et al.*, 2013)。目前,常用的淡水微藻主要有淡水小球藻(*Chlorella vulgaris*)、羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)和四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)等。海洋微藻是海洋生物食物链(网)的基础,微藻细胞所吸附或积累的 PCB₁₅₃ 可通过海洋食物链在高营养级生物体内富集,

最终进入人体产生危害(迟潇等, 2019)。目前,关于多氯联苯对海洋微藻的研究相对较少。

本研究选择我国海域常见的海洋微藻——湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)为研究对象,进行 PCB₁₅₃ 胁迫实验,通过分析其生长、光合色素含量、抗氧化、解毒相关指标及藻细胞超微结构的变化规律,探究湛江叉鞭金藻对六氯联苯的生理生态响应规律,为评估多氯联苯对海洋生态系统造成的生态风险的基础研究提供依据,为探究多氯联苯对水生食物链中的影响积累数据,同时,为微藻在海洋环境风险评估和有机污染物生物防治中的应用提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用湛江叉鞭金藻由天津市水产生态及养殖重点实验室提供。PCB₁₅₃ 购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,使用90%丙酮助溶,超纯水稀释,配制成100 mg/L 储备液待用。SOD、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性试剂盒、丙二醛(MDA)含量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 湛江叉鞭金藻的培养方法 湛江叉鞭金藻培养用水为正常海水,盐度为30,培养基为f/2培养基,光照培养箱中培养,培养温度为(26±1)℃,光暗周期12 h:12 h,光照强度为2500 lx。每天摇动锥形瓶3次,并随机更换位置保证其受光照均匀。

1.2.2 毒性实验 根据预实验结果,正式实验设置空白对照组(CK)、丙酮对照组(AT)及 PCB₁₅₃ 浓度分别为1、5、25、50、125和250 μg/L的胁迫组,丙酮对照组的丙酮浓度与最高浓度实验组丙酮浓度一致,为0.125 μL/mL。每组3个平行,所用容器为500 mL三角烧瓶,藻液体积为300 mL,实验藻初始密度为1.28×10⁶ cell/mL,实验共进行7 d,每天取5 mL藻液测定其生物量;并在胁迫初期(3 d),测定其叶绿素 *a*、叶绿素 *c* 和类胡萝卜素的含量,并分别取空白对照组、5 μg/L 和 250 μg/L 处理组藻液20 mL进行电镜观察;在实验结束时(7 d),取剩余藻液,测定其 SOD、GST 活性和 MDA 含量。

1.2.3 测定方法 藻细胞密度的测定方法采用血球计数板法(张士瑾等, 1997),每天17:00 每组取5 mL藻液,用血球计数板在显微镜下计数,每个样品计数3次,取平均值。

相对生长速率(relative growth rate)公式:

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$$

式中, N 和 N_0 分别为 t 时刻和初始(t_0 时刻)藻密度。

实验结束时(7 d), 采用 Jeffrey 分光光度法(帕森斯, 1989)测定藻液色素含量。公式如下:

$$\text{叶绿素 } a (C_a): \rho\text{Chl.}a = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630}$$

$$\text{叶绿素 } c (C_c): \rho\text{Chl.}c = 24.52E_{630} - 1.67E_{664} - 7.6E_{647}$$

$$\text{类胡萝卜素}: \rho\text{Cp} = 7.6(E_{480} - 1.49E_{510})$$

式中, E 是上述不同波长下所测的消光值(以 750 nm 读数校正后)(朱永梅等, 2017)。

SOD 活性单位定义为在黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分 50% 时, 反应体系中的 SOD 活力定义为 1 个酶活力单位。GST 活性单位定义为在 25℃ 中, 每 10^4 个细胞每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

1.2.4 数据分析 实验数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 使用 SigmaPlot 12.0 绘图, 并使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

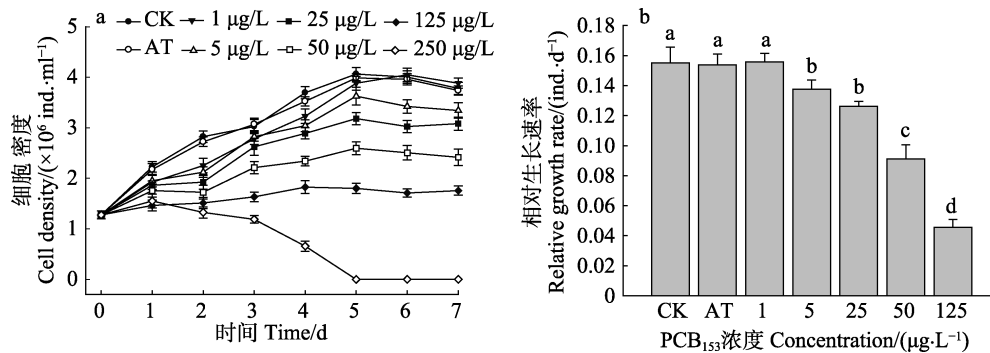


图1 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻生长(a)和相对生长率(b)的影响
Fig.1 Effect of PCB₁₅₃ on growth (a) and relative growth rate (b) of *D. zhanjiangensis*

CK: 空白对照组; AT: 丙酮对照组。图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

CK: Control check; AT: Acetone test. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

2.2 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻光合色素的影响

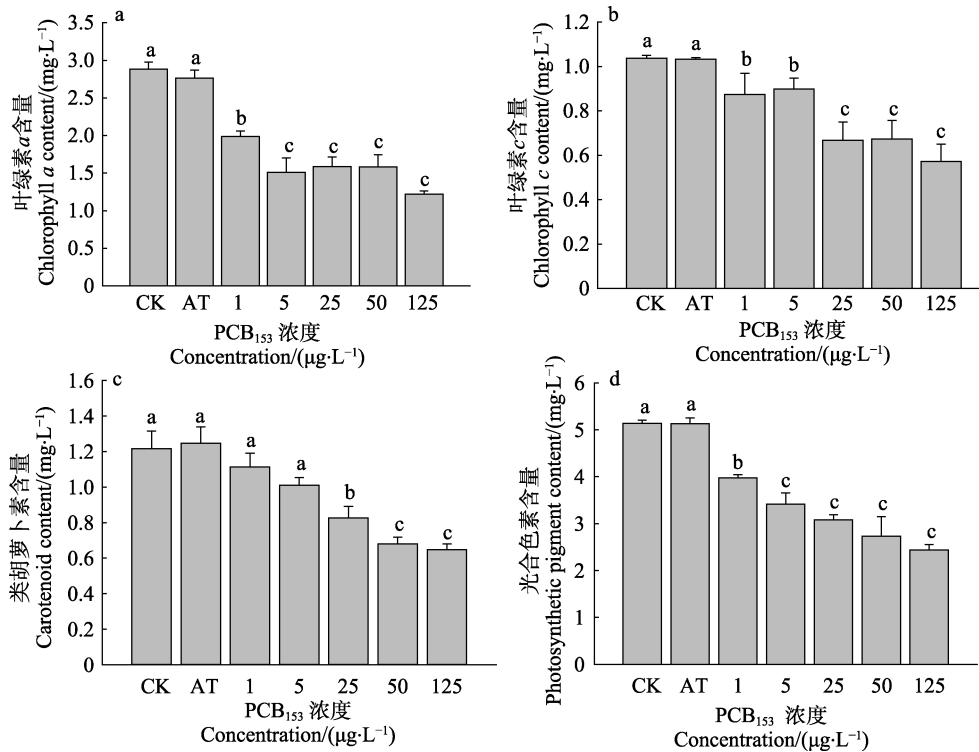
PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻光合色素含量的影响如图2所示。实验期间, 空白对照组与丙酮对照组的叶绿素 a 、叶绿素 c 、类胡萝卜素和总光合色素含量无显著差异($P > 0.05$)。在实验浓度范围内, 叶绿素 a 、叶绿素 c 、类胡萝卜素和总光合色素含量均随着 PCB₁₅₃ 胁迫浓度的增加而显著降低。与空白对照组相比, PCB₁₅₃ 胁迫组(1~125 $\mu\text{g/L}$)叶绿素 a 分别下降了 31.07%、47.72%、44.96%、45.03%和 57.70%。与空白对照组相比, PCB₁₅₃ 胁迫组(1~125 $\mu\text{g/L}$)叶绿素 c 分别下降了 15.70%、13.36%、35.61%、35.00%和 44.81%, 均显著低于空白对照组($P < 0.05$)。叉鞭金藻类胡萝卜素含量随 PCB₁₅₃ 胁迫浓度增加而降低,

2 结果

2.1 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻生长的影响

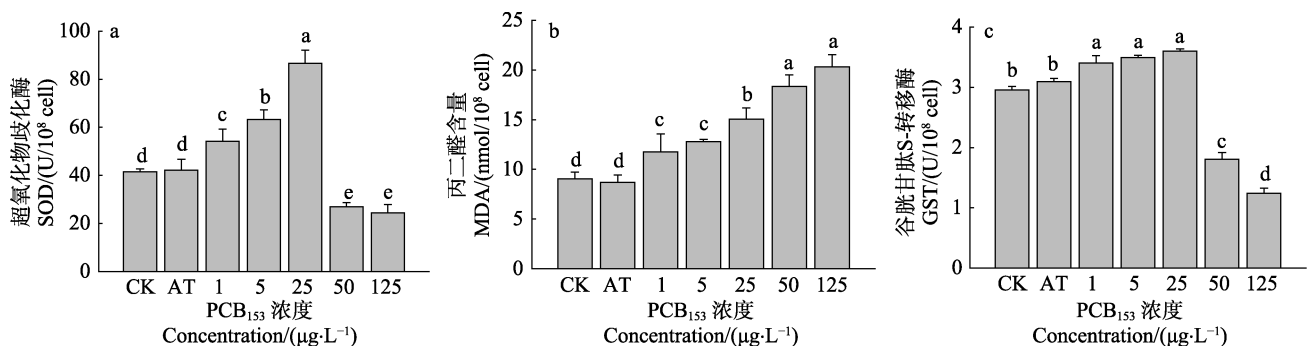
PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻生长的影响如图1所示。实验期间, 空白对照组与丙酮对照组之间细胞密度变化趋势基本一致, 二者无显著差异($P > 0.05$)。PCB₁₅₃胁迫 1 d, 各处理组细胞密度均呈升高趋势, 胁迫 2 d, 250 $\mu\text{g/L}$ 处理组藻密度开始下降, 且随着胁迫时间的延长细胞密度下降程度增加, 至 5 d 时, 细胞密度降为零, 藻细胞全部死亡。在相同的时间点, 除 1 $\mu\text{g/L}$ 组以外, 其余各胁迫组细胞密度均低于空白对照组, 并随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大, 密度差增加。实验期间, 1 $\mu\text{g/L}$ PCB₁₅₃ 胁迫组的相对增长率略高于空白对照组和丙酮对照组, 但三者之间差异不显著($P > 0.05$)。其余各胁迫组(5~125 $\mu\text{g/L}$)的相对增长率随着 PCB₁₅₃ 浓度的增加呈明显递减趋势, 其相对生长率均显著低于空白对照组($P < 0.05$)。

与空白对照组相比, PCB₁₅₃ 胁迫组(1~125 $\mu\text{g/L}$)类胡萝卜素分别下降了 8.38%、16.89%、32.00%、44.10%和 46.68%。低浓度组(1~5 $\mu\text{g/L}$)的类胡萝卜素含量降低趋势较缓, 与空白对照组相比, 无显著差异($P > 0.05$)。在 5~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 类胡萝卜素含量随胁迫浓度升高而显著降低($P < 0.05$), 当浓度高于 50 $\mu\text{g/L}$ 时, 类胡萝卜素含量降低趋势变缓。与空白对照组相比, PCB₁₅₃ 胁迫组(1~125 $\mu\text{g/L}$)总光合色素含量分别下降 22.60%、33.42%、40.00%、46.78%和 52.49%。低浓度 PCB₁₅₃(1~5 $\mu\text{g/L}$)胁迫组的总光合色素含量随 PCB₁₅₃ 浓度的升高而显著降低($P < 0.05$); 当浓度高于 5 $\mu\text{g/L}$ 时, 总光合色素含量虽然随 PCB₁₅₃ 浓度升高而降低, 但各组之间差异不显著($P > 0.05$)。

图 2 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻光合色素含量的影响Fig.2 Effect of PCB₁₅₃ on the content of photosynthetic pigment in *D. zhanjiangensis*

2.3 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻抗氧化和解毒相关指标的影响

PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻 SOD、GST 活性和 MDA 含量的影响如图 3 所示。不同浓度 PCB₁₅₃胁迫对湛江叉鞭金藻 SOD 活性和 MDA 含量均有显著影响 ($P < 0.05$)。实验期间,空白对照组与丙酮对照组的 SOD 活性和 MDA 含量均无显著差异 ($P > 0.05$)。在 1~25 µg/L 胁迫组中, SOD 活性随 PCB₁₅₃ 浓度的升高而显著升高, 25 µg/L 胁迫组的 SOD 活性为空白对照组的 2 倍, 显著高于其他处理组 ($P < 0.05$)。当 PCB₁₅₃ 浓度升高至 50 µg/L 和 125 µg/L 时, SOD 活性则显著下降, 分别降低至空白对照组的 65.19% 和 59.04%。

图 3 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻抗氧化和解毒相关指标的影响Fig.3 Effect of PCB₁₅₃ on indexes related to antioxidation and detoxification of *D. zhanjiangensis*

显著低于其他处理组 ($P < 0.05$)。PCB₁₅₃ 胁迫后, 湛江叉鞭金藻的 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 且随着胁迫浓度的升高而升高, 各胁迫组 (1~125 µg/L) 的 MDA 含量分别升高 29.89%、41.35%、66.43%、102.91% 和 124.72%。

丙酮对照组与空白对照组的 GST 活性无显著差异 ($P > 0.05$)。低浓度 PCB₁₅₃ (1~25 µg/L) 胁迫下, GST 活性显著升高 ($P < 0.05$), 而高浓度 PCB₁₅₃ (50~125 µg/L) 胁迫下, GST 活性显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻超微结构的影响

PCB₁₅₃对湛江叉鞭金藻超微结构的影响如图 4 所示。对照组藻细胞的细胞膜完整, 细胞器结构完整,

细胞质基质分布较为均匀(图 4a)。PCB₁₅₃ 胁迫 3 d 后, 5 μg/L 胁迫组藻细胞形态略有变化, 其细胞膜变形, 但未见明显缺损, “杯形”色素体聚缩, 细胞质基质较为松散、不均匀(图 4b); 250 μg/L 胁迫组藻细胞形态有明显的变化, 细胞膜破裂、缺损, “杯形”色素体等解体, 甚至已经与细胞质基质融为一体, 并随细胞质基质流出细胞(图 4c)。随 PCB₁₅₃ 的浓度增大, 细胞膜变化越来越明显, 最终由于细胞膜的不完整性导致细胞自溶死亡。

3 讨论

3.1 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻生长的影响

藻类生长指标可以客观反映藻细胞的生长状况, 同时, 也间接反映了水质的状况, 可以通过检测水体中藻类的生长指标来监测该区域该段时间的水质状况。吴越等(2017)研究发现, PCB₁₃₈ 对牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 和亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 有明显的抑制作用, 0.01 mg/L PCB₁₃₈

胁迫 24 h 后, 牟氏角毛藻开始出现显著生长抑制 ($P < 0.05$), 0.1 mg/L PCB₁₃₈ 胁迫下, 亚心形扁藻细胞密度显著低于对照组 ($P < 0.05$)。聂湘平等(2002)研究发现, PCB₁₂₅₄ 浓度高于 10 ng/mL 时, 蛋白核小球藻和斜生栅藻生长缓慢, 甚至呈负增长。本研究中, PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻生长有明显的抑制作用, 在浓度较低 ($< 5 \mu\text{g/L}$) 时, PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻生长的抑制作用相对较小; 浓度较高 ($> 5 \mu\text{g/L}$) 时, PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻的抑制作用较为明显, 且随着浓度增大和胁迫时间的延长, PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻生长的抑制作用明显增强, 甚至出现负增长。王向艺(2012)研究表明, 叉鞭金藻的生长随原油浓度的增大而抑制作用明显增大, 可能是因为叉鞭金藻没有细胞壁包被, 抵抗外界有毒物质的能力较弱。细胞膜脂质过氧化引起的膜损伤是环境污染物抑制微藻生长的重要原因(岳文洁等, 2009; Fu *et al.*, 2013)。本研究中, PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻生长有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 可能与湛江叉鞭金藻没有细胞壁保护、细胞膜脂质过氧化有关。

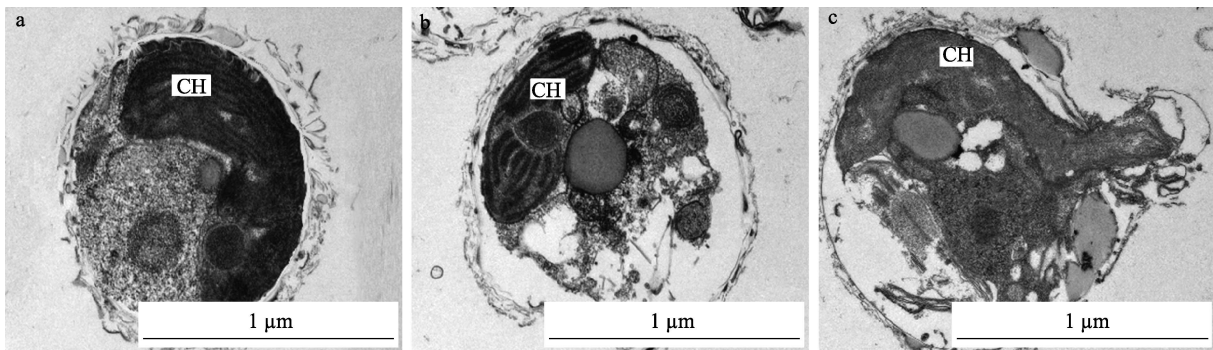


图 4 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻超微结构的影响

Fig.4 Effect of PCB₁₅₃ on the ultrastructure of *D. zhanjiangensis*

a: 对照组; b: 5 μg/L; c: 250 μg/L. CH: “杯形”色素体
a: Control group; b: 5 μg/L; c: 250 μg/L. CH: Cup-shaped plastid

3.2 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻光合色素的影响

光合色素是藻类光合作用进行吸收、传递、转化光能的物质基础, 光合色素质量浓度可以较好地反映植物光合生理能力、各阶段的生长发育状况, 同时, 也是反映环境胁迫状况的重要指标(张锦华等, 2016; Geoffroy *et al.*, 2003; 刘碧云等, 2006)。藻类体内的光合色素按化学结构分为叶绿素、类胡萝卜素和藻胆蛋白(方小丹, 2012)。其中, 湛江叉鞭金藻内主要含有叶绿素 *a*、叶绿素 *c*、类胡萝卜素等(Jeffrey *et al.*, 1997)。光合反应中心主要成分为叶绿素 *a*, 大部分的叶绿素 *a* 吸收和传递光能(Taiz *et al.*, 2006; Ston *et al.*,

2000)。叶绿素 *a* 是捕光色素复合体的重要组成部分, 可以作为光合电子传递链的电子供体参与光合作用系统的反应(Rontani *et al.*, 1994、2001; 张丽, 2015)。类胡萝卜素是光系统中的辅助捕光色素, 是光合色素的一部分; 同时, 也是内源抗氧化剂, 具有抗氧化的作用, 是细胞内活性氧清除系统中非酶促系列的重要组成部分, 具有保护叶绿素和光合机能的作用(胡单等, 2011; 黄彬城等, 2006; 秦天才等, 2000; 张锦华等, 2016; 张浩等, 2019)。叶绿素 *c* 具有吸收传递太阳能的作用, 由于湛江叉鞭金藻无叶绿素 *b*, 叶绿素 *c* 替代叶绿素 *b* 主要捕获水中蓝光和绿光(Katoh *et al.*, 1989)。总光合色素体现出来的是金藻细胞进行最优

光合作用所有色素的动态平衡,可以直接反应出光合作用的状态(张丽, 2015)。李娜(2012)研究发现,在 PCB₁₅₃ 胁迫下,蛋白核小球藻和斜生栅藻细胞中叶绿素 *a* 是最先受到显著抑制的。本研究中,湛江叉鞭金藻受 PCB₁₅₃ 胁迫后,叶绿素 *a* 最先产生显著下降,随后,叶绿素 *c*、类胡萝卜素出现显著下降($P < 0.05$)。相比叶绿素 *c* 和类胡萝卜素,湛江叉鞭金藻叶绿素 *a* 对 PCB₁₅₃ 胁迫更为敏感。这可能是由于 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻光合作用的抑制是先通过抑制叶绿素 *a* 的合成,从而抑制藻细胞正常的生长,促进了藻细胞的衰老、死亡(牧辉等, 2009; 聂湘平等, 2007)。随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大,类胡萝卜素含量下降,藻细胞色素的捕光能力减弱,抗氧化能力和光合作用机能下降。随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大,叶绿素 *c* 含量不断减少,藻细胞光合作用过程中捕获蓝光、绿光能力下降,吸收传递太阳能的能力也不断下降,光合作用受到严重影响。随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大,总光合色素的含量不断下降,表明 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻的胁迫作用不断增大,导致藻细胞体内总光合色素的含量不断减少,光合作用机能遭到严重破坏,几乎无法正常地进行光合作用,由光能转化为化学能的能力减弱,间接影响了藻细胞的呼吸作用以及其他代谢作用,抑制藻细胞生存、生长,促使藻细胞凋亡。

3.3 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻抗氧化和解毒相关指标的影响

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,在生物体的自我保护系统中起着极为重要的作用,是反映生物应对各种胁迫的重要指标(韩莎等, 2018; 郝水, 1983)。SOD 作为酶类抗氧化剂,在生物体内广泛存在,当机体受到活性氧物质刺激时,SOD 会迅速产生应答,清除活性氧物质,从而保护机体(Sheng *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2018; 唐洁等, 2019)。MDA 是脂质过氧化的重要产物,可以反映生物体受 ROS 攻击的程度,是脂质过氧化和氧化应激的重要生物标志物(Lawal *et al.*, 2011; 井维鑫等, 2019)。MDA 含量是反映机体抗氧化潜在能力的重要参数,间接反映组织过氧化损伤程度。聂湘平等(2002)进行了多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究,在 PCB₁₂₅₄ 作用下,蛋白核小球藻和斜生栅藻体内的 SOD 活性有较明显的变化,低浓度作用下,SOD 活性均略有升高;高质量浓度时,明显受到抑制,活性逐渐下降。方浩等(2011)研究发现,低浓度多氯联苯(PCB₁₂₅₄)对锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)的 SOD 活性有诱导作用,当多氯联苯浓度超过一定阈值,酶活性下降。 Cd^{2+}

等可引起背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)等双壳类体内 MDA 含量的上升,指示脂质过氧化以及氧化胁迫的存在(井维鑫等, 2019; Nardi *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2018)。由于 ROS 攻击引发的膜脂质过氧化严重影响了生物膜的功能及完整性并对细胞造成不可逆的损伤(Aravind *et al.*, 2005)。本研究发现,较低浓度 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻体内的 SOD 有诱导作用,SOD 活性的升高增强了机体消除各种代谢产生的活性氧自由基的能力,使生物体内的活性氧自由基的产生和消除处于动态的平衡状态,也增强了藻细胞自我保护机制,提高藻细胞抗氧化能力和抗损伤能力;较高浓度 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻体内的 SOD 有破坏作用,其自我保护机制、代谢作用已遭到严重损坏,藻细胞的生长受到抑制。MDA 含量随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大而增大,表明了藻细胞受 ROS 攻击程度不断增大,膜脂质过氧化程度也不断加深,而且 MDA 含量的增大,表明藻细胞膜的损伤、细胞的衰老等加剧,PCB₁₅₃ 胁迫对藻细胞造成不可逆的损伤,抑制了藻细胞的生长,促进了细胞的凋亡。

GST 是一种 II 相解毒酶,也是一种重要的抗氧化酶(Shenai-Tirodkar *et al.*, 2017; 杨惠珍等, 2015)。GST 可保护植物体免受污染物及 ROS 的损伤(Nemat Alla, 1995),GST 既具有过氧化物酶的活性,同时,可以直接清除分子结构里带有亲电基团的化合物(刘滨扬, 2011; Nemat Alla, 1995; Nemat Alla *et al.*, 2006)。姜爽(2011)在研究多溴联苯醚对米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*) GST 活性影响时发现,GST 活性随时间的延长先增加后降低的趋势。前 5 d, GST 活性随时间的延长而增大;后 5 d, GST 活性随时间的延长而减小。朱佩佩等(2019)在研究不同浓度铅胁迫对椭圆食粉螨(*Aleuroglyphus ovatus*) GST 活性影响的研究中发现,随着铅浓度的增加,GST 活性呈先增大后减小的趋势,当铅的浓度超过 25 mg/kg 时, GST 活性不断减小。本研究中,当 PCB₁₅₃ 浓度低于 25 $\mu\text{g/L}$ 时, GST 活性随浓度升高而提高;当 PCB₁₅₃ 浓度高于 25 $\mu\text{g/L}$ 时, GST 活性随着 PCB₁₅₃ 浓度升高而降低。本研究发现,较低浓度 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻体内的 GST 有诱导作用,可以刺激藻细胞的自我保护机制,提高藻细胞的抗氧化能力和抗损伤能力;较高浓度 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻体内的 GST 有破坏作用,其 GST 活性降低,清除结构里带亲电基团化合物的能力降低,自我保护机制、代谢作用已遭到严重损坏。

3.4 PCB₁₅₃ 对湛江叉鞭金藻超微结构的影响

PCB₁₅₃ 通过对湛江叉鞭金藻细胞膜的破坏,导致

部分细胞器流出细胞,同时,细胞膜的不完整导致细胞自溶死亡(陈必链等,2000)。“杯”形色素体是湛江叉鞭金藻细胞进行光合作用、将光能转化为化学能的主要场所,从进化角度看,由较原始的单层类囊体组成,且仅有 1 个色素体(时沁峰等,2009;毛连菊等,1999)。250 $\mu\text{g/L}$ 组“杯”形色素体的形态发生变化,表明了类囊体受损,光合作用场所受到破坏,光能转化为化学能的过程受到抑制,光合作用较为微弱,严重影响了藻细胞自身的正常生长以及代谢活动,从而促使细胞无法正常生长繁殖,甚至凋亡。湛江叉鞭金藻没有细胞壁,细胞膜是它与外界进行物质交换等的具有选择透过性的结构,它对藻细胞起着一定的保护功能。PCB₁₅₃ 胁迫破坏了湛江叉鞭金藻的细胞膜,藻细胞内的细胞器暴露于溶液中,加速了其被氧化进程,藻细胞的正常生理活动遭受严重破坏。3 d 后,250 $\mu\text{g/L}$ 胁迫组的湛江叉鞭金藻细胞出现胞内基础结构解体(万莉等,2014)。Moharikar 等(2006)用“类凋亡”来描述藻类的这种类似细胞死亡方式。本研究表明,湛江叉鞭金藻受 PCB₁₅₃ 胁迫后,出现“类凋亡”现象。高浓度 PCB₁₅₃ 使膜系统脂质氧化因而破坏细胞和叶绿体等的结构,造成光合色素合成受到阻碍,藻细胞生长受抑制。高浓度 PCB₁₅₃ 胁迫的藻细胞内基础结构解体,可能与 SOD、GST 等抗氧化物酶的活性降低有关,SOD、GST 活性降低意味藻细胞体内自我保护机制、代谢作用已遭到严重损坏,藻细胞内的各个细胞器无法正常工作。随着 PCB₁₅₃ 浓度的增加,细胞膜开始变形,逐渐解体,可能是由于藻细胞受 ROS 攻击程度不断增大,膜脂质过氧化程度也不断加深,最终导致藻细胞膜缺损破裂,藻细胞死亡。

综上所述,PCB₁₅₃ 胁迫对湛江叉鞭金藻的生长和光合色素的合成有明显的抑制作用,且随着胁迫浓度的增加,抑制作用增大。随着 PCB₁₅₃ 浓度的增大,MDA 含量逐渐增大。低浓度 PCB₁₅₃ 激活藻细胞的 SOD 活性和 GST 活性,提高其自我保护水平,而高浓度 PCB₁₅₃ 胁迫则显著抑制这 2 种酶的活性。短期低浓度 PCB₁₅₃ 胁迫会改变金藻细胞超微结构,使细胞器形态改变、聚缩;高浓度 PCB₁₅₃ 胁迫则会直接破坏细胞膜的完整性,使细胞破裂,导致细胞自溶死亡。

参 考 文 献

- ALMEIDA \tilde{A} , CALISTO V, ESTEVES V I, *et al.* Effects of single and combined exposure of pharmaceutical drugs (carbamazepine and cetirizine) and a metal (cadmium) on the biochemical responses of *R. philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 2018, 198(5): 10–19
- ARAVIND P, PRASAD M N V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zine involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(2): 107–116
- CHEN B L, ZHUANG H R, CHEN W L, *et al.* Effect of Co on the ultrastructure of *Pavlova viridis*. *Marine Environmental Science*, 2000, 19(2): 22–29 [陈必链, 庄惠如, 陈文列, 等. Co 对绿色巴夫藻超微结构的影响. *海洋环境科学*, 2000, 19(2): 22–29]
- CHEN X. Remediation of polychlorinated biphenyls contaminated soil by nanoscale zerovalent iron or nZVI-microorganism integrated treatment. Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 [陈曦. 纳米零价铁及其与微生物联合修复多氯联苯污染土壤. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2014]
- CHI X, XIA B, ZHU L, *et al.* Acute toxicity of four polybrominated diphenyl ether congeners to marine organisms: *Chlorella pyrenoidosa*, *Daphnia magna*, and *Scopthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 88–97 [迟潇, 夏斌, 朱琳, 等. BDE-47、BDE-99、BDE-153 和 BDE-209 对蛋白核小球藻、大型溞和大菱鲆的急性毒性效应. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 88–97]
- DUARTE DAVIDSON R, WILSON S C, JONES K C. PCBs and other organochlorines in human tissue samples from the Welsh population. *Adipose Environmental Pollution*, 1994, 84(1): 69–77
- EBENEZER V, KI J S. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *Journal of Microbiology*, 2013, 51(1): 136–139
- FANG H, LÜ S H, MA F F, *et al.* Study on the acute toxicity of PCBs to two species of microalgae. *Anhui Agricultural Science*, 2011, 39(15): 9147–9150 [方浩, 吕颂辉, 马方方, 等. 多氯联苯对 2 种微藻的急性毒性研究. *安徽农业科学*, 2011, 39(15): 9147–9150]
- FANG X D. HPLC-MS/MS analysis and application on photosynthetic pigments of marine environment. Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2012 [方小丹. 海洋环境中光合色素的 HPLC-MS/MS 分析技术研究与应用. 大连工业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- FILIPKOWSKA A. Determining PCBs in fish and sediment samples related to intercomparison studies. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2013, 22(5): 1341–1347
- FREITAG D, GEYER H, KRAUS A, *et al.* Ecotoxicological profile analysis. VII. Screening chemicals for their environmental behavior by comparative evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1982, 6(1): 60–81
- FU M, SONG X X, YU Z M, *et al.* Responses of activity of antioxidant enzyme in *Thalassiosira*. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(6): 809–813
- GEOFFROY L, DEWEZ D, VERNET G, *et al.* Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different, photosynthetic and enzymatic biomarkers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 45(4): 445–452
- GHOSH U, ZIMMERMAN J R, LUTHY R G. PCB and PAH speciation among particle types in contaminated harbor

- sediments and effects on PAH bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(10): 2209–2217
- GRILO T F, CARDOSO P G, PATO P, *et al.* Uptake and depuration of PCB₁₅₃ in edible shrimp *Palaemonetes varians* and human health risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 101(1): 97–102
- HAN S, HU W, LI C L, *et al.* Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 91–98 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 91–98]
- HAN X Q, CHEN Y P, GUO H Y, *et al.* Effect of PCB153 on acute toxicity and antioxidant enzyme activity of *Cynoglossus semilaevis*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(24): 153–157 [韩现芹, 陈永平, 郭华阳, 等. PCB153对半滑舌鳎的急性毒性及抗氧化酶活性的影响. *江苏农业科学*, 2019, 47(24): 153–157]
- HAO S. *Course of cell biology*. Beijing: Higher Education Press, 1983, 142–147 [郝水. *细胞生物学教程*. 北京: 高等教育出版社, 1983, 142–147]
- HASSAN H M. Effects of pollution on marine crustaceans in Qatari waters: A baseline survey and a case study on genotoxicity indicators in an endemic shrimp. Doctoral Dissertation of University of Salford, 2018
- HU D, YANG Y H. Effect of different application rate of nitrogen on photosynthetic pigment, biomass and yield of winter highland barley seedlings. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(24): 14561–14563, 14585 [胡单, 杨永红. 不同施氮对冬青稗幼苗光合色素·生物量及产量的影响. *安徽农业科学*, 2011, 39(24): 14561–14563, 14585]
- HU F, XU Z C. Pollution of PCBs in environment media in China. *Guangdong Chemical Industry*, 2012, 39(1): 87–88 [胡芳, 许振成. 多氯联苯(PCBs)污染现状分析. *广东化工*, 2012, 39(1): 87–88]
- HUANG B C, JI J, WANG G, *et al.* Advances of carotenoid in plants. *Tianjin Agricultural Sciences*. 2006, 12(2): 13–17 [黄彬城, 季静, 王罡, 等. 植物类胡萝卜素的研究进展. *天津农业科学*, 2006, 12(2): 13–17]
- JEFFREY S W, MANTOURAR F C, WRIGHT S W. *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. Paris: UNESCO Publishing, 1997, 638
- JIANG S. The toxic effects of two kinds of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on four species of marine microalgae. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [姜爽. 两种多溴联苯醚对四种海洋微藻的毒性效应研究. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2011]
- JING W X, LIN Z G, LANG L, *et al.* Oxidative stress in the gills and digestive gland of *Anodonta woodiana* exposed to cadmium. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2019, 47(8): 1334–1340 [井维鑫, 林子根, 朗朗, 等. 镉暴露对背角无齿蚌鳃和消化腺的氧化应激. *山西农业科学*, 2019, 47(8): 1334–1340]
- KATO T, MIMURO M, TAKAICHI S. Light-harvesting panicles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*: A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 976(2): 233–240
- KIMBROUGH R D. Poly chlorinated biphenyls (PCBs) and human health: An update. *Critical Reviews in Toxicology*, 1995, 25(2): 133–163
- KOHLER M, TREMP J, ZENNEGG M, *et al.* Joint sealants: An overlooked diffuse source of polychlorinated biphenyls in buildings. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(7): 1967–1973
- KONG H, CHANDEL N. To claim growth turf, mTOR says SOD off. *Molecular Cell*, 2018, 70(3): 383–384
- LAWAL A O, LAWAL A F, OLOGUNDUDU A, *et al.* Antioxidant effects of heated garlic juice on cadmium-induced liver damage in rats as compared to ascorbic acid. *Journal of Toxicological Sciences*, 2011, 36(5): 549–557
- LI N. Toxicity effects and enrichment effect of PCBs in the aquatic food chain. Master's Thesis of Jinan University, 2012 [李娜. 多氯联苯在水生食物链中的生物毒性及富集效应研究. *暨南大学硕士研究生学位论文*, 2012]
- LIU B Y, ZHOU P J, LI J J, *et al.* Effect of γ -HCH on the growth, photosynthetic and lipid peroxidation of *Scenedesmus obliquus* *kiütz.* *Journal of Agro-Environmental Science*, 2006, 25(1): 204–207 [刘碧云, 周培疆, 李佳洁, 等. 丙体六六六对斜生栅藻生长及光合色素和膜脂过氧化影响的研究. *农业环境科学学报*, 2006, 25(1): 204–207]
- LIU B Y. Toxic effect and mechanism of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on *Pseudokirchneriella subcapitata*. Master's Thesis of Jinan University, 2011 [刘滨扬. 红霉素、环丙沙星和磺胺甲噁唑对羊角月牙藻的毒性效应及其作用机理. *暨南大学硕士研究生学位论文*, 2011]
- MAO L J, ZHANG C Y, YOU X C. Studies on ultrastructural of *Isochrysis zhanjiangensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1999, 14(4): 7–12 [毛连菊, 张从尧, 由学策. 湛江等鞭金藻的超微结构研究. *大连水产学院学报*, 1999, 14(4): 7–12]
- MEI J. Effect of Cd-PCB153, humic acid and Cd-PCB153 on RNA/DNA and expression of sonic hedgehog gene of marine medaka larva. Master's Thesis of Guangxi University, 2014 [梅婕. 镉、多氯联苯 153、黄腐酸和镉-多氯联苯 153 对海水青鳉仔鱼 RNA/DNA 和 Shh 基因表达的影响. *广西大学硕士研究生学位论文*, 2014]
- MOHARIKAR S, D'SOUZA J S, KULKARNI A B, *et al.* Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: Detection and functional analyses. *Journal of Phycology*, 2006, 42(2): 423–433
- MONTEIRO C M, FONSECA S C, CASTRO P M L, *et al.* Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(1): 97–103
- MU H, PENG X J, DAI N, *et al.* Toxicity of [C8mim] PF₆ to aquatic organisms. *China Environmental Science*, 2009, 29(11): 1196–1201 [牧辉, 彭新品, 戴宁, 等. 离子液体 [C8mim] PF₆ 对水生生物的毒性作用. *中国环境科学*, 2009, 29(11): 1196–1201]
- NARDI A, MINCARELLI L F, BENEDETTI M, *et al.* Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus*

- galloprovincialis*. Chemosphere, 2017, 169(5): 493–502
- NEMAT ALLA M M, HASSAN N M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(4): 202–210
- NEMAT ALLA M M. Glutathione regulation of glutathione S-transferase and peroxidase activity in herbicide treated *Zea mays*. Plant Physiology and Biochemistry, 1995, 33(2): 185–192
- NIE X P, LAN C Y, LIN L, *et al.* The effect of Aroclor 1254 on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. Acta Scientiarum Naturalium University Sunyatseni, 2002, 41(1): 68–71 [聂湘平, 蓝崇钰, 林里, 等. 多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究. 中山大学学报, 2002, 41(1): 68–71]
- NIE X P, WANG X, CHEN J F, *et al.* Toxic effects of trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin hydrochloride on a freshwater alga, *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(10): 1694–1701 [聂湘平, 王翔, 陈菊芳, 等. 三氯异氰尿酸与盐酸环丙沙星对蛋白核小球藻的毒性效应. 环境科学学报, 2007, 27(10): 1694–1701]
- PARSONS. Handbook of analytical chemistry and biological methods of seawater. Beijing: Ocean Press, 1989, 104–108 [帕森斯. 海水分析化学和生物学方法手册. 北京: 海洋出版社, 1989, 104–108]
- QIN T C, RUAN J, WANG L J. Effect of Cd on the plant photosynthesis. Environmental Science and Technology. 2000, 23(1): 33–35 [秦天才, 阮捷, 王腊娇. 镉对植物光合作用的影响. 环境科学与技术. 2000, 23(1): 33–35]
- RONTANI J F, AUBERT C. Effect of oxy-free radicals upon the phytol chain during chlorophyll *a* photodegradation. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1994, 79(3): 167–172
- RONTANI J F. Visible light-dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescence: A review. Photochemistry, 2001, 58(2): 187–202
- SHENAI-TIRODKAR P S, GAUNS M U, MUJAWAR M W A, *et al.* Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 142: 87–94
- SHENG Y, ABREU I A, CABELLI D E, *et al.* Superoxide dismutases and superoxide reductases. Chemical Reviews, 2014, 114(7): 3854–3918
- SHI Q F, CAO W R. Research overview of superoxide dismutase (SOD). Livestock and Poultry Industry, 2009(4): 66–68 [时沁峰, 曹威荣. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究概况. 畜禽业, 2009(4): 66–68]
- SONG X, LI J, CHEN L, *et al.* Determination of polychlorinated biphenyls in seawater using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry with the aid of experimental design. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2012, 23(1): 132–141
- STAUBER J L, DAVIES C M. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. Environmental Reviews, 2011, 8(4): 255–301
- STON J, KOSAKOWSKA A. Qualitative and quantitative analysis of Baltic phytoplankton pigments. Oceanologia, 2000, 42(4): 449–471
- TAIZ L, ZEIGER E. Plant physiology. Sinauer Associate Inc, Sunderland, 2006, 128–138
- TANG J, YANG H Y, LI L, *et al.* Repair effects on SOD enzyme and anti-inflammatory activity of the *Platyclusus orientalis* extract. China Surfactant Detergent and Cosmetics, 2019, 49(9): 585–589 [唐洁, 杨海延, 李利, 等. 侧柏叶提取物对SOD酶活力修复作用及抗炎功效. 日用化学工业, 2019, 49(9): 585–589]
- ULBRICH B, STAHLMANN R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): A systematic review of experimental data. Archives of Toxicology, 2004, 78(5): 252–268
- WAN L, SHAO L L, LU K H, *et al.* Effect of ultrasound on the ultrastructure and physiological characteristics of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3): 516–524 [万莉, 邵路路, 陆开宏, 等. 超声波对铜绿微囊藻超微结构和生理特性的影响. 水生生物学报, 2014, 38(3): 516–524]
- WANG X Y. Acute toxic effects of crude oil and oil dispersant on three algae. Master's Thesis of Dalian Maritime University, 2012 [王向艺. 原油和消油剂对三种藻的急性毒性效应. 大连海事大学硕士研究生学位论文, 2012]
- WU Y, CHEN X X, PAN Q C, *et al.* A study of toxicity and bioaccumulation of PCBs in two species of marine microalgae. Marine Sciences, 2017, 41(3): 61–67 [吴越, 陈星星, 潘齐存, 等. 多氯联苯在两种海洋微藻中毒性效应及富集效应的研究. 海洋科学, 2017, 41(3): 61–67]
- XU T Y, TANG W Q. Comparative analysis on isomer-specific of polychlorinated biphenyls in the dead bodies of two finless porpoise subspecies in Yangtze estuary. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(3): 337–346 [徐添翼, 唐文乔. 长江口两种江豚亚种体脂内多氯联苯同分异构体含量的比较分析. 动物学杂志, 2016, 51(3): 337–346]
- YANG H Z, LIU N, LI Y Q, *et al.* Effect of cadmium on glutathione content and related enzyme activity in main tissues of *Anodonta woodiana*. Journal of Agro-Environmental Science, 2015, 34(1): 15–21 [杨惠珍, 刘娜, 李涌泉, 等. 镉对背角无齿蚌主要组织谷胱甘肽含量和相关酶活性的影响. 农业环境科学学报, 2015, 34(1): 15–21]
- YUE W J, WANG Z H, WANG Q J, *et al.* Toxic effect of cypermethrin on *Chattonella marina*. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 39(15): 251–257 [岳文洁, 王朝晖, 王桥军, 等. 氰菊酯对海洋卡盾藻的毒性效应. 生态毒理学报, 2009, 39(15): 251–257]
- ZHANG H, ZHAO Y X, DAI C J, *et al.* Effect of vermicomposte on seedling growth and photosynthetic pigment content of *Zea mays* L. under salt stress. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(20): 122–125 [张浩, 赵雨欣, 戴川景, 等. 蚓粪添加对盐胁迫下玉米幼苗生长和光合色素含量的影响. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 122–125]
- ZHANG J H, FENG J, LÜ J P, *et al.* Toxic effects of 1, 4-dichlorobenzene on the growth and photosynthetic pigment of *Scenedesmus quadricauda*. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016, 44(3): 333–336 [张锦华, 冯佳, 吕俊平, 等. 1,4-二氯苯对四尾栅藻生长和光合色素的毒性效应. 山西农业科学, 2016, 44(3): 333–336]

- ZHANG L. Toxic effects of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on two marine microalgae. Master's Thesis of the First Institute of Oceanography, 2015 [张丽. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚(BDE-47)对两种海洋微藻的毒性效应. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2015]
- ZHANG S C, MA J Y, FAN X. Principles and applications of marine biotechnology. Beijing: Ocean Press, 1997, 97-98 [张士瑾, 马军英, 范晓. 海洋生物技术原理和应用. 北京: 海洋出版社, 1997, 97-98]
- ZHU P P, WANG D, MO W F, *et al.* Effects of heavy metal lead on the morphology and SOD, GST activity of *Aleuroglyphus ovatus*. Chinese Journal of Applied Entomology, 2019, 56(4): 702-709 [朱佩佩, 汪丁, 莫维芬, 等. 重金属铅对椭圆食粉螨形态及 SOD、GST 活性的影响. 应用昆虫学报, 2019, 56(4): 702-709]
- ZHU Y M, LIU Z G. Effects of different photosynthetic light intensity of blue LED light on the growth and pigment concentration of *Isochrysis zhanjiangensis*. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(1): 35-40 [朱永梅, 刘志刚. 不同光合光子照度 LED 蓝光对湛江等鞭金藻生长及色素含量的影响. 广东海洋大学学报, 2017, 37(1): 35-40]

(编辑 冯小花)

Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCB₁₅₃) on the Physiological Ecology and Ultrastructure of *Dicrateria zhanjiangensis*

SUN Xiaoyu, WANG Yizhe, LI Yang, XU Xu, ZHOU Wenli,
SHAO Peng, GAO Jinwei, DOU Yong, JIA Xuying^①

(College of Fishery Science, Tianjin Agriculture University;
Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture; Tianjin 300384, China)

Abstract In order to study the physiological and ecological toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) of marine microalgae, the growth, photosynthetic pigment content, glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content, and ultrastructure of *Dicrateria zhanjiangensis* were compared over 7 days under 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB₁₅₃) stress. The results showed that PCB₁₅₃ stress had significant effects on the growth, photosynthetic pigment content, antioxidant and detoxification related indexes of *D. zhanjiangensis* ($P < 0.05$). Increasing PCB₁₅₃ concentration increased the inhibition of PCB₁₅₃ on the growth of *D. zhanjiangensis*. In the 250 µg/L stress group, all the algae cells died on day five. The content of chlorophyll *a*, chlorophyll *c*, carotenoid, total light, and pigment had decreased significantly after the PCB₁₅₃ stress ($P < 0.05$). The decreasing photosynthetic pigment level was enhanced by the increase in PCB₁₅₃ concentration. The MDA content of algal cells in all stress groups increased after the PCB₁₅₃ stress. SOD and GST enzyme activities were significantly increased by low concentration PCB₁₅₃ (<25 µg/L). Both enzyme activities were significantly inhibited by high concentrations of PCB₁₅₃ (>25 µg/L). Under short-term low concentrations of PCB₁₅₃ stress, the ultrastructure of the cells changed. To be specific, the organelle morphology altered and shrunk. Under high concentrations of PCB₁₅₃ stress, the integrity of the cell membrane was destroyed, leading to cell rupture, autolysis and death. PCB₁₅₃ can inhibit the growth and synthesis of photosynthetic pigments of *D. zhanjiangensis*. Low concentrations of PCB₁₅₃ can activate the antioxidant and detoxification system. This activation improves self-protection capabilities. High concentrations of PCB₁₅₃ can aggravate lipid peroxidation and destroy the normal function of antioxidant and detoxification systems, causing cell rupture and death.

Key words *Dicrateria zhanjiangensis*; PCB₁₅₃; Photosynthetic pigment; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Glutathione S-transferase; Ultrastructure

① Corresponding author: JIA Xuying, E-mail: jiaxuying1109@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200916001

http://www.yykxjz.cn/

曾俊, 童立豪, 吴翔宇, 黄敏, 唐贤明. 不同营养盐条件对琼枝生长的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 168-176
ZENG J, TONG L H, WU X Y, HUANG M, TANG X M. Effects of different nutrient conditions on the growth of *Betaphycus gelatinae*.
Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 168-176

不同营养盐条件对琼枝生长的影响*

曾俊¹ 童立豪^{2,3} 吴翔宇¹ 黄敏¹ 唐贤明^{1①}

1. 海南省海洋与渔业科学院 海南省热带海水养殖技术重点实验室 海南 海口 571126;
2. 广西科学院广西红树林研究中心 广西红树林保护和利用重点实验室 广西 北海 536007;
3. 海南大学海洋学院 海南 海口 570228)

摘要 本研究分别测定了不同无机氮浓度(50、100、200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$)、不同无机磷浓度(2.5、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$)和不同氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)浓度比(0/100、25/75、50/50、75/25 和 100/0)培养条件下,琼枝(*Betaphycus gelatinae*)生长及色素含量的变化,评估适合其生长的营养盐条件。结果显示,适合琼枝生长的无机氮浓度为 0~200 $\mu\text{mol/L}$,无机磷浓度为 2.5~10 $\mu\text{mol/L}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比为 25/75。在适宜的营养盐条件范围内,琼枝生长状态较好,具有较高的增重率;而当无机氮浓度超过 200 $\mu\text{mol/L}$ 、无机磷浓度超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 或 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比高于 50/50 时,培养初期,琼枝生长缓慢,具有一定的耐受能力,但培养时间过长,不利于琼枝正常生长,引起藻体白烂严重、增重率急剧下降。本研究表明,琼枝适合在低营养盐环境下生长,结果可为琼枝规模化增殖栽培提供理论基础。

关键词 琼枝; 营养盐; 生长; 色素

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0168-09

琼枝 (*Betaphycus gelatinae*) 隶属于红藻门 (Rhodophyta)、真红藻纲 (Florideae)、杉藻目 (Gigartinales)、红翎菜科 (Solieriaceae)、琼枝藻属 (*Betaphycus*), 是中国南海特有的土著品种, 是麒麟菜族 (Eucheumatoidae) 的重要栽培海藻之一, 主要分布在热带和亚热带海区 (邢诒炫等, 2019)。藻体多呈紫红色或黄绿色, 由扁平分枝组成, 分枝上有疣状突起 (何培民等, 2018)。琼枝具有较高的经济价值, 可以直接食用。李继伟等 (2020) 研究发现, 琼枝是一种低脂肪、高纤维、不饱和脂肪酸和矿物元素丰富的天

然保健食品, 具有较高的营养保健价值。琼枝也是提取卡拉胶的重要原料之一, 卡拉胶可用做胶凝剂、增稠剂、保鲜剂等, 广泛应用于食品、医学科研和化学工业等领域 (Hou *et al*, 2015; 邓春梅等, 2017)。琼枝可用作养殖生物的优质饵料, 南方紫海胆 (*Anthocidaris crassispina*) 对其嗜食性较高 (聂永康等, 2016)。此外, 琼枝还可药用, 有报道称琼枝富含的海藻多糖类活性物质具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗辐射以及降血脂等功效 (Damonte *et al*, 2004; 于娟等, 2017; Chew *et al*, 2008)。

* 海南省重点研发计划 (ZDYF2020176)、现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-50)、海洋公益性行业科研专项经费项目 (201405020) 和海南省科研院所技术研发专项 (Q63699) 共同资助 [This work was supported by Hainan Provincial Key Research and Development Program (ZDYF2020176), China Agriculture Research System (CARS-50), Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201405020), and Technical Research and Development Projects of Research Institutions in Hainan Province (Q63699)]. 曾俊, E-mail: 1207615382@qq.com

① 通讯作者: 唐贤明, 研究员, E-mail: hn.tangxm@aliyun.com

收稿日期: 2020-09-16, 收修改稿日期: 2020-10-10

近年来,麒麟菜成为全球养殖产量第一的藻类,年产量高达 1000 万 t 以上(联合国粮食及农业组织,2020)。而中国栽培的麒麟菜产量仍然较低,琼枝产量更是少之又少,涉及的因素主要是养殖模式落后、海域限制以及海洋环境的变化等(邢诒炫等,2019)。多年以来,前人在琼枝养殖模式上进行了大量栽培实验,郑冠雄(2008)独创了采用水泥框网片养殖技术栽培琼枝。此外,还有鱼排浮筏式挂养技术以及西沙礁盘海区底播养殖技术等(杨湘勤等,2015;陈攀等,2018)。尽管琼枝在养殖模式上取得了一定的成功,但依旧因产量低而难以满足市场需求。环境因子是藻类产量的决定因素之一,梁磊等(2014)和方哲等(2012a、b)研究发现,琼枝能够在实验室小水体环境中,在海水温度为 21℃~36℃、光照强度为 500~11000 lx、海水相对密度为 1.014~1.030 的条件下正常生长,环境因子超过或低于上述范围均不利于琼枝健康生长,为琼枝环境适应性研究提供了一定的理论基础。营养盐也是影响藻类生长的重要环境因子,葛红星等(2019)研究表明,在温度一定时,氮源对浒苔(*Ulva prolifera*)的生长速率有显著影响。韩婷婷等(2018)研究发现,不同氮源和氮浓度对半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)幼苗的生长和部分生化组成有显著影响。黄中坚等(2014)研究发现,芋根江篱(*Gracilaria blodgettii*)在适宜的营养盐条件下生长速率和生化组分表现较好。此外,营养盐含量的升高也是造成海水富营养化的原因,研究发现,极北海带(*Laminaria hyperborea*)在适宜温度对氮

磷有显著的去除作用(袁艳敏等,2020),在日照海域养殖紫菜(*Pyropia*)有利于降低该海域的氮磷水平(梁洲瑞等,2019),琼枝也可有效去除富营养化海水中的氮磷,起到净化水质的作用(李春强等,2015)。因此,研究琼枝生长的营养盐水平具有十分重要的现实意义。本研究通过模拟工厂化养殖模式,在大水体环境下设置不同的营养盐浓度培养琼枝,探究营养盐对琼枝的影响,不仅为琼枝规模化增殖栽培奠定基础,同时可为利用海藻进行生态环境治理提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验琼枝于 2019 年取自海南省海洋与渔业科学院琼海科研基地养殖池,养殖池长×宽×高为 10.0 m×1.0 m×1.5 m。琼枝于养殖池暂养 6 个月,与海区养殖的琼枝外观形态有少许差异(图 1)。海区琼枝分枝紧密,芽尖较多,藻体正面和背面因光照影响颜色区分明显,而养殖池暂养的琼枝分枝疏松光滑,芽尖较少,藻体正面及背面颜色基本相同且难以区分。暂养期培养液为过滤自然海水,经不间断化学分析仪(CleverChem 200, DeChemTech, 德国)检测,海水无机氮本底浓度为 28.29 μmol/L,无机磷本底浓度为 0.65 μmol/L,海水温度为 23℃~28℃,盐度为 30。挑选颜色正常、大小均一和生长旺盛的藻体,清洗表面附着生物与杂藻后直接用于实验。



图 1 海区琼枝和实验琼枝的外观形态

Fig.1 Appearance morphology of *B. gelatinae* cultured in sea area and used in this experiment

A: 海区琼枝正面; B: 海区琼枝背面; C: 实验琼枝

A: Front view of *B. gelatinae* from the sea area; B: Rear view of *B. gelatinae* from the sea area; C: *B. gelatinae* used in this experiment

1.2 实验设计

研究在琼海基地养殖车间的大水体环境下进行,为保留琼枝藻体完整枝芽,藻体初始鲜重控制在 2.5 g 左右。将琼枝藻体固定于上口口径为 36 cm、高为 13 cm 的红色塑料筐中,然后将红色塑料筐分别悬浮于容量

为 100 L 水体的白色塑料桶中,进行营养盐梯度实验,每个白色塑料桶内壁固定一个小水泵保持水体循环流动。无机氮浓度实验共设置 50、100、200、400 和 800 μmol/L 五个梯度,此时, NH₄⁺-N/NO₃⁻-N 浓度比和无机磷浓度分别设定为 1:1 和 10 μmol/L;无机磷浓度实验共设置 2.5、5、10、20、40 和 80 μmol/L 六

个梯度,此时无机氮浓度和 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比分别设定为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 1:1;不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比实验共设置 0/100、25/75、50/50、75/25 和 100/0 五个梯度,此时无机氮浓度和无机磷浓度分别设定为 100 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 。实验所用培养水体均为在过滤后的自然海水营养盐本底浓度基础上再人工添加不同梯度的 NaNO_3 、 NH_4HCO_3 和 KH_2PO_4 ,以满足实验营养盐浓度要求,对照组以本底浓度的自然海水作为培养水体,每个处理设置 3 个重复。培养水体温度约为 $26^\circ\text{C}\sim 28^\circ\text{C}$,盐度为 30,光照强度约为 $80\sim 100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照周期为 12:12 (L:D),每隔 1 周更换 1 次培养水体并称量琼枝鲜重,实验持续 5 周后取样测定琼枝光合色素含量。

1.3 实验方法

琼枝的生长通过测定增重率(weight gain rate, WGR, %)来表示,即藻体鲜重的变化,利用下列公式求得(Lideman *et al.*, 2011):

$$\text{WGR}(\%) = [(M_1 - M_0) / M_0] \times 100\%$$

式中, M_0 为藻体初始鲜重(g), M_1 为 5 周后的藻体鲜重(g),称量前用吸水纸快速吸干藻体表层水。

采用甲醇提取法测定藻体叶绿素 a (Chl. a)和类胡萝卜素(Car),采用磷酸缓冲液(pH 6.8)提取法测定藻体藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)。Chl. a 的含量参考 Porra (2002)的公式计算; Car 的含量参考 Parsons 等(1963)的公式计算;PE 和 PC 的含量参考 Beer 等(1985)的公式计算,具体公式如下:

$$C_{\text{Chl.}a}(\mu\text{g/mL}) = 16.29 \times (A_{665} - A_{750}) - 8.54 \times (A_{652} - A_{750})$$

$$C_{\text{Car}}(\mu\text{g/mL}) = 7.6 \times [(A_{480} - A_{750}) - 1.49 \times (A_{510} - A_{750})]$$

样品 Chl. a 或 Car 含量($\mu\text{g/g}$ FW) = $[(C_{\text{Chl.}a}$ 或 $C_{\text{Car}}) \times V] / W_F$

$$C_{\text{R-PE}}(\mu\text{g/mL}) = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0.2] \times 0.12$$

$$C_{\text{R-PC}}(\mu\text{g/mL}) = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{595} - A_{645}) \times 0.51] \times 0.15$$

样品 R-PE 或 R-PC 含量($\mu\text{g/g}$ FW) = $[(C_{\text{R-PE}}$ 或 $C_{\text{R-PC}}) \times V] / W_F$
式中, $C_{\text{Chl.}a}$ 为提取液叶绿素的浓度($\mu\text{g/mL}$); C_{Car} 为提取液类胡萝卜素的浓度($\mu\text{g/mL}$); $C_{\text{R-PE}}$ 为提取液藻

红蛋白的浓度($\mu\text{g/mL}$); $C_{\text{R-PC}}$ 为提取液藻蓝蛋白的浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为样品提取液总体积(mL),实验研究中为 5 mL; W_F 为样品鲜重(g),以实际称取为准; A 为提取液在相应波长下的吸光值。

1.4 数据处理

应用 Excel 和 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行处理与统计分析,并采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异,以 $P < 0.05$ 表示差异显著水平。

2 结果

2.1 不同营养盐水平对琼枝生长的影响

2.1.1 无机氮对琼枝生长的影响 在不同无机氮浓度培养条件下,琼枝每周鲜重变化和最终增重率见表1和图2A。结果显示,在无机磷浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,不同的无机氮浓度对琼枝生长具有显著影响。琼枝在对照组和氮浓度为 50~200 $\mu\text{mol/L}$ 范围内能持续增长,藻体状态正常,养殖 5 周后琼枝的增重率无显著差异($P > 0.05$),藻体增重率最高,达 $(38.08 \pm 12.35)\%$;氮浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,琼枝在前 3 周保持轻微增长,第 4 周藻体出现白烂现象,鲜重开始下滑,最终藻体增重率显著低于对照组和氮浓度为 50~200 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$)的组;氮浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,第 1 周藻体出现少量白烂,第 2 周藻体腐烂严重,藻体鲜重急剧下降,后续周期无法测量。

2.1.2 无机磷对琼枝生长的影响 在不同无机磷浓度培养条件下,琼枝每周鲜重变化和最终增重率见表2和图2B。结果显示,无机氮浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,不同无机磷浓度对琼枝生长具有显著影响。琼枝在对照组和磷浓度为 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内能持续增长;磷浓度在 40~80 $\mu\text{mol/L}$ 范围时,琼枝前 4 周保持缓慢增长,第 5 周藻体鲜重有下降趋势,藻体微烂

表 1 不同无机氮浓度条件下琼枝的鲜重($n=3$)

Tab.1 Fresh weight of *B. gelatinae* at different conditions of inorganic nitrogen concentration ($n=3$)

无机氮浓度 Inorganic nitrogen concentration/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	初始鲜重 Initial fresh weight/g	鲜重 Fresh weight/g				
		第 1 周 Week 1	第 2 周 Week 2	第 3 周 Week 3	第 4 周 Week 4	第 5 周 Week 5
0	2.68±0.74	2.74±0.72	3.03±0.83	3.19±0.83	3.47±0.79	3.55±0.89
50	3.00±0.61	3.03±0.61	3.14±0.60	3.25±0.56	3.53±0.67	3.92±0.49
100	2.79±1.02	2.87±1.01	2.99±1.01	3.17±1.08	3.55±1.10	3.77±1.15
200	3.32±0.84	3.38±0.87	3.55±0.96	3.65±0.83	3.93±0.94	4.24±0.94
400	3.27±0.07	3.38±0.07	3.54±0.07	3.64±0.19	3.40±0.30	3.31±0.04
800	2.78±0.78	2.71±0.73	1.88±1.03	-	-	-

并出现断裂现象。结果显示, 琼枝在对照组和低磷浓度(2.5~10 $\mu\text{mol/L}$)条件下增重率均高于高磷浓度(20~80 $\mu\text{mol/L}$)条件下的增重率, 其中, 琼枝在磷浓度为2.5~5 $\mu\text{mol/L}$ 条件下的增重率显著高于磷浓度为20~80 $\mu\text{mol/L}$ 条件下的增重率($P<0.05$), 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的磷浓度培养条件下, 琼枝增重率最高, 达(52.06 \pm 5.04)%。

2.1.3 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比对琼枝生长的影响

在不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比培养条件下, 琼枝每周的鲜重变化和最终增重率见表3和图2C。结果显示, 在无机氮浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 、无机磷浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 不同处理组的琼枝在5周培养周期里均保持稳定增长。结果显示, 琼枝增重率随 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度

表2 不同无机磷浓度条件下琼枝的鲜重($n=3$)

Tab.2 Fresh weight of *B. gelatinae* at different conditions of inorganic phosphorus concentration ($n=3$)

无机磷浓度 Inorganic phosphorus concentration/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	初始鲜重 Initial fresh weight/g	鲜重 Fresh weight/g				
		第1周 Week 1	第2周 Week 2	第3周 Week 3	第4周 Week 4	第5周 Week 5
0	2.68 \pm 0.74	2.74 \pm 0.72	3.03 \pm 0.83	3.19 \pm 0.83	3.47 \pm 0.79	3.55 \pm 0.89
2.5	2.34 \pm 0.24	2.49 \pm 0.25	2.69 \pm 0.25	2.77 \pm 0.26	3.24 \pm 0.29	3.55 \pm 0.33
5	2.79 \pm 0.51	2.94 \pm 0.53	3.18 \pm 0.56	3.26 \pm 0.59	3.66 \pm 0.65	3.94 \pm 0.71
10	2.79 \pm 1.02	2.87 \pm 1.01	2.99 \pm 1.01	3.17 \pm 1.08	3.55 \pm 1.10	3.77 \pm 1.15
20	2.89 \pm 0.90	3.07 \pm 0.94	3.12 \pm 0.99	3.19 \pm 1.02	3.33 \pm 1.03	3.44 \pm 1.14
40	2.26 \pm 0.84	2.45 \pm 0.95	2.51 \pm 0.96	2.56 \pm 1.08	2.84 \pm 1.18	2.80 \pm 1.46
80	3.18 \pm 0.66	3.24 \pm 0.72	3.36 \pm 0.82	3.44 \pm 0.88	3.60 \pm 0.91	3.29 \pm 0.65

表3 不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比条件下琼枝的鲜重($n=3$)

Tab.3 Fresh weight of *B. gelatinae* at different conditions of ratio of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($n=3$)

$\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$	初始鲜重 Initial fresh weight/g	鲜重 Fresh weight/g				
		第1周 Week 1	第2周 Week 2	第3周 Week 3	第4周 Week 4	第5周 Week 5
0/0	2.68 \pm 0.74	2.74 \pm 0.72	3.03 \pm 0.83	3.19 \pm 0.83	3.47 \pm 0.79	3.55 \pm 0.89
0/100	2.30 \pm 0.19	2.41 \pm 0.18	2.47 \pm 0.22	2.63 \pm 0.21	2.89 \pm 0.28	3.09 \pm 0.29
25/75	2.10 \pm 0.41	2.30 \pm 0.45	2.40 \pm 0.45	2.56 \pm 0.40	2.96 \pm 0.40	3.13 \pm 0.33
50/50	2.79 \pm 1.02	2.87 \pm 1.01	2.99 \pm 1.01	3.17 \pm 1.08	3.55 \pm 1.10	3.77 \pm 1.15
75/25	2.48 \pm 0.35	2.60 \pm 0.38	2.70 \pm 0.31	2.73 \pm 0.32	3.03 \pm 0.37	3.13 \pm 0.54
100/0	1.88 \pm 0.08	2.00 \pm 0.03	2.07 \pm 0.06	2.14 \pm 0.06	2.26 \pm 0.18	2.29 \pm 0.04

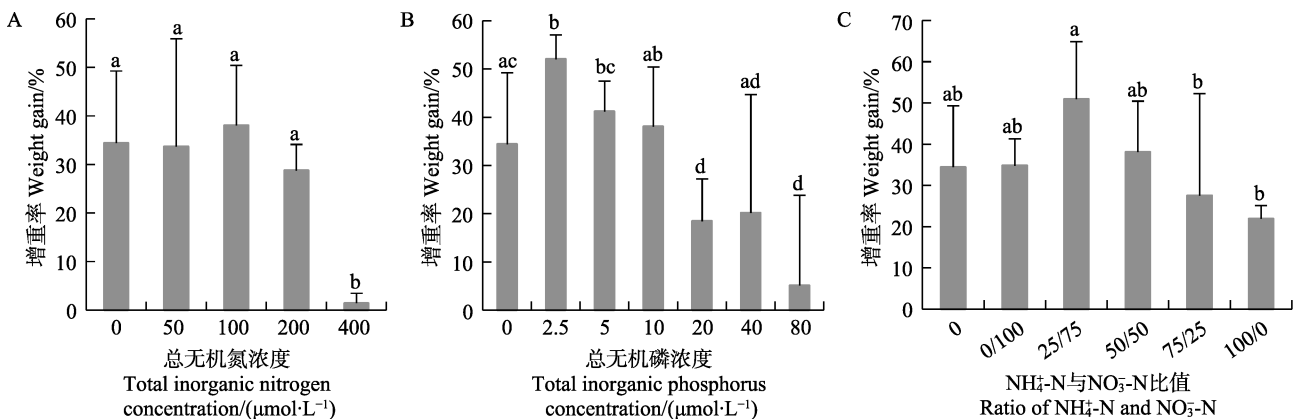


图2 在不同总无机氮浓度(A)、总无机磷浓度(B)和 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比(C)的培养条件下琼枝的增重率($n=3$)

Fig.2 Weight gain rate of *B. gelatinae* at different conditions of total inorganic nitrogen concentration (A), total inorganic phosphorus concentration (B) and ratio of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (C) after 5 weeks ($n=3$)

不同小写字母代表不同处理间有显著性差异($P<0.05$), 下同

Different lowercase letters indicate significance level at $P<0.05$ among different treatments. The same as below

比的递增呈现先增高后降低的趋势,其中, $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为 25/75 时,琼枝的增重率达到最高,为(50.91±13.97)%,显著高于 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为 75/25 和 100/0 时($P<0.05$),与 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为 0/100 和 50/50 时以及对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.2 不同营养盐水平对琼枝光合色素(Chl.a、Car、PE 和 PC)含量的影响

2.2.1 无机氮对琼枝光合色素含量的影响

不同无机氮浓度对琼枝光合色素含量的影响见图 3A 和图 3B。结果显示,琼枝在对照组的 Chl.a 和 Car 含量均低于实验组,但随着氮浓度的改变,Chl.a 和 Car 含量总体变化不大。藻体在氮浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,Chl.a 和 Car 的含量最高,分别为(100.78±18.29)和(28.29±4.19) $\mu\text{g/g}$; PE 和 PC 含量随着氮浓度的升高均逐渐递增,在氮浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,PE 和 PC 含量最高,分别为(737.71±63.27)和(89.30±9.04) $\mu\text{g/g}$,显著高于其他氮浓度组($P<0.05$)。

2.2.2 无机磷对琼枝光合色素含量的影响

不同无机磷浓度对琼枝光合色素含量的影响见图 3C 和图 3D。结果显示,实验设置的磷浓度梯度对琼枝光合色素含量影响均不明显。藻体 Chl.a 和 Car 含量在低磷浓度组(0~10 $\mu\text{mol/L}$)总体上低于高磷浓度组(20~80 $\mu\text{mol/L}$)。在磷浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,Chl.a 和 Car 含量最高,分别为(102.66±12.10)和(35.01±6.27) $\mu\text{g/g}$,而磷浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,PE 和 PC 含量最高,分别为(599.22±90.26)和(70.98±10.22) $\mu\text{g/g}$ 。

2.2.3 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比对琼枝光合色素含量的影响

不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比对琼枝光合色素的影响见图 3E 和图 3F,结果显示,不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比对琼枝光合色素含量影响同样不明显。但藻体 Chl.a 和 Car 的含量在 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比较高组(75/25 和 100/0)略高于 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比较低组(0/100、25/75 和 50/50)。 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比为 75/25 时,Chl.a 含量达到最高,为(97.92±7.96) $\mu\text{g/g}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比为 100/0 时,Car 含量达到最高,为(30.10±5.77) $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

营养盐是限制藻类生长的主要环境因子之一,主要包括氮和磷等营养元素,适量浓度的氮、磷能够促进藻类快速生长。目前,已有大量文献报道营养盐与藻类生长的关系(Karina *et al.*, 2017; 韩汶均等, 2019)。杨湘勤(2017)研究发现,琼枝对水体无机氮、

磷的吸收速率随氮、磷浓度的增加呈递增趋势,当氮、磷达到一定浓度,氮、磷吸收速率呈下降趋势,过高浓度的氮、磷对海藻有一定毒害作用。在本研究中,琼枝的增重率在低氮实验组(50~200 $\mu\text{mol/L}$)显著高于高氮实验组(400~800 $\mu\text{mol/L}$),琼枝的增重率在低磷实验组(0~10 $\mu\text{mol/L}$)同样高于高磷实验组(20~80 $\mu\text{mol/L}$)。李俊等(2013)研究同样发现,海区氮、磷含量的降低有利于琼枝的生长,低潮带上部到低潮带下部氮、磷含量逐渐减小,琼枝生长效果越来越好。这与本研究的结果基本一致,故可以表明琼枝是一种适合低营养盐环境的热带海藻。当营养盐浓度恒定时,不同形态的营养盐比例是决定海藻生长状态的重要因素。黄鹤忠等(2006)研究发现,将不同形态的无机氮按适合细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et* Xia)生活习性的配比混合,细基江蓠繁枝变型的生长更好。本研究发现,将氮、磷固定在适合琼枝生长的浓度时,琼枝增重率随 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比的递增呈先增高后降低的趋势,其中, $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比为 25/75 时,琼枝的增重率达到最高值,为(50.91±13.97)%,说明不同氮源比例有效影响着琼枝的生长,在氮浓度一定的情况下,琼枝相对更容易吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 以 1/3 配比的环境中琼枝生长更加旺盛。黄鹤忠等(2006)研究发现,不同的 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比对细基江蓠繁枝变型的生长速率影响显著,过高或过低的 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比均不利于江蓠生长,这与本研究结果一致。但李洋等(2016)和李春强等(2015)研究发现,琼枝优先吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,其次才吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,这与本研究结果相反。作者认为,造成研究结果不同可能是由于本研究实验周期较长,每周分别补充恒定浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)和比例的氮源,以琼枝的生长为依据,并且本研究在只有 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时($\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比为 100/0)琼枝的增重率达到最低为(21.88±3.24)%。而李洋等(2016)和李春强等(2015)的实验周期较短,氮浓度维持在 50 $\mu\text{mol/L}$ 以下且没有补充,都是以琼枝对氮的吸收速率为依据。此外,乔倩等(2016)研究发现,在 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和尿素按一定比例混合条件下,中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)的生长状况比单一氮源时更好,最佳生长出现在尿素/ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为 3/1 的实验组中。说明,氮源的不同及配比不仅影响大藻生长,对微藻同样产生明显影响。而另有文献报道表明,不同氮源对龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)(徐永健等, 2006)和隅江蓠(*Gracilaria cornea*)(Navarro-Angulo *et al.*, 1999)的生长影响差异不显著。唐贤明等(2015)研究

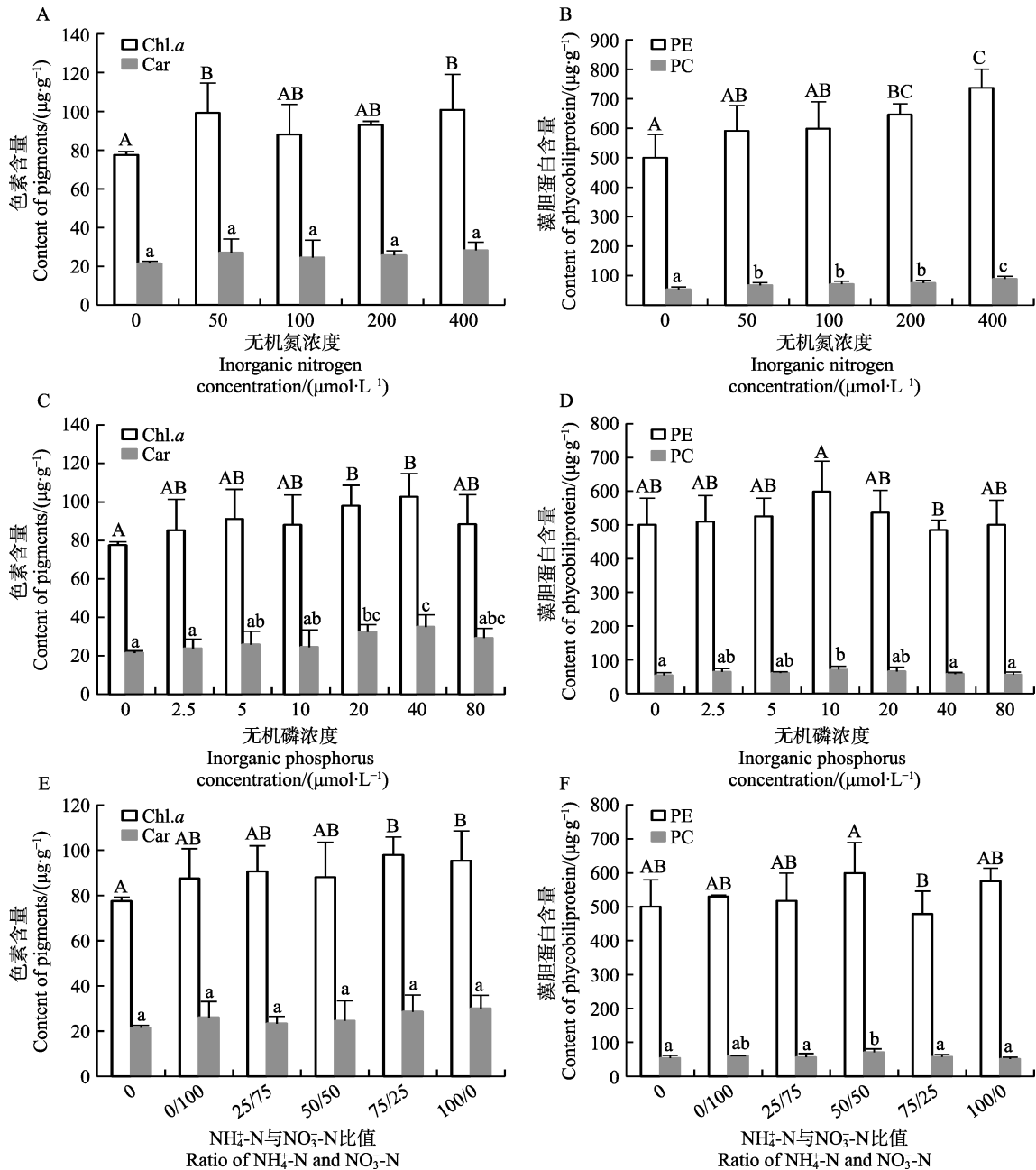


图3 不同无机氮浓度、无机磷浓度和 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 比值对琼枝光合色素含量的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different inorganic nitrogen concentration, inorganic phosphorus concentration and ratio of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ on photosynthetic pigments contents of *B. gelatinae* ($n=3$)

发现, 10 mg/L 的 NH_4CO_3 虽能显著促进芋根江蓠 (*Gracilaria blodgettii*) 生长, 但 NaNO_3 、 NH_4NO_3 和尿素对芋根江蓠的相对生长率并无显著的差异, 这种现象表明, 不同氮源对不同海藻生长的影响程度有一定差异。

光合色素包含叶绿素 *a* (Chl.*a*)、类胡萝卜素(Car)和藻胆素等, 其中, Chl.*a* 是光合作用的主要色素, 能够有效吸收光能、保护光合机构免于光破坏、稳定捕光复合体的结构; Car 主要作为辅助色素, 还有防

御光氧化破坏以及抗氧化剂的作用; 藻胆素与脱辅基蛋白结合成藻胆蛋白, 在光能吸收上同样发挥重要作用(Ke, 2001; 许大全, 2013)。植物生存依赖于光合色素, 其含量的高低是反应植物生理活性变化的重要指标。本研究发现, 琼枝的 PE 和 PC 含量除了随无机氮浓度的升高而显著上升外, 在不同磷浓度和氮源配比实验中均无明显差异; 不同氮、磷浓度和氮源配比对琼枝的 Chl.*a* 和 Car 含量均无明显影响。黄中坚等(2014)同样发现, 随着无机氮浓度的升高, 芋根江蓠

的 PE 和 PC 含量也明显升高, Chl.a 和 Car 含量则无明显变化; 不同氮源配比实验中芋根江蓠光合色素含量均无明显差异, 这与本研究结果基本一致。而王艳平(2017)研究发现, 不同氮浓度和氮源比对缢江蓠 (*Gracilaria salicornia*) 光合色素含量均有影响。造成实验结果的差异可能是受养殖环境、养殖品种以及设置的营养盐水平等因素的影响。因此, 作者推测在其他环境条件相同的情况下, 在本研究设定的营养盐条件范围内养殖琼枝, 营养盐不是决定琼枝光合色素含量最主要的环境因素, 需要开展进一步研究。此外, 本研究在养殖车间大水体的环境中利用水泵促进流水的方式, 可以建立琼枝工厂化养殖模式, 尽可能将培养条件与海区环境的差异降到最低, 旨在突破养殖海域的限制, 为实现琼枝工厂化养殖奠定前提条件与理论基础。

参 考 文 献

- BEER S, ESHEL A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 1985, 36(6): 785–792
- CHEN P, CHEN Y, MA J, *et al.* Bottom sowing culture technology of *E. gelatinae* in Xisha reef area. *Journal of Hainan Tropical Ocean University*, 2018, 25(5): 13–17 [陈攀, 陈燕, 马军, 等. 西沙礁盘区琼枝麒麟菜底播养殖技术研究. 海南热带海洋学院学报, 2018, 25(5): 13–17]
- CHEW Y L, LIM Y Y, OMAR M, *et al.* Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(6): 1067–1072
- DAMONTE EB, MATULEWICZ MC, CEREZO AS. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(18): 2399–2419
- DENG C M, WU Z J, HE L Z, *et al.* Technological optimization of alkali pretreatment in the carrageenan extraction from *Eucheuma gelatinae*. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(22): 178–183 [邓春梅, 吴祖件, 何兰珍, 等. 碱法预处理琼枝麒麟菜提取卡拉胶的工艺优化. 食品工业科技, 2017, 38(22): 178–183]
- FANG Z, LIU M, LIANG L, *et al.* The effect of different light intensity on the growth and pigment content of *Betaphycus gelatinum*. *Journal of Aquaculture*, 2012a, 33(10): 44–46 [方哲, 刘敏, 梁磊, 等. 光照强度对琼枝麒麟菜生长及色素含量的影响. 水产养殖, 2012a, 33(10): 44–46]
- FANG Z, LIU M, LIANG L, *et al.* The effect of seawater relative density on the growth and the carrageenan and pigment content of the agar *Eucheuma (Betaphycus gelatinum)*. *Journal of Tropical Organisms*, 2012b, 3(3): 204–207 [方哲, 刘敏, 梁磊, 等. 海水相对密度对琼枝麒麟菜的生长及其卡拉胶、色素含量的影响. 热带生物学报, 2012b, 3(3): 204–207]
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. 2020, 31–32 [联合国粮食及农业组织. 2020 年世界渔业和水产养殖状况: 可持续发展在行动. 2020, 31–32]
- GE H X, CHEN Z, LI J, *et al.* Effects of temperature on the growth rate and nitrogen uptake of *Ulva prolifera*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 138–144 [葛红星, 陈钊, 李健, 等. 温度对浒苔生长及不同氮源吸收特性的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 138–144]
- HAN T T, QI Z H, HUANG H H, *et al.* Effects of enrichment with three nitrogen sources on growth and biochemical composition of *Sargassum hemiphyllum* seedlings. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 159–166 [韩婷婷, 齐占会, 黄洪辉, 等. 3 种氮源加富对半叶马尾藻幼苗生长和生化组成的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 159–166]
- HAN W J, XU Y T, JIANG Y Y, *et al.* Effects of N/P ratio, salinity and pH on growth and photosynthesis of sea weed *Chaetomorpha valida*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(6): 776–784 [韩汶均, 许彦婷, 蒋阳杨, 等. 氮磷比、盐度、pH 对强壮硬毛藻生长和光合作用的影响. 大连海洋大学学报, 2019, 34(6): 776–784]
- HE P M, ZHANG Z Y, ZHANG X C, *et al.* Seaweed cultivation. Beijing: Science Press, 2018, 329–332 [何培民, 张泽宇, 张学成, 等. 海藻栽培学. 北京: 科学出版社, 2018, 329–332]
- HOU P, LI M, CHEN D M, *et al.* Morphological comparison and composition analysis of wild and farmed *Eucheuma gelatinae* in Hainan Province. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2015, 7(6): 370–371
- HUANG H Z, SUN J Y, SHEN H, *et al.* Effects of different inorganic nitrogen sources and concentrations on the growth and biochemical constituents of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et Xia*. *Marine Sciences*, 2006, 30(9): 23–27 [黄鹤忠, 孙菊燕, 申华, 等. 无机氮浓度及其配比对细基江蓠繁枝变型生长及生化组成的影响. 海洋科学, 2006, 30(9): 23–27]
- HUANG Z J, ZHONG Z H, SONG Z M, *et al.* Effect of different nutrient salts on growth and chemical constituents of *Gracilaria blodgettii*. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(5): 30–38 [黄中坚, 钟志海, 宋志民, 等. 不同营养盐水平对芋根江蓠的生长及生化组分的影响. 南方水产科学, 2014, 10(5): 30–38]
- KARINA B, AGIJA L, FRANCESCO R, *et al.* Seaweed cultivation laboratory testing: Effects of nutrients on growth rate of *Ulva intestinalis*. *Energy Procedia*, 2017, 113(1): 454–459
- KE B. Photosynthesis: Photobiochemistry and photobiophysics. Netherlands: Springer, 2001, 1187
- LI C Q, YU X L, WANG S C, *et al.* Purification of *Eucheuma gelatinae* on nitrogen and phosphorus and effect on the level

- of chlorophyll *a* in eutrophic seawater. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(2): 190–193, 239 [李春强, 于晓玲, 王树昌, 等. 琼枝麒麟菜对富营养化海水氮磷的去除及对水体中 Chl *a* 含量的影响. *海洋环境科学*, 2015, 34(2): 190–193, 239]
- LI J W, YANG X Q, PAN C, *et al.* Nutritional analysis and evaluation of *Euचेuma gelatinae*. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(15): 265–269 [李继伟, 杨贤庆, 潘创, 等. 琼枝麒麟菜的营养成分分析与评价. *食品与发酵工业*, 2020, 46(15): 265–269]
- LI J, QIU Y, HUANG B, *et al.* Effect of marine environment factors on the morphological characteristics of *Betaphycus gelatinum*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(13): 127–128, 155 [李俊, 邱勇, 黄勃, 等. 海洋环境因子对琼枝麒麟菜形态特征的影响. *广东农业科学*, 2013, 40(13): 127–128, 155]
- LI Y, DUAN Z L, HUANG B, *et al.* The effects of N, P concentrations of sea water on the N, P absorption by *Betaphycus gelatinum*. *Journal of Tropical Biology*, 2016, 7(1): 30–35 [李洋, 段泽林, 黄勃, 等. 藻场海水氮磷含量对琼枝氮磷吸收的影响. *热带生物学报*, 2016, 7(1): 30–35]
- LIANG L, FANG Z, HUANG H Q, *et al.* The effect of temperature on the growth and pigment content of *Betaphycus gelatinum*. *Marine Sciences*, 2014, 38(3): 87–90 [梁磊, 方哲, 黄惠琴, 等. 温度对琼枝麒麟菜生长及色素含量的影响. *海洋科学*, 2014, 38(3): 87–90]
- LIANG Z R, SUN T Q, WANG W J, *et al.* The temporal and spatial distribution characteristics of the nutrient and community structures of phytoplankton and their relationships in the *Pyropia* culture areas in Rizhao, China. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 78–88 [梁洲瑞, 孙藤芹, 汪文俊, 等. 日照紫菜养殖海域营养盐的时空分布特征及其与浮游植物群落结构的相关性分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 78–88]
- LIDEMAN, NISHIHARA G, NORO T, *et al.* *In vitro* growth and photosynthesis of three edible seaweeds, *Betaphycus gelatinus*, *Euचेuma serra* and *Meristotheca papulosa* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Japanese Society for Aquaculture Science*, 2011, 59(4): 563–571
- NAVARRO-ANGULO L, ROBLEDO D. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia*, 1999, 398: 315–320
- NIE Y K, CHEN P M, ZHOU Y B, *et al.* Preliminary study on feeding habits of *Anthocidaris crassispina*. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 1–8 [聂永康, 陈丕茂, 周艳波, 等. 南方紫海胆摄食习性的初步研究. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 1–8]
- PARSONS T R, STRICKLAND J D H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations of ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research*, 1963, 21(3): 155–163
- PORRA R J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research*, 2002, 73: 149–156
- QIAO Q, WANG Z H, GUO X. Effects of nitrogen sources on the growth of *Skeletonema costatum*. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(8): 2110–2116 [乔倩, 王朝晖, 郭鑫. 不同氮源对中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)生长的影响. *生态学杂志*, 2016, 35(8): 2110–2116]
- TANG X M, JIN Y M, LIU T, *et al.* Preliminary establishment of a rapid multiplication system for *Gracilaria blodgettii*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 39–45 [唐贤明, 金月梅, 刘涛, 等. 芋根江蓠快速生长条件的研究. *海洋湖沼通报*, 2015(3): 39–45]
- WANG Y P. Preliminary study on experimental ecology of *G. salicornia*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2017, 26–38 [王艳平. 缙江蓠实验生态学的初步研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2017, 26–38]
- XING Y X, ZENG J, WU X Y, *et al.* Cultivation status and application prospect of three tropical economic seaweeds. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019(6): 112–120 [邢治炫, 曾俊, 吴翔宇, 等. 三种热带经济海藻养殖现状与应用前景. *海洋湖沼通报*, 2019(6): 112–120]
- XU D Q. *Photosynthesis*. Beijing: Science Press, 2013, 41–43, 106–112, 191–198 [许大全. 光合作用学. 北京: 科学出版社, 2013: 41–43, 106–112, 191–198]
- XU Y J, QIAN L M, WANG Y S. Effects of nitrogen nutrients on growth rate and pigment compositions of *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Oceanography In Taiwan Strait*, 2006, 25(2): 222–228 [徐永健, 钱鲁闽, 王永胜. 氮素营养对龙须菜生长及色素组成的影响. *台湾海峡*, 2006, 25(2): 222–228]
- YANG X Q, DING J J, HUANG B, *et al.* The techniques of *Euचेuma gelatinae* culture model and economic benefit analysis. *Fishery Modernization*, 2015, 42(6): 16–19, 25 [杨湘勤, 丁敬敬, 黄勃, 等. 琼枝麒麟菜养殖方式及其效益分析. *渔业现代化*, 2015, 42(6): 16–19, 25]
- YANG X Q. Studies on the growth rate and absorption rate of nitrogen and phosphorus of three species of *Euचेuma*. Master's Thesis of Hainan University, 2017, 24–25 [杨湘勤. 三种麒麟菜对氮磷的吸收速率及在鱼排和深海网箱中生长速度的研究. 海南大学硕士研究生学位论文, 2017, 24–25]
- YU J, JI H Y, WANG Y F, *et al.* Study of the antitumor mechanism of *Euचेuma* polysaccharides *in vivo*. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(5): 14–19 [于娟, 纪海玉, 王玉芳, 等. 麒麟菜多糖体内抗肿瘤机理研究. *现代食品科技*, 2017, 33(5): 14–19]
- YUAN Y M, LIU F L, DU X X, *et al.* Study on the assimilation

of nitrogen and phosphorus and on the sorption of heavy metals in *Laminaria hyperborea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 25–31 [袁艳敏, 刘福利, 杜欣欣, 等. 极北海带对氮、磷吸收和砷、镉、铅吸附的研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 25–31]

ZHENG G X. Culture technique of *Eucheuma gelatinae* with cement frame net and economic results analyses. *Fisheries Science and Technology Information*, 2008, 35(4): 190–193 [郑冠雄. 琼枝麒麟菜水泥框网片养殖技术与效益分析. *水产科技情报*, 2008, 35(4): 190–193]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Different Nutrient Conditions on the Growth of *Betaphycus gelatinae*

ZENG Jun¹, TONG Lihao^{2,3}, WU Xiangyu¹, HUANG Min¹, TANG Xianming¹①

(1. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Haikou, Hainan 571126, China; 2. Guangxi Mangrove Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Beihai, Guangxi 536000, China; 3. College of Marine Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract In this study, we measured the growth and pigment content of *Betaphycus gelatinae* under different inorganic nitrogen concentrations (50, 100, 200, 400, and 800 $\mu\text{mol/L}$), inorganic phosphorus concentrations (2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$), and different ratios of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (0/100, 25/75, 50/50, 75/25, and 100/0). The best nutrient conditions for the growth of *B. gelatinae* were thus evaluated. The results showed that the optimum nutrient conditions for the growth of *B. gelatinae* were an inorganic nitrogen concentration of 0~200 $\mu\text{mol/L}$, inorganic phosphorus concentration of 2.5~10 $\mu\text{mol/L}$, and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ to $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratio of 25/75. Within the range of suitable nutrient conditions, *B. gelatinae* achieved high weight gain. When the inorganic nitrogen concentration exceeded 200 $\mu\text{mol/L}$, inorganic phosphorus concentration exceeded 10 $\mu\text{mol/L}$, or the ratio of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ to $\text{NO}_3^-\text{-N}$ was higher than 50/50, the growth of *B. gelatinae* was slow but tolerance to adverse growth conditions was observed at the beginning of cultivation. However, with the extension of culture time, the growth of *B. gelatinae* became abnormal; severe white rot of algal bodies and a sharp decrease in weight gain was observed. Overall, our findings indicate that *B. gelatinae* grows faster under relatively low nutrient conditions and provide a theoretical basis for large-scale multiplication cultivation of *B. gelatinae*.

Key words *Betaphycus gelatinae*; Nutrient; Growth; Pigment

① Corresponding author: TANG Xianming, E-mail: hn.tangxm@aliyun.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200225002

http://www.yykxjz.cn/

何礼娟, 杨慧超, 李杰, 唐磊, 刘聪, 莫照兰. 一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 177-183
HE L J, YANG H C, LI J, TANG L, LIU C, MO Z L. Diagnosis of *Oplidiopsis* disease in *Pyropia yezoensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 177-183

一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断*



何礼娟^{1,2} 杨慧超^{2,3} 李杰² 唐磊¹ 刘聪¹ 莫照兰^{1,2,3①}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海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 山东 青岛 266071; 3. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 赤腐病(red rot disease)和拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜(*Pyropia*)的主要病害,常引起紫菜大面积病烂。2019年1月江苏省盐城市大丰区某条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)栽培海区有134 hm²发生了紫菜病烂,本研究对该起病烂进行了病害调查和病原鉴定。结果显示,患病紫菜的病症与拟油壶菌病一致,主要表现为发病初期,在叶片边缘、基部和中部出现粉红色的病斑,随着病程发展,病斑逐渐褪色并扩大;发病后期,整个叶片颜色变浅,叶片组织溃烂脱落;在显微镜下可观察到紫菜细胞内寄生1~4个圆球状菌体,菌体内有多个油滴状物质。以病烂紫菜叶片或其匀浆液为感染源,分别在10℃和20℃条件下进行人工感染实验,二者均能使正常紫菜出现拟油壶菌病的病症。对现场采集及人工侵染后的病烂紫菜疑似病原进行*cox1*基因测序和系统发育学分析。研究表明,所测*cox1*基因均与紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis porphyrae*、*O. pyropiae*、*O. porphyrae* var. *koreana*)聚为一支,相似度为100%。综上所述,该起条斑紫菜的病烂由紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis* sp.)引起。

关键词 条斑紫菜; 拟油壶菌病; *cox1*; 紫菜拟油壶菌

中图分类号 S946.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0177-07

紫菜(*Pyropia*)是倍受喜爱的食用藻类,具有很高的营养价值和经济价值,广泛栽培于中国、日本、韩国等国家,随着紫菜栽培面积的扩大及环境污染、种质退化、气候变暖等原因,紫菜病害发生越来越频繁,每年由于病害造成的损失超过10% (Im *et al.*, 2019)。

目前,已报道的常见紫菜病害有赤腐病(red rot disease)、拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)、绿斑病(green spot disease)、黄斑病(yellow spot disease)等 (Taniguchi *et al.*, 1970; Sekimoto *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015; 李杰等, 2019)。紫菜拟油壶菌病是由拟油壶菌(*Oplidiopsis* sp.)侵染造成的一种卵菌性病害(Migita,

1969),与赤腐病同为紫菜栽培期的主要病害。拟油壶菌为活体营养型专性细胞内寄生致病菌,目前,尚没有体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008),其鉴定和检测只能依靠高分辨率的油镜观察以及分子生物学手段。该病最早于1960年在日本报道(Arasaki, 1960),由于被感染的紫菜细胞呈壶状而被称为壶状菌病(chytrid blight disease); Sekimoto等(2008)根据其18S rRNA和*cox2*基因的分析及形态学观察,将该病原正式命名为紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis porphyrae*),属卵菌纲(Oomycetes)、拟油壶菌目(Oplidiopsidales)、拟油壶菌科(Oplidiopsidaceae)、拟油壶菌属(*Oplidiopsis*)。

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 何礼娟, E-mail: Helijuan741@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 教授, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-02-25, 收修改稿日期: 2020-04-12

马家海(1992)通过显微观察首次发现了江苏省南部沿海栽培的条斑紫菜(*P. yezoensis*)存在壶状菌病,于2007年将该病更名为拟油壶菌病(Olpidiops-disease)(马家海等,2007)。

江苏省是我国条斑紫菜栽培的主产区,产量占全国的97%以上。每年10月至翌年4月期间为条斑紫菜海上栽培阶段。2019年1月4日,据国家藻类体系南通综合试验站报告,江苏省盐城市大丰区沿岸某条斑紫菜栽培海区出现大面积病烂。本研究对大丰区病烂紫菜进行了调查和病原的鉴定分析,期望为紫菜流行病学研究和病害防控提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 紫菜和栽培条件

病烂的条斑紫菜样品取自江苏省盐城市大丰区海域半浮动筏式条斑紫菜栽培区(33.20°N, 120.47°E),水温为(4.07±0.06)°C,海水盐度为29.64±0.06。用于人工感染实验的紫菜为中国海洋大学藻类遗传实验室提供的条斑紫菜RZ品系,在实验室的正常栽培条件:PES海水培养液(马家海,1996),温度为10°C,盐度为30,光照强度为62.5 μmol/(m²·s),光周期为L:D=12:12,充气培养,每隔3d更换1次PES海水培养液。

1.2 样品采集及病理观察

乘船至栽培海域调查病害的基本情况,现场咨询栽培面积和发病情况,观察病烂紫菜外观症状,采集多个区域不同网帘上的发病紫菜样品,分别置于无菌样品袋中并存放于低温保温箱,带回实验室进行后续研究。在实验室的无菌操作台内,用无菌海水冲洗紫菜样品3~5次,然后,用灭菌的毛笔去除表面杂质,再用无菌刀片切取面积约为1cm²的条斑紫菜典型病烂部位,在显微镜下观察、记录病烂紫菜的组织病理变化。取部分病烂紫菜样品进行匀浆,将匀浆液涂布于PDA培养基(海博生物,青岛)上,进行可培养微生物的分离,培养温度为25°C(邱丽萍,2018),每天观察培养基上是否有微生物生长,持续观察2周。

1.3 人工感染实验

由于在PDA培养基上未分离到微生物,分别采用患病紫菜的完整叶片和匀浆液,在10°C和20°C条件下,使用500mL的锥形瓶进行人工感染实验。每个锥形瓶中添加200mL无菌PES海水,放入5片正常条斑紫菜叶状体(湿重约0.1g)。感染实验分为共培

养感染和匀浆感染。共培养感染:取3~5片病烂的紫菜叶片加入上述体系,对照组不添加病烂紫菜叶片。匀浆感染:将病烂紫菜用玻璃匀浆器研磨至无肉眼可见颗粒的匀浆液,取1mL匀浆液加入上述体系,对照组不添加匀浆液。每个实验组设置3个平行,分别置于10°C和20°C的光照培养箱中培养,光照强度为62.5 μmol/(m²·s),光周期为L:D=12:12,每天观察记录紫菜叶片的病理变化。

1.4 病原PCR鉴定

紫菜病烂多由腐霉(*Pythium* sp.)和拟油壶菌引起(Gachon *et al*, 2010; Im *et al*, 2019)。为确定本研究病原的种类,验证显微镜观察的结果,采用扩增紫菜腐霉*cox1*序列的特异引物*cox1-pyth-F* (5'-ATTAGAATGGAATTAGCACAAAC-3')和*cox1-pyth-R* (5'-CTTAAACCWGGAGCTCTCAT-3')(Lee *et al*, 2015),扩增拟油壶菌*cox1*序列的特异引物*cox1-olpi-F* (5'-CGGAGCTTTTCTGGTGT-3')和*cox1-olpi-R* (5'-GCTCCGGCTAAAACAGGTA-3')(Kwak *et al*, 2017)进行PCR鉴定。现场采集和人工侵染的病烂紫菜样品用无菌海水冲洗3~5次,去除叶片表面杂质后,用真菌基因组DNA提取试剂盒(思科捷,青岛)提取基因组DNA作为PCR扩增模板。25 μL PCR反应体系:2×ExTaq Mix (TaKaRa, 日本) 12.5 μL,正反向引物各1 μL (0.4 μmol/L),提取的基因组模板1 μL, ddH₂O 9.5 μL,同时,设置1组以ddH₂O作为模板的阴性对照组。PCR反应程序:95°C预变性5 min; 95°C变性30 s; 55°C退火30 s, 72°C延伸40 s,共35个循环; 72°C保温10 min。PCR扩增产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,目的片段使用胶回收试剂盒(OMEGA, 美国)进行回收和纯化,所得DNA用pCloneEZ-TA-AMP载体连接试剂盒(中美泰和,北京)连接T载体后,转化到DH10β大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞中,将阳性克隆送青岛派森诺公司测序。所得序列在GenBank中进行BLAST同源性比对,采用Mega 5.0软件邻接法来构建系统发育进化树,模型选择为Kimura2-parameter,同时,通过自展法(bootstrap)进行各个分支的置信度检验,循环次数设置为1000次,其他参数设为默认。

2 结果

2.1 紫菜病害调查及症状

发病区域位于江苏省盐城市大丰区某条斑紫菜栽培海区,海区面积约为1334 hm²,其中,条斑紫菜

栽培面积约为334 hm², 出现病烂的海区面积约为134 hm²。发病初期, 在局部区域的个别网帘出现病烂紫菜, 之后病烂逐步向四周传播, 在1周内致使约134 hm²的紫菜脱苗(图1B)。发病紫菜长度约为3 cm, 病程较轻的叶片边缘、基部和中部可见粉色的病斑, 病程严重的叶片出现褪色甚至溃烂、脱落(图1A)。在显微镜下观察发现, 病灶部位的紫菜细胞内寄生1~4个不规则圆球形或椭圆形的原生质团, 寄生菌体大小不一(长约为10~15 μm, 宽约为10~20 μm), 内有颗粒状和发亮的油滴状物质, 寄主紫菜细胞被挤压变形, 色素体被挤到细胞边缘, 呈绿色突起状, 部分紫

菜细胞出现萎缩或藻红素解体(图1C)。还可观察到, 拟油壶菌孢子囊伸出典型的释放管结构和释放的游动孢子(图1D、图1E), 孢子囊呈球形, 直径为3~12 μm, 游动孢子为圆球状, 直径约为2 μm, 释放管径为2~3 μm, 供游动孢子单行通过, 与已报道的拟油壶菌孢子囊和游动孢子结构相同(Sekimoto *et al*, 2009; Klochkova *et al*, 2016; Kwak *et al*, 2017)。孢子释放完后留下孢子囊空壳, 释放管长度约20 μm(图1F)。另外, 本研究观察发现, 拟油壶菌可侵染紫菜的精子囊(图1G)。上述特征与国内外报道的紫菜拟油壶菌病的病理变化特征一致(Ding *et al*, 2005; 马家海

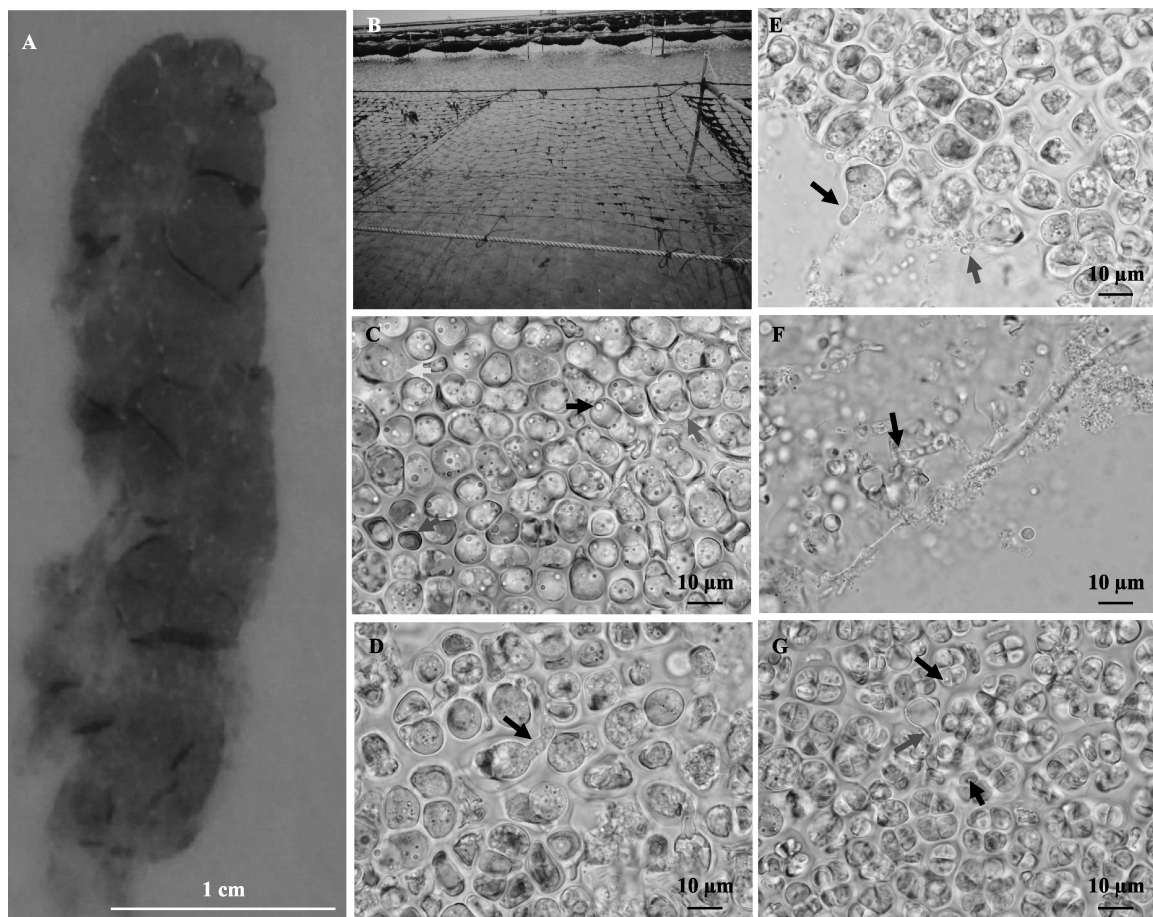


图1 海区患病条斑紫菜的病理症状

Fig.1 Histopathology of natural fungal infection in cultured diseased *P. yezoensis*

A: 患病紫菜叶片; B: 病害导致紫菜网帘几乎全部脱落; C: 发病紫菜细胞萎缩(红色箭头), 内有明亮的油滴状物质(黑色箭头), 细胞内容物被挤压导致藻红素解体(黄色箭头), 细胞一端形成浓绿色突起(绿色箭头), 有些细胞内有多个菌体寄生(蓝色箭头); D: 释放管; E: 孢子囊伸出释放管(黑色箭头), 游动孢子释放(红色箭头);

F: 空的孢子囊伸出长而弯曲的释放管; G: 精子囊细胞被感染(黑色箭头), 空的孢子囊(红色箭头)

A: Diseased *P. yezoensis* blade; B: *P. yezoensis* fall off caused by disease; C: Diseased cells get smaller (red arrow), oil drop-like substances in the fungus (black arrow), the cell contents are squeezed and the phycoerythrobilin disintegrates (yellow arrow), one side of the cell with rich-green outgrowth (green arrow), several parasitic thalli in one cell (blue arrow);

D: Liberation tube; E: Sporangium begins to push out the liberation tube (black arrow), zoospores are releasing (red arrow); F: Long and curved liberation tubes of the empty parasitic sporangium;

G: Infected spermatangium cells (black arrows), and the empty sporangium (red arrow)

等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2009; 刘一萌等, 2012; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。

2.2 人工感染实验

在 10℃ 和 20℃ 条件下, 患病紫菜的叶片和匀浆液均可引起紫菜发病。在 10℃ 条件下, 3 d 内可观察到紫菜叶片整体颜色变浅, 边缘呈透明的浅绿色(图 2A), 5~6 d 后, 变成无色并溃烂脱落, 病烂从叶片边缘逐渐往内部延伸发展, 7 d 内叶片全部溃烂。在 20℃ 条件下, 2 d 内即可观察到在叶片近中部出现肉眼可见的病斑, 病斑的中央为红色、边缘为绿色, 逐步发展为无色并溃烂成孔洞(图 2B), 4 d 内叶片全部溃烂。对照组紫菜叶片生长正常, 均未出现发病情况(图 2C), 在

显微镜下观察, 未发现紫菜细胞有明显变化(图 2E)。2 种温度条件下被感染紫菜的组织病理变化一致, 在紫菜细胞中均发现拟油壶菌感染的典型特征: 细胞内有溶出的藻红素、菌体内有大量的油滴状物质以及被拟油壶菌挤压到细胞边缘而呈绿色突起状的细胞质(图 2D)。

2.3 病原 PCR 鉴定

以采集和人工感染的病烂紫菜的基因组 DNA 作为模板, 分别用腐霉、拟油壶菌的 *cox1* 引物进行 PCR 扩增。结果显示, 采集和人工感染的病烂紫菜均检测到拟油壶菌 *cox1* 序列的特异条带, 未检测到腐霉的 *cox1* 序列条带。将扩增得到的 DNA 产物进行序列测定和 BLAST 同源性比对, 结果显示, 与紫菜拟油壶

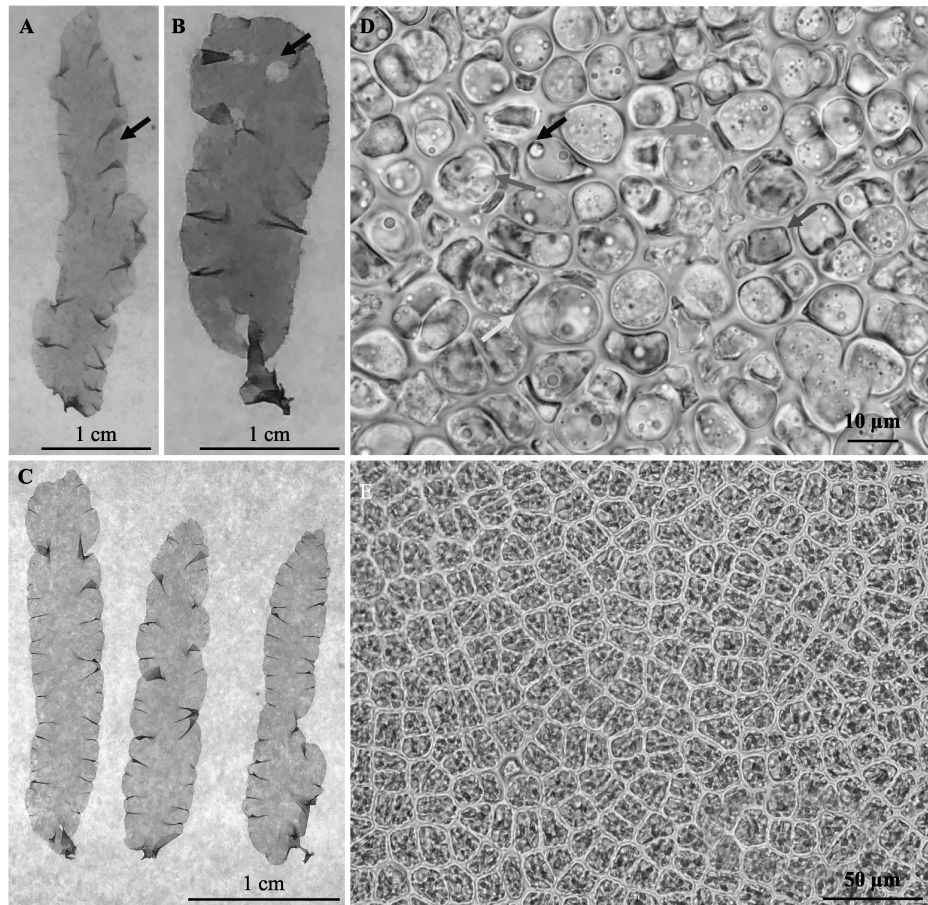


图 2 人工感染紫菜的病理观察

Fig.2 Histopathology of experimentally infected *P. yezoensis*

- A: 10℃ 侵染 3 d 时的紫菜叶片; B: 20℃ 侵染 2 d 时的紫菜叶片; C: 对照组紫菜叶片; D: 人工感染紫菜叶片, 紫菜细胞萎缩(红色箭头), 菌体内有明亮的油滴状物质(黑色箭头), 细胞内藻红素溶出(黄色箭头), 细胞一端形成浓绿色突起(绿色箭头), 3 个菌体寄生于同一细胞(蓝色箭头); E: 对照组紫菜细胞
- A: Infected *Pyropia* blade in 10℃ at the third day; B: Infected *Pyropia* blade in 20℃ at the second day; C: *Pyropia* blades in negative control group; D: Experimental infection *Pyropia* blade, the *Pyropia* cells shrink (red arrow), oil drop-like substances in the fungus (black arrow), the phycocyanin in the cell disintegrates (yellow arrow), one side of the cell product with rich-green outgrowth (green arrow), three parasitic thalli in one *Pyropia* cell (blue arrow); E: *Pyropia* cells in negative control group

菌(*O. pyropiae*, *O. porphyrae*)的 *cox1* 基因序列相似度为 100%。在系统发育进化树的分析上, 现场采集

(OlpBL201901)及人工感染(OlpRZ201901)的拟油壶菌序列与紫菜拟油壶菌聚为一支(图 3)。

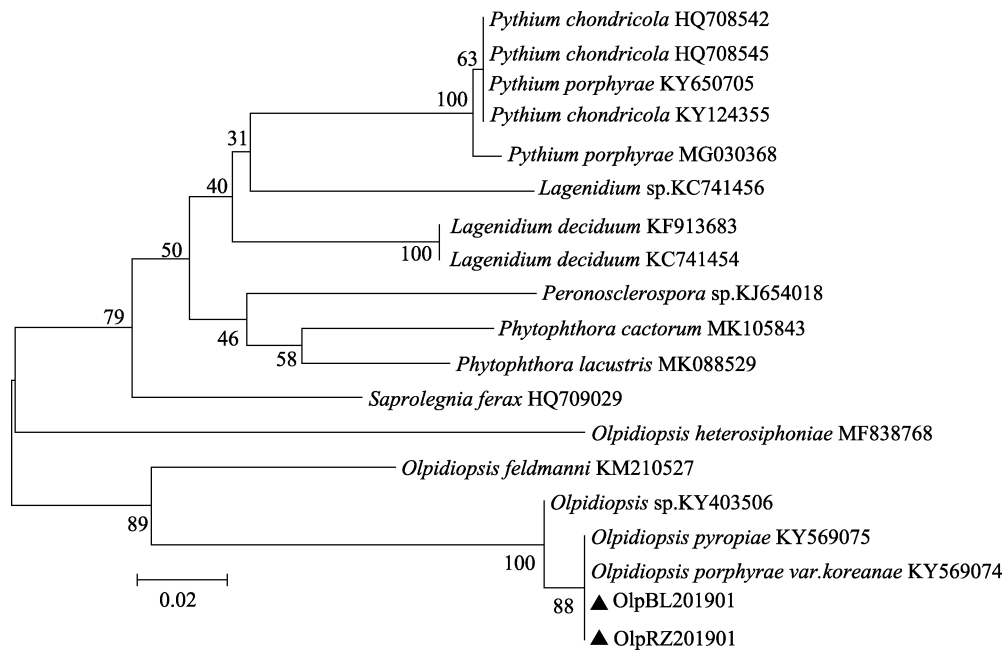


图 3 基于 *cox1* 序列的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed based on *cox1* gene sequences

3 讨论

本研究对江苏省盐城市大丰区条斑紫菜栽培海区的病烂紫菜进行了调查和病原分析鉴定, 综合发病紫菜的病理症状、人工感染实验、病原 PCR 鉴定的结果, 确定了引起此次条斑紫菜大面积病烂的病原为紫菜拟油壶菌(*Olpidiopsis* sp.)。

本调查发现, 病烂的条斑紫菜叶片长约为 3 cm, 为幼叶期紫菜, 细胞生长和分裂速度快, 且细胞壁薄, 拟油壶菌更易穿过紫菜边缘未完全形成的细胞壁而寄生(Migita, 1969)。紫菜细胞壁是抵御病原的重要屏障, 厚度与其应对卵菌侵染能力密切相关(Park *et al.*, 2014)。因而, 拟油壶菌更易在紫菜的幼叶期或收割后发生(Migita, 1969; Klochkova *et al.*, 2016)。在发病初期, 有红色病斑出现在紫菜叶片的边缘、基部、中部, 病斑处的紫菜细胞被圆形菌体感染, 菌体内可见多个油滴状物质。随着病程的发展, 病斑颜色变浅, 从而导致整个叶片颜色变浅, 最后溃烂溶解。拟油壶菌孢子囊呈球形, 直径为 3~12 μm , 孢子囊的释放管径为 2~3 μm ; 游动孢子从释放管逸出, 全部释放完后留下孢子囊空壳, 此时, 释放管长度可达 20 μm ; 游动孢子为圆球状, 直径为 2 μm 左右。这些特征与紫菜拟油壶菌病感染症状一致(Ding *et al.*, 2005;

马家海等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2009; 刘一萌等, 2012; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。拟油壶菌不仅能侵染紫菜叶状体营养细胞, 还能寄生于生殖细胞和丝状体细胞。Arasaki (1960)通过显微镜观察发现, 拟油壶菌可偶见于甘紫菜(*P. tenera*)果孢、未成熟的果孢子及丝状体中, 但并不存在于精细胞中。刘一萌等(2012)研究发现, 拟油壶菌亦可侵染坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)的精细胞。本研究发现, 拟油壶菌也可寄生于条斑紫菜的精细胞中, 其可能通过精细胞与果孢的有性生殖进行传递, 寄生于果孢子中, 果孢子萌发后进而在丝状体中存活, 使拟油壶菌能在夏季存活于海区, 并在温度合适时释放游动孢子, 成为紫菜栽培期的病原。因而, 在育苗过程中, 应对果孢子或自由丝状体进行镜检, 避免拟油壶菌的引入。

拟油壶菌属种类繁多, 形态特征相近, 由于具有明显差异的形态特征较少, 一般通过寄生的宿主以及分子生物学的方法进行分类。Dick(2001)根据拟油壶菌的寄生宿主将其划分为 3 个属: 寄生陆生植物及淡水藻类的拟油壶菌属(*Olpidiopsis* sp.)、寄生海洋红藻的桥壶菌属(*Pontisma* sp.)及寄生海洋绿藻的离壶菌属(*Sorlpidium* sp.)。但其对拟油壶菌属的重新分类由于仅仅基于寄生宿主, 而没有基于任何超微结构和分子数据而受到质疑(Sekimoto *et al.*, 2008)。随着分子生

生物学技术的发展,越来越多适合卵菌分类的分子标记被报道,如 18S rRNA、*cox1* 和 *cox2* 等基因序列(Sekimoto *et al.*, 2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017), 使紫菜卵菌病害的病原鉴定更加便利。本研究分析了采集和人工感染病烂紫菜疑似病原的 *cox1* 序列, 结果显示, 与紫菜拟油壶菌 *cox1* 序列相似性为 100%, 在系统发育上聚为一支。目前, 已报道的有 3 种拟油壶菌可以感染紫菜的叶状体, 分别为韩国鉴定的致病菌 *O. pyropiae* (Klochkova *et al.*, 2016), 日本鉴定的致病菌 *O. porphyrae* (Sekimoto *et al.*, 2008) 及其变种 *O. porphyrae* var. *koreana* (Kwak *et al.*, 2017); 另有一种拟油壶菌 *O. bostrychiae* 可以感染紫菜丝状体(West *et al.*, 2006)。Klochkova 等(2016)通过分析日本致病菌和韩国致病菌的 18S rRNA 基因, 发现韩国致病菌与日本致病菌相比缺少第 1 类内含子, 因而将韩国致病菌鉴定为 *O. pyropiae*。Kwak 等(2017)研究发现, 1 株韩国致病菌的 18S rRNA 基因在第 2 和第 3 内含子之间插入了 1 个第 5 内含子, 因此将此韩国致病菌鉴定为 *O. porphyrae* 的变种 *O. porphyrae* var. *koreanae*。本研究尝试根据已有文献的引物扩增 18S rRNA 基因序列, 进一步鉴定拟油壶菌的分类地位, 但未能扩增出相应的条带, 推测可能由于本次发病的拟油壶菌 18S rRNA 基因序列与以往的菌株存在部分差别, 具体原因有待进一步验证。因此, 不能判断本研究鉴定的病原菌属于 *O. porphyrae* 还是 *O. pyropiae*, 暂时鉴定为 *Oplidiopsis* sp.。

由于拟油壶菌属于专性活细胞内寄生菌, 尚无体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008)。目前, 实验室人工感染实验均以发病紫菜叶片作为感染源, 通过发病紫菜叶片与健康紫菜共培养来实现(马家海等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2008、2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。本研究分别采用被感染的紫菜叶片及其匀浆液作为感染源进行人工感染实验, 结果显示, 二者均可使健康紫菜出现与海区病烂紫菜一致的症状和病理特征。马家海(1992)研究表明, 拟油壶菌感染的最适水温为 15℃~20℃, 本研究结果也显示, 在 20℃ 条件下出现拟油壶菌病感染的症状早于 10℃ 条件下。一般认为, 拟油壶菌的游动孢子在 10℃ 条件下的感染和寄生较慢, 在 5℃ 下不感染(马家海, 1992)。目前, 尚未有 10℃ 以下拟油壶菌感染紫菜的报道。本研究中的条斑紫菜拟油壶菌病发生于 1 月, 海区水温约为 4℃, 推测可能由于紫菜栽培温度受光照、潮汐和干出等的影响, 局部温度升高引起拟油壶菌感染和传播, 也可能是引起此次发病的拟油壶菌与以往报道存在差别, 在低温下仍具有很强的致病力, 其原因和机制有待进一步深入研究。

综上所述, 本研究鉴定了引起江苏省盐城市大丰区条斑紫菜病烂的拟油壶菌为 *Oplidiopsis* sp., 可为我国栽培期紫菜的拟油壶菌病害防控提供有效参考。

参 考 文 献

- ARASAKI S. A chytridean parasite on the *porphyra*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1960, 26(6): 543–548
- DICK M W. Straminipilous fungi systematics of the peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. *Terrorism*, 2001, 13(4): 311–328
- DING H Y, MA J H. Simultaneous infection by red rot and chytrid diseases in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(1): 51–56
- GACHON C M M, SIME-NGANDO T, STRITTMATTER M, *et al.* Algal diseases: Spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(11): 633–640
- IM H, KLOCHKOVA T A, LEE D J, *et al.* Genetic toolkits of the red alga *Pyropia tenera* against the three most common diseases in *Pyropia* farms. *Journal of Phycology*, 2019, 55(4): 801–815
- KLOCHKOVA T A, SHIN Y J, MOON K H, *et al.* New species of unicellular obligate parasite, *Oplidiopsis pyropiae* sp. no v., that plagues *Pyropia* sea farms in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 73–83
- KWAK M S, KLOCHKOVA T A, JEONG S, *et al.* *Oplidiopsis porphyrae* var. *koreanae*, an endemic endoparasite infecting cultivated *Pyropia yezoensis* in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(7): 2003–2012
- LEE S J, HWANG M S, PARK M A, *et al.* Molecular identification of the algal pathogen *Pythium chondricola* (Oomycetes) from *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) using ITS and *cox1* markers. *Algae*, 2015, 30(3): 217–222
- LI J, MOU Z J, YANG H C, *et al.* Isolation and identification the pathogen of *Pyropia yezoensis* green spot disease. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 140–146 [李杰, 牟宗娟, 杨慧超, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病病原菌的分离鉴定. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 140–146]
- LIU Y M, MA J H, WEN Q. Simultaneous infection by red rot and *olpidiops* disease in laver *Porphyra haitanensis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(6): 546–550 [刘一萌, 马家海, 文茜. 坛紫菜赤腐病与拟油壶菌病并发病的初步研究. 大连海洋大学学报, 2012, 27(6): 546–550]
- MA J H, LIN Q S, MIN J, *et al.* Preliminary study on the *olpidiops*-disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 860–864 [马家海, 林秋生, 闵建, 等. 条斑紫菜拟油壶菌病的初步研究. 水产学报, 2007, 31(6): 860–864]
- MA J H. A preliminary study on the red rot disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1996, 5(1): 1–7 [马家海. 条斑紫菜赤腐病的初步研究. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 1–7]
- MA J H. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(3/4): 185–188 [马家海. 江苏省南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究. 上海水产大学学报, 1992, 1(3/4): 185–188]
- MIGITA S. *Oplidiopsis* disease of culture *Porphyra*. Bulletin of the Faculty of Fisheries Nagasaki University, 1969, 28: 131–

- 145
 PARK C S, HWANG E K. Isolation and evaluation of a strain of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) resistant to red rot disease. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 811–817
- QIU L P. Isolation, identification and characterization of *Pythium porphyrae* JS151205. Master's Thesis of Ocean university of China, 2018 [邱丽萍. 紫菜腐霉 JS151205 的分离鉴定及生长特性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- SEKIMOTO S, KLOCHKOVA T A, WEST J A, *et al.* *Oplidiopsis bostrychia* sp. nov.: An endoparasitic oomycete that infects *Bostrychia* and other red algae (Rhodophyta). *Phycologia*, 2009, 48(6): 460–472
- SEKIMOTO S, YOKOO K, KAWAMURA Y, *et al.* Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Oplidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, straminipiles), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta). *Mycological Research*, 2008, 112(3): 361–374
- TANIGUCHI M. Studies on the yellow spot disease of conchocelis-I. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1970, 36(7): 686–691
- WEST J A, KLOCHKOVA T A, HOON K G, *et al.* *Oplidiopsis* sp., an oomycete from Madagascar that infects *Bostrychia* and other red algae: Host species susceptibility. *Phycological Research*, 2006, 54(1): 72–85

(编辑 马璀璨)

Diagnosis of *Oplidiopsis* Disease in *Pyropia yezoensis*

HE Lijuan^{1,2}, YANG Huichao^{2,3}, LI Jie², TANG Lei¹, LIU Cong¹, MO Zhaolan^{1,2,3①}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 26603, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Red rot and *Oplidiopsis* disease are the main diseases that occur during the farming of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta) cultivated in the sea, which cause large areas of *Pyropia* to rot. *Oplidiopsis* disease is caused by *Oplidiopsis* sp., which is a biotrophic parasitic oomycete and there is currently no *in vitro* culture method for this species. The pathogen can only be identified by high-resolution microscopic observation and molecular methods. Experimental infection is typically undertaken by culturing diseased *Pyropia* with normal blades. In January 2019, 2000 acres of *Pyropia* disease occurred in a *P. yezoensis* cultivation area in Dafeng District, Yancheng City, Jiangsu Province, causing a large decrease of the *P. yezoensis* yield. We performed an investigation and pathogen identification of this disease. By macroscopic observation and studying the histopathology characteristics of the diseased thalli using a microscope, the *Pyropia* symptoms were found to be the same as that of the *Oplidiopsis* disease. The main symptoms were as follows: Pink spots appeared at the edge, base, and middle of the thallus at the beginning of the infection, which gradually faded and expanded as the disease progressed. During the late infection stage, the entire thallus became lighter and the tissue broke down and fell off. One to four spheroid parasitic oomycetes were found in one *Pyropia* cell, which contained multiple oil drop-like substances. Diseased thalli or their homogenates were used for experimental infection, with all causing *Oplidiopsis* disease symptoms in normal thalli at 10°C and 20°C. To identify the pathogen, *cox1* gene sequencing and phylogenetic analysis of the naturally and experimentally infected thalli were performed. The results showed that the pathogen sequences were clustered with *O. porphyrae*, *O. pyropiae* and *O. porphyrae* var. *koreana* with 100% similarity. In summary, the disease of *P. yezoensis* in Dafeng District was found to be caused by *Oplidiopsis* sp.

Key words *Pyropia yezoensis*; *Oplidiopsis* disease; *cox1*; *Oplidiopsis* sp.

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200303003

http://www.yykxjz.cn/

赵新宁, 牟铭, 李昂, 柳淑芳, 庄志猛. DNA 条形码技术鉴定青岛市售三文鱼水产品. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 184–191
ZHAO X N, MU M, LI A, LIU S F, ZHUANG Z M. Identification of salmon aquatic products sold in Qingdao using DNA barcoding technology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 184–191

DNA 条形码技术鉴定青岛市售三文鱼水产品*

赵新宁^{1,2} 牟铭^{1,2} 李昂^{2,3} 柳淑芳^{2,3①} 庄志猛^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 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 山东 青岛 266200)

摘要 仅凭感官甄别市售三文鱼(鲑鳟鱼类的统称)是大西洋鲑(*Salmo salar*)或虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)难度很大, 而广泛应用于物种分类学研究的 DNA 条形码为物种快速准确鉴定提供了强有力的技术支撑。本研究采用 DNA 条形码技术, 对山东省青岛市 6 个城区大型商超和农贸市场的三文鱼商品标识与实际物种信息进行了调查。在采集的 74 份三文鱼样品中, 成分为大西洋鲑的样品有 61 份, 占比为 82.43%; 成分为虹鳟的样品有 11 份, 占比为 14.86%; 另外, 青岛市售三文鱼商品中还含有一定比例的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)和银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*), 各占比为 1.35%。调查数据显示, 青岛市场流通的三文鱼商品以大西洋鲑为主, 但核对商品标识与实际物种信息发现, 14.86% 的三文鱼外包装标识商品名称与检测结果不一致, 且有多于 40% 的三文鱼商品未标注产地信息。可见, 三文鱼水产品仍存在一定的掺假风险和食品安全风险, 这一国际公认的高端水产品的市场监管还有待于加强, 建议相关部门应尽快制定产品标准和检测标准, 确保三文鱼水产品质量安全可溯源。

关键词 三文鱼; DNA 条形码; 大西洋鲑; 虹鳟

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0184-08

“三文鱼”一词由“Salmon”音译而来, 是鲑鳟鱼类的商品名称。三文鱼因富含蛋白质和不饱和脂肪酸, 营养与保健价值极高, 成为国际公认的高档水产品。但不同种类三文鱼其肉质存在一定差异, 且不同国家消费偏好也有所不同。欧美文化中的三文鱼通常指拥有跨盐度洄游行为的大西洋鲑(*Salmo salar*), 其分类上隶属于鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、鲑属(*Salmo*)。我国市场上流通的三文鱼主要是进口大西洋鲑, 产地有挪威、智利和丹麦等,

而消费者最认可的是挪威产大西洋鲑, 商品名为“挪威三文鱼”。

鲑鳟鱼类中还有一类生活史全部在淡水完成的物种——虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 其分类上隶属于鲑科、大马哈鱼属(*Oncorhynchus*)。虹鳟是 FAO 推荐的优良淡水养殖种之一, 在国际上一直被列为名贵鱼类。目前, 虹鳟是国内养殖范围较广的冷水鱼类, 已经在 29 个省市和自治区开展人工养殖(王金娜等, 2015), 且形成了一定产业规模, 据渔业统计资料显示

* 国家重点研发计划(2019YFC1604702)和山东省泰山学者建设工程专项经费项目共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFC1604702), and Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province]. 赵新宁, E-mail: 18306391085@163.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-03, 收修改稿日期: 2020-04-01

示, 2018年我国虹鳟养殖产量达3.86万t(农业农村部渔业渔政管理局, 2019)。国内市场上虹鳟通常作为三文鱼进行销售, 例如, 青海产虹鳟商品名为“青海三文鱼”。

虽然虹鳟也属于鲑科鱼类, 但国产虹鳟为淡水养殖种, 其生产成本及营养价值均低于大西洋鲑(刘延岭等, 2011; 何晓霞等, 2019), 这种混淆销售的现象引起很大争议。尤其是2018年《生食三文鱼》团体标准发布以来, 虹鳟的三文鱼冠名之争引起消费者对市场上三文鱼真实身份的高度关注。曾有新闻报道, 中国市场上的三文鱼约有1/3是虹鳟。国外也有报道称美国华盛顿地区有38%的三文鱼产品存在商品标识与实际物种不一致(Cline, 2012)。我国水产品市场上流通的三文鱼中大西洋鲑和虹鳟究竟占比多少? 市售三文鱼的商品标识与实际物种信息是否相符? 本研究采用DNA条形码技术对青岛市大型商超和农贸市场的三文鱼进行了物种鉴定, 以期对三文鱼市场监管精准施策提供基础数据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

2018年8月从山东省青岛市6区大型商超和水产品批发市场购买到商品标识为三文鱼的样品共计73份, 商品标识为鳟鱼的样品1份, 样品共计74份。其中, 市南区(SN)13份、市北区(SB)10份、城阳区(CY)11份、李沧区(LC)9份、黄岛区(HD)9份、崂山区(LS)22份, 包括冰冻、新鲜、少许调味品等不同产品类型。

1.2 实验方法

1.2.1 样本DNA提取与浓度测定 每个样品取肌肉约30mg, 按照海洋生物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)说明书提取DNA。提取后, DNA模板经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。同时, 取3μL DNA模板置于核酸蛋白测定仪上测定浓度。

1.2.2 DNA条形码序列扩增与测序 DNA条形码扩增引物采用Ward等(2005)推荐的鱼类线粒体COI基因通用引物, 引物序列: COI-F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', COI-R: 5'-TAGACTTC TGGGTGGCCAAAGAATCA-3'。

PCR反应体系: 2×Rapid Taq Master Mix 12.5μL, 引物COI-F和COI-R各1μL, DNA模板2μL, 用无菌水补足总体积25μL。

PCR反应条件: 95℃变性3min; 95℃15s, 50℃

10s, 72℃40s, 35个循环; 72℃延伸7min。

PCR产物约为680bp, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 挑选出条带明亮单一的样品产物送华大基因公司进行正反向双向测序。

1.3 数据分析

使用Sequencher软件对测序结果进行校正拼接, 获得准确完整的DNA条形码序列。

使用ClustalX 2.0(Larkin *et al*, 2007)和MEGA 6.0(Tamura *et al*, 2013)软件对测得的DNA条形码序列进行分析, 比较不同样品、不同产地的DNA条形码特征, 将各样品序列进行编辑、排序, 采用邻接法(NJ)构建分子系统关系树, 采用Kimura-2-parameter模型计算种内和种间遗传距离, 初步确定样品的种类。

随后在中国重要渔业生物DNA条形码数据库(<http://www.fishery-barcode.cn>)和国际DNA条形码数据系统BOLD(<http://www.boldsystems.org>)中进行BLAST比对分析, 对样品进行准确的物种鉴定。

2 结果与分析

2.1 三文鱼样品的DNA条形码分析

2.1.1 DNA条形码扩增结果 DNA条形码通用引物序列位于mtDNA COI基因的5'端。本研究对市场采集的74份三文鱼样品进行PCR扩增, 部分三文鱼样品与Marker DL2000的电泳图见图1。经双向测序、序列校正与拼接, 最终获得74条片段长度约680bp的DNA条形码序列, 同时, 也表明DNA条形码通用引物对不同形式的三文鱼样品检测具有普遍适用性。

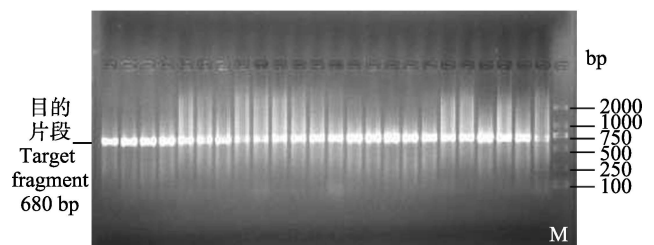


图1 三文鱼样品的DNA条形码序列电泳图

Fig.1 DNA barcodes of salmon samples on gel

M: DL2000 DNA marker

2.1.2 种间及种内的遗传距离分析 74个样品的DNA条形码序列经ClustalX同源性聚类 and 排序后可聚为4组, 第1组(GP1)包含61条序列, 第2组(GP2)有11条序列, 第3组(GP3)和第4组(GP4)各有1条序列。初步判断, 每组DNA条形码序列代表1个物种, 即74个样品包含4种鱼类。

进一步采用 MEGA 6.06 软件基于 K2P 模型计算这 4 种鱼类的种内和种间遗传距离。数据分析显示(表 1), 4 种鱼的种内平均遗传距离均小于 0.005, 平均值为 0.003; 种间遗传距离范围为 0.074~0.165, 平均值为 0.126; 种间遗传距离是种内的 42 倍。Hebert 等(2003)指出, *CO I* 基因序列作为 DNA 条形码鉴别物种的关键点是种内遗传距离应小于 0.020, 且种间与种内遗传距离差异大于 10 倍。可见, 种间及种内的遗传距离分析结果进一步验证了 ClustalX 聚类结果。鉴于此, 运用 DNA 条形码技术将 74 个样品准确鉴定为 4 个有效物种。

表 1 三文鱼样品的种内和种间遗传距离
Tab.1 Species interspecific/intraspecific distance

	GP1	GP2	GP3	GP4
GP1	0.002			
GP2	0.149	0.004		
GP3	0.151	0.074	0	
GP4	0.165	0.109	0.106	0

2.1.3 三文鱼样品的物种鉴定 将 74 条 DNA 条形码序列分别在 BOLD 数据库 (<http://www.boldsystems.org>) 和中国重要渔业生物 DNA 条形码数据库 (<http://www.fishery-barcode.cn>) 中进行 BLAST 比对分析, 物种鉴定结果为: GP1 的 61 条序列与数据库中大西洋鲑标准 DNA 条形码序列相似度为 99%~100%; GP2 的 11 条序列与数据库中虹鳟标准 DNA 条形码序列相似度为 99%~100%; GP3 的 1 条序列与数据库中银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 标准 DNA 条形码序列相似度为 99%; GP4 的 1 条序列与数据库中大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 标准 DNA 条形码序列相似度为 99%。

为了进一步验证上述分析和鉴定结果, 从 BOLD 数据库和中国重要渔业生物 DNA 条形码数据库分别下载 1 条大西洋鲑、虹鳟、银大麻哈鱼、大麻哈鱼的标准 DNA 条形码, 与本研究的三文鱼样品 DNA 条形码合并构建 NJ 分子系统树。如图 2 所示, 74 条样品序列与 8 条鲑科鱼类标准 DNA 条形码序列共聚为 4 个分支, 其中, GP1 的 61 条序列与大西洋鲑标准 DNA 条形码序列聚为一个独立分支; GP2 的 11 条序列与虹鳟聚为一个独立分支, 再与 GP3 的银大麻哈鱼和 GP4 的大麻哈鱼互为姐妹分支。分子系统树不但确证了三文鱼样品的物种鉴定结果, 且支持了生物分类学观点, 即虹鳟、麻哈鱼、银大麻哈鱼为大麻哈鱼属 (*Oncorhynchus*) 内近缘种, 而大西洋鲑则属于鲑属, 它们均属于鲑形目、鲑科。

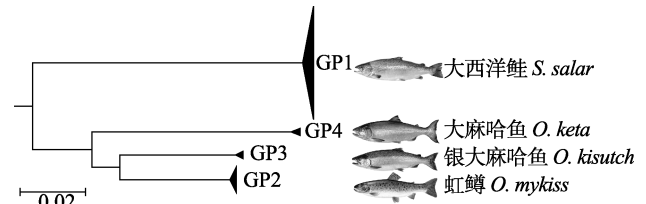


图 2 74 个三文鱼样品与鲑科 4 种鱼类的 DNA 条形码 NJ 分子系统树

Fig.2 NJ molecular tree of DNA barcodes for 74 salmon samples and 4 species of salmonidae

2.2 三文鱼样品调查结果分析

2.2.1 大型商超三文鱼成分鉴定 从青岛市 6 个区的大型商超购得样品共计 54 份, 其中, 商品标识为三文鱼的样品 53 份, 商品标识为鳟鱼的样品 1 份。经 DNA 条形码鉴定(表 2), 其中, 44 份三文鱼商品的物种鉴定结果为大西洋鲑, 占比 81.48%; 7 份三文鱼商品和 1 份鳟鱼商品被鉴定为虹鳟, 占比 14.82%; 另外 2 份三文鱼商品分别被鉴定为大麻哈鱼和银大麻哈鱼(也称银鲑), 各自占比 1.85%。在商品价格方面, 原料为虹鳟的商品其单价普遍低于同类商品形式的大西洋鲑。

2.2.2 水产品批发市场三文鱼成分鉴定 从青岛市 6 个区的水产品批发市场购得商品标识为三文鱼的样品共计 20 份, DNA 条形码鉴定结果显示(表 3), 其中, 17 份三文鱼商品的物种鉴定结果为大西洋鲑, 占比 85%; 3 份三文鱼商品被鉴定为虹鳟, 占比 15%。水产品批发市场的三文鱼样品中, 大西洋鲑和虹鳟所占比重与大型商场基本一致。就价格而言, 多数批发市场的三文鱼价格低于商超货架上的同类商品, 但批发市场销售的不同原料成分三文鱼其价格差异并不明显。

2.2.3 三文鱼样品调查结果比较分析 本次调查共取得市售三文鱼样品 74 份, 运用 DNA 条形码技术对三文鱼商品进行物种鉴定。结果显示(表 4), 青岛市场流通的三文鱼商品以大西洋鲑为主, 占比为 82.43% (61/74); 虹鳟占青岛三文鱼商品的比例为 14.86% (11/74); 另外, 三文鱼商品中还有一定比例的大麻哈鱼和银大麻哈鱼(也称银鲑), 占比分别为 1.35% (1/74)。核对样品的商品标识, 其中, 61 份三文鱼商品为大西洋鲑, 1 份三文鱼排(银鲑)鉴定结果为银鲑, 1 份烟熏鳟鱼切片(虹鳟)鉴定结果为虹鳟, 即外包装标识的商品名称与检测结果吻合率为 85.14% (63/74); 另有 10 份三文鱼样品鉴定结果为虹鳟, 还有 1 份样品被鉴定为大麻哈鱼, 即标识商品名称与检测结果不一致的比例为 14.86% (11/74)。

表2 大型商超三文鱼物种鉴定结果
Tab.2 Identification results of salmon samples from large supermarkets

序号 No.	样品标号 Sample ID	商品标识(成分) Labeling (ingredient)	原产地 Patria	单价/(元·kg ⁻¹) Unit price(CNY·kg ⁻¹)	鉴定结果 Identification result
1	CY5_2	三文鱼鱼段	未标注 Unlabeled	112	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
2	CY6_1	三文鱼片	未标注 Unlabeled	348	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
3	CY6_2	三文鱼扒	智利 Chile	194	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
4	CY6_3	三文鱼扒	智利 Chile	250	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
5	CY7_1	三文鱼刺身	挪威 Norway	276	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
6	CY7_2	三文鱼鱼段	挪威 Norway	80	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
7	CY7_3	三文鱼头	挪威 Norway	45	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
8	HD1	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	336	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
9	HD2	三文鱼鱼段	未标注 Unlabeled	243	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
10	HD4	三文鱼排(银鲑)	智利 Chile	136	银大麻哈鱼 <i>O. kisutch</i>
11	HD8	三文鱼鱼皮	未标注 Unlabeled	216	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
12	HD10	三文鱼头	智利 Chile	210	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
13	HD11	三文鱼鱼段	未标注 Unlabeled	224	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
14	HD12	三文鱼刺身	未标注 Unlabeled	334	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
15	LS01	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	210	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
16	LS02	三文鱼鱼段	未标注 Unlabeled	276	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
17	LS03	三文鱼鱼皮	未标注 Unlabeled	32	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
18	LS04	三文鱼刺参	丹麦 Danmark	368	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
19	LS05	三文鱼刺参	丹麦 Danmark	380	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
20	LS06	三文鱼鱼片	未标注 Unlabeled	396	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
21	LS07	三文鱼鱼腩	未标注 Unlabeled	398	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
22	LS08	三文鱼头	未标注 Unlabeled	60	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
23	LS16	烟熏三文鱼切片	智利 Chile	320	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
24	LS17	烟熏三文鱼切片	智利 Chile	346	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
25	LS18	烟熏鳟鱼切片(虹鳟)	智利 Chile	240	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
26	LS19	冰鲜三文鱼柳	智利 Chile	230	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
27	LS20	三文鱼刺身	上海市 Shanghai	180	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
28	LS21	烟熏三文鱼	上海市 Shanghai	160	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
29	LS22	三文鱼生鱼片	丹麦 Danmark	360	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
30	LS23	三文鱼肉	未标注 Unlabeled	278	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
31	LS24	三文鱼切身	智利 Chile	192	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
32	SB01	冻三文鱼扒	智利 Chile	175	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
33	SB02	三文鱼头	未标注 Unlabeled	48	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
34	SB08	三文鱼皮	未标注 Unlabeled	48	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
35	SB09	三文鱼段	美国 USA	227	大麻哈鱼 <i>O. keta</i>
36	SB10	寿司三文鱼皮	未标注 Unlabeled	40	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
37	SN02	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	368	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
38	SN03	三文鱼生鱼片	挪威 Norway	722	大西洋鲑 <i>S. salar</i>

续表 2

序号 No.	样品标号 Sample ID	商品标识(成分) Labeling (ingredient)	原产地 Patria	单价/(元·kg ⁻¹) Unit price/(CNY·kg ⁻¹)	鉴定结果 Identification result
39	SN04	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	613	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
40	SN05	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	680	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
41	SN06	三文鱼生鱼片	挪威 Norway	1700	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
42	SN07	三文鱼生鱼片	挪威 Norway	1368	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
43	SN08	三文鱼生鱼片	未标注 Unlabeled	296	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
44	SN10	三文鱼切身	智利 Chile	262	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
45	SN11	三文鱼尾	挪威 Norway	60	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
46	SN12	三文鱼尾	挪威 Norway	60	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
47	SN13	三文鱼尾	挪威 Norway	60	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
48	SN14	三文鱼尾	挪威 Norway	60	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
49	LC01	三文鱼头	未标注 Unlabeled	40	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
50	LC05	三文鱼皮	未标注 Unlabeled	46	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
51	LC06	三文鱼骨	未标注 Unlabeled	48	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
52	LC07	速冻三文鱼切身	智利 Chile	230	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
53	LC08	三文鱼切段	智利 Chile	158	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
54	LC09	三文鱼肉丁	智利 Chile	432	大西洋鲑 <i>S. salar</i>

表 3 水产品批发市场三文鱼物种鉴定结果

Tab.3 Identification results of salmon samples from aquatic markets

序号 No.	样品标号 Sample ID	商品标识(成分) Labeling (ingredient)	原产地 Patria	单价/(元·kg ⁻¹) Unit price/(CNY·kg ⁻¹)	鉴定结果 Identification result
1	CY1	速冻三文鱼切身	未标注 Unlabeled	120	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
2	CY2	速冻三文鱼切身	智利 Chile	100	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
3	CY3	三文鱼刺身	智利 Chile	204	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
4	CY4	速冻三文鱼切身	智利 Chile	133	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
5	HD06	三文鱼头	青岛 Qingdao	234	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
6	HD07	三文鱼段	未标注 Unlabeled	150	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
7	LS09	三文鱼段	澳大利亚 Australia	190	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
8	LS10	三文鱼段	挪威 Norway	220	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
9	LS11	三文鱼段	挪威 Norway	220	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
10	LS12	三文鱼头	挪威 Norway	20	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
11	LS13	三文鱼头	挪威 Norway	30	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
12	SB03	三文鱼肉	未标注 Unlabeled	110	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
13	SB04	野生三文鱼肉	丹麦 Danmark	158	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
14	SB05	三文鱼肉	未标注 Unlabeled	112	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
15	SB06	三文鱼头	未标注 Unlabeled	16	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
16	SB07	三文鱼头	未标注 Unlabeled	20	虹鳟 <i>O. mykiss</i>
17	SN09	三文鱼生鱼片	挪威 Norway	180	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
18	LC02	三文鱼头	挪威 Norway	80	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
19	LC03	三文鱼尾	挪威 Norway	80	大西洋鲑 <i>S. salar</i>
20	LC04	三文鱼生鱼片	挪威 Norway	200	大西洋鲑 <i>S. salar</i>

从样品分布区域看,市南区的三文鱼商品中虹鳟的检出率最高(4/13),为 30.77%;其次是城阳区(2/11)和崂山区(4/22),虹鳟检出率均为 18.18%;黄岛区和李沧区获得的样品数量最少,同时,2 个区的虹鳟检出率均为 0(表 4)。

表 4 三文鱼样品鉴定结果
Tab.4 Identification results of salmon samples

区域 Area	鉴定结果 Identification result			
	大西洋鲑 <i>S. salar</i>	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	银大麻哈鱼 <i>O. kisutch</i>	大麻哈鱼 <i>O. keta</i>
市南区 SN	9	4	—	—
市北区 SB	8	1	—	1
李沧区 LC	9	—	—	—
城阳区 CY	9	2	—	—
崂山区 LS	18	4	—	—
黄岛区 HD	8	—	1	—
合计 Total	61	11	1	1

从样品产地来源看,青岛市售三文鱼样品中 40.54%未标注产地(30/74);产地标识清晰的样品以进口三文鱼为主,占比为 55.41%(41/74),其中,24.32%来自挪威(18/74),22.97%来自智利(17/74),5.41%来自丹麦(4/74),还有少量来自美国和加拿大,分别占 1.35%(1/74);国产三文鱼占比较少,仅有 4.05%(3/74)(图 3)。

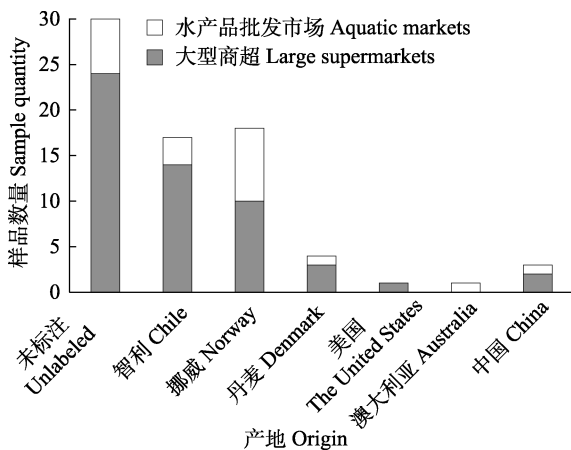


图 3 74 份三文鱼样品的产地来源

Fig.3 Origin of 74 salmon samples

3 讨论

随着分子分类学的发展, DNA 条形码越来越多的用于物种分类学研究。生命条形码联盟(The Consortium for the Barcode of Life, CBOL)推荐使用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 基因来构建动物的物种鉴别体系

(Remigio *et al.*, 2004)。2005 年, Ward 等(2005)通过对部分鱼类的 CO I 基因分析,准确区分出 204 个物种,验证了 DNA 条形码识别鱼类的功效。本团队也多次验证了该项技术在鱼种鉴定分类中的有效性(柳淑芳等, 2016a、b、c)。迄今,国际生命条形码数据库系统(Barcode of Life Data Systems, BOLD)系统包含了约 26.7 万物种的 570 万条 DNA 条形码序列。中国重要渔业生物 DNA 条形码信息平台 (<http://www.fisherybarcode.cn>) 是我国渔业生物 DNA 条形码信息发布与数据查询的重要平台,目前收录了 2587 种渔业生物的 DNA 条形码序列 4 万余条。相较于传统形态分类学, DNA 条形码不受组织部位、发育时期和样品状态的限制(Khedkar *et al.*, 2014),具有操作简便快捷、高效准确和特异性灵敏度高等优势(王敏等, 2015),为物种的快速准确鉴定提供了强有力的技术支持。本研究使用 DNA 条形码技术对青岛市售三文鱼进行成分鉴定,通过同源性聚类、种内和种间遗传距离计算、标准 DNA 条形码数据信息系对比对及分子系统树构建等系列分析过程,将 74 份三文鱼商品准确鉴定为大西洋鲑、虹鳟、银大麻哈鱼和大麻哈鱼 4 个物种。可见, DNA 条形码技术为三文鱼成分的快速准确鉴定提供了有效技术手段。

虽然,“三文鱼”是鲑鳟鱼类的统称,但因三文鱼食材品质考究且市场价格昂贵,人工养殖的淡水虹鳟与公众印象中来自大西洋的名贵三文鱼难以相提并论。近年来,养殖虹鳟的大量供给对世界三文鱼贸易带来较大冲击,引发了一场“真假三文鱼”大战。然而对普通消费者来说,仅凭感官甄别市售三文鱼是大西洋鲑或虹鳟难度很大。水产品市场上流通的三文鱼究竟包含哪些种类?其商品标识是否真实? Cline (2012)采用 DNA 条形码技术调查了美国华盛顿地区三文鱼产品,发现 38%的商品标识与实际物种不一致。Wong 等(2008)利用 DNA 条形码技术对北美市场销售的 91 个样品进行分析,有 23 个海产品的标签与实物不相符。Filonzi 等(2010)通过 DNA 条形码技术对意大利市场上的 69 份鱼类样品进行分析,发现 32%存在错贴标签的现象。丁清龙等(2019)对广东省市售三文鱼调查发现,三文鱼主要成分以大西洋鲑为主,占 93.88%,虹鳟仅有 4.08%。本研究采用 DNA 条形码技术对青岛市部分地区销售三文鱼成分进行甄别,调查数据显示,三文鱼种类以大西洋鲑为主,占比 82.43%;虹鳟占比 14.86%;另外,市售三文鱼商品中还含有 2.7%的大麻哈鱼和银大麻哈鱼。核对商品标识与实际物种信息,14.86%的三文鱼外包装标识与检测结果不一致。

目前,我国尚无三文鱼物种鉴别相关的产品标准与检测方法标准。尽管本调查结果显示三文鱼商品中虹鳟占比不到 1/6,但仅采集到 1 份产品标注了鳟鱼切片,其他产品的商品名或成分仅标注了三文鱼。如果商家能够严格把控养殖生产和市场流通过程的各个环节,其实国产虹鳟也不失为一种味美价廉的生食鱼种,可为国民提供更多的选择。另外,调查发现,有 40% 多的三文鱼商品未标注产地信息。产地信息不透明将增加三文鱼产品的掺假风险和食品安全风险。可见,对这一高端水产品的市场监管还有待于加强,且应尽快制定相关标准,确保三文鱼水产品质量安全可溯源。

致谢: 感谢渔业生物分子生态学实验室的马骞、胡鹏、张金勇、项子龙、杨龙、姜邴轩和李蒙等老师与同学在市场调查取样过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- Bureau of Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Popularization Station, Chinese Fishery Association. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2019, 25 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019, 25]
- CLINE E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*, 2012, 45(1): 388–393
- DING Q L, ZENG X C, ZHOU L, *et al.* Investigation of salmon adulteration. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019(13): 4080–4085 [丁青龙, 曾晓琮, 周露, 等. 三文鱼水产品掺假情况调查. *食品安全质量检测学报*, 2019(13): 4080–4085]
- FILONZI L, CHIESA R, VAGHI R, *et al.* Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 2010, 43(5): 1383–1388
- HE X X, XU Y L, XU Y, *et al.* Adulteration identification of salmon and institutional preventive measures and suggestion. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(1): 220–225 [何晓霞, 许艳丽, 徐颖, 等. 麻哈鱼掺假鉴定及制度防范措施和建议. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 220–225]
- HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313–321
- KHEDKAR G D, JAMDADE R, NAIK S, *et al.* DNA barcodes for the fishes of the Narmada, one of India's longest rivers. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101460
- LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, *et al.* ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948
- LIU S F, LI X R, DU T F, *et al.* DNA barcoding and electronic microarray for common fish species in Shandong coastal waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016b, 23(4): 777–790 [柳淑芳, 李献儒, 杜腾飞, 等. 山东近海习见鱼类 DNA 条形码及其电子芯片分析. *中国水产科学*, 2016b, 23(4): 777–790]
- LIU S F, LI X R, LI D, *et al.* Development of DNA barcode-microarray for identification of Engraulidae fishes. *Progress in Fishery Sciences*, 2016a, 37(6): 19–25 [柳淑芳, 李献儒, 李达, 等. 鳀科(Engraulidae)鱼类 DNA 条形码电子芯片研究. *渔业科学进展*, 2016a, 37(6): 19–25]
- LIU S F, LI X R, YANG Y, *et al.* A DNA barcode for the Scorpaeniformes and construction of a DNA microarray for Scorpaenidae fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016c, 23(5): 1006–1022 [柳淑芳, 李献儒, 杨钰, 等. 鲈形目鱼类 DNA 条形码分析及鲈科 DNA 条形码电子芯片建立. *中国水产科学*, 2016c, 23(5): 1006–1022]
- LIU Y L, DING L. Comparison of the nutrition components in muscles of Norway salmon and artificial breeding salmon. *Food and Fermentation Technology*, 2011, 47(6): 84–86 [刘延岭, 邓林. 养殖三文鱼与挪威三文鱼营养成分的比较分析. *食品与发酵科技*, 2011, 47(6): 84–86]
- REMIGIO E A, HEBERT P D N. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 29(3): 641–647
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729
- WANG J N, TAI D M, AN M. Survey of the development of *Oncorhynchus mykiss* culture. *Journal of Hebei Fisheries*, 2015(3): 62–65 [王金娜, 邵定敏, 安苗. 虹鳟鱼养殖发展研究概况. *河北渔业*, 2015(3): 62–65]
- WANG M, LIU H, HUANG H, *et al.* Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding. *Journal of Food Science*, 2015(20): 254–258 [王敏, 刘荃, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用. *食品科学*, 2015(20): 254–258]
- WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2005, 360(1462): 1847–1857
- WONG H K, HANNER R H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 2008, 41(8): 828–837

Identification of Salmon Aquatic Products Sold in Qingdao Using DNA Barcoding Technology

ZHAO Xinning^{1,2}, MU Ming^{1,2}, LI Ang^{2,3}, LIU Shufang^{2,3}^①, ZHUANG Zhimeng^{2,3}

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

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, Shandong 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266200, China)

Abstract “Salmon” is the trade name of salmon and trout, these are internationally recognized high-grade aquatic products. In recent years, the large-scale supply of rainbow trout has had a great impact on the world salmon trade, triggering a war of “real” and “fake” salmon. The public impression is that the high quality and high market price of the famous Atlantic salmon (*Salmo salar*) from Atlantic Ocean is not comparable to the cultured freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thus, it is important to have knowledge about the species of salmon available in the aquatic market and whether the species information indicated on the label is true. It is very difficult for ordinary consumers to identify the species of salmon in the market. DNA barcoding has been widely used in the study of species taxonomy. It is a powerful technology for rapid and accurate identification of species. In this study, DNA barcoding was used to investigate the consistency between label information and the actual species of salmon in products across six large supermarkets and aquatic markets in Qingdao. Of the 74 salmon samples collected, 61 were *S. salar*, accounting for 82.43%; 11 were *O. mykiss*, accounting for 14.86%; and *O. keta* and *O. kisutch* accounted for 1.35%. Although the survey data shows that Atlantic salmon is the main salmon product in Qingdao, we identified that 14.86% of labels on salmon products were inconsistent with the test results, and more than 40% of the salmon products did not provide origin information. Thus, there are still some adulteration and food safety risks in aquatic salmon products. Market supervision of this internationally recognized high-end aquatic product needs to be strengthened. The relevant departments should urgently formulate product standards and testing standards to ensure the safety and traceability of salmon quality before inferior species affect the high public impression of salmon products.

Key words Salmon; DNA barcoding; *Salmo salar*; *Oncorhynchus mykiss*

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191224001

http://www.yykxjz.cn/

邵洋, 余达威, 杨方, 高沛, 许艳顺, 姜启兴, 夏文水. 不同等级中华绒螯蟹滋味物质的比较分析. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 192-198

SHAO Y, YU D W, YANG F, GAO P, XU Y S, JIANG Q X, XIA W S. Comparison of the taste compounds in different grades of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 192-198

不同等级中华绒螯蟹滋味物质的比较分析*

邵洋^{1,2} 余达威^{1,2} 杨方^{1,2} 高沛^{1,2}
许艳顺^{1,2} 姜启兴^{1,2} 夏文水^{1,2①}

(1. 江南大学食品学院 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心 江苏 无锡 214122)

摘要 为了比较分析不同等级中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (A级: 200 g; B级: 150 g; C级: 125 g) 滋味物质的差异, 利用电子舌比较分析其滋味轮廓, 并采用氨基酸自动分析仪、高效液相色谱仪、离子色谱仪检测其游离氨基酸、呈味核苷酸、有机酸、无机离子的含量, 计算味道强度值(TAV)和味精当量值(EUC)。研究表明, 在游离氨基酸(FAA)方面, A级蟹的呈甜味 FAA 含量最高, C级蟹的呈鲜味 FAA 含量最高; 在呈味核苷酸方面, C级蟹的含量最高; 在有机酸方面, 只检测到乳酸和柠檬酸, 且 A级蟹>B级蟹>C级蟹; 在无机离子方面, C级蟹的含量最高, 其 PO_4^{3-} 的含量显著 ($P<0.05$) 高于 A级和 B级蟹; 在 TAV 方面, 谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、 K^+ 、 Cl^- 、 PO_4^{3-} 的 TAV 值均大于 1, 对蟹肉滋味有贡献作用; 在 EUC 方面, C级蟹的 EUC 值最高。综合鲜味 FAA、鲜味核苷酸和无机离子的含量及 EUC 值可知, C级蟹鲜味更佳。

关键词 中华绒螯蟹; 游离氨基酸; 呈味核苷酸; 有机酸; 无机离子

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0192-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的水产养殖品种之一, 具有较高的经济价值、营养价值和食用价值, 在我国已有 30 多年人工养殖的历史, 目前, 养殖河蟹的省份达 20 多个, 主要有江苏、湖北、安徽、上海、辽宁、浙江、江西和山东等。江苏省是我国河蟹的养殖大省, 其河蟹产量从 1998 年起跃居全国首位, 2018 年产量达 75.09 万 t, 经济效益巨大(农业农村部渔业渔政管理局, 2018)。

中华绒螯蟹之所以味道鲜美, 取决于它的含氮化合物(游离氨基酸 FAA、核苷酸、有机碱等)和非含氮化合物(无机离子、有机酸和糖类), 其中, 最重要是

FAA 和呈味核苷酸(杨玲芝等, 2007)。目前, 国内外对河蟹的繁殖育种以及在生长过程中营养物质的变化研究较多, 而对滋味的研究相对较少。本研究参考 GB/T 19957-2005《地理标志产品 中华绒螯蟹》以及《中华绒螯蟹商品蟹标准》来选取 3 个不同等级中华绒螯蟹进行滋味的比较分析, 以期找到不同等级中华绒螯蟹的差异滋味物质及对滋味贡献大的滋味物质, 为蟹酱及蟹味调味品等产品的开发提供理论依据。

本研究首先通过电子舌对不同等级中华绒螯蟹肉整体滋味轮廓的差异进行分析, 并测定其 FAA、呈味核苷酸、有机酸和无机离子的含量, 对其组成和含

* 江苏省重点研发计划(BE2019336)、江苏省三新工程项目(Y2017-30)和国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180201)共同资助 [This work was supported by Key R & D Plan of Jiangsu Province (BE2019336), Three New Projects of Jiangsu Province (Y2017-30), and National First-Class Discipline Program of Food Science and Technology (JUFSTR20180201)]. 邵洋, E-mail: 616194810@qq.com

① 通讯作者: 夏文水, 教授, E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-12-24, 收修修改稿日期: 2020-04-20

量进行分析,考察不同等级中华绒螯蟹肉的滋味物质间的差异,计算其味道强度值(TAV)和味精当量值(EUC),以找出对滋味贡献大的呈味物质,并对鲜味FAA与呈鲜味核苷酸的协同作用进行评定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2019年10月下旬,中华绒螯蟹购于江苏省无锡市华润万家超市,为江苏省兴化市湖泊养殖雄蟹,体重分别为200 g(A级)、150 g(B级)和125 g(C级)。活蟹捞出水后立即用麻绳捆扎(防止其剧烈挣扎而造成体内指标的变化),放置于铺冰的泡沫箱中迅速带回实验室,用自来水冲洗活蟹污垢并用干净毛巾擦干,手工剥离中华绒螯蟹体肉、爪肉和螯肉,称重混匀并以组封装,冻藏于-60℃冰箱,待测。

5'-单磷酸腺苷二钠(AMP)、5'-单磷酸肌苷二钠(IMP)、雌黄嘌呤(Hx)、肌苷(HxR)等均购自美国Sigma公司;三氯乙酸、HClO₄、H₃PO₄、KH₂PO₄、K₂HPO₄·12H₂O、NaOH(均为分析纯)等均购于上海国药集团化学试剂有限公司;实验用水均为超纯水;0.22 μm针头式过滤器购于无锡华标科学仪器有限公司。

1.2 仪器与设备

MDF-U53V型超低温冰箱(日本三洋公司);T10高速分散器(德国IKA公司);DELTA-320型pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);4K-15型高速冷冻离心机(德国Sigma公司);Agilent 1100氨基酸分析仪(美国Agilent公司);Waters e2695高效液相色谱仪(美国Waters公司);Agilent 1200高效液相色谱仪(美国Agilent公司);ICS 5000离子色谱仪(美国戴安公司);SA402B电子舌(日本INSENT公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 电子舌测定 参照刘洪波等(2020)的方法。称取10 g蟹肉于离心管,加入20 mL去离子水均质2 min,离心(4℃,10000 g,10 min),取上清液。上述步骤重复操作一次,合并上清液,并用去离子水定容至100 mL。提取液装入电子舌专用杯中,置于自动进样分析装置上,每个样品重复4次,并去除第1次数据。Insent SA402B电子舌:AAE、CT0、CA0、C00和AE1传感器的响应特性分别为鲜味、咸味、酸味、苦味和涩味。传感器探针和参比探针在样品溶液中浸泡30 s,检测膜电位变化。

1.3.2 游离氨基酸的测定 参照Yu等(2018)的方法。流动相A为含有0.8%(m/v)乙酸钠、0.5%(v/v)三

乙胺水溶液;流动相B为2%乙酸钠缓冲液(pH 7.2)、乙腈和甲醇以体积比为1:2:2进行混合后的溶液。

1.3.3 呈味核苷酸的测定 参照景电涛等(2019)的方法。呈味核苷酸HPLC测定条件:采用SVEA C18色谱柱(5 μm,4.6 mm id×250.0 mm)和Waters 2489紫外可见检测器;检测波长为254 nm;柱温为30℃;进样量为10 μL;流动相:A液为pH 6.8的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,B液为甲醇,等度洗脱(A:B=98:2),流速为1 mL/min。

1.3.4 有机酸的测定 参照GB/T 5009-2016《食品中有机酸的测定》。取2 g蟹肉置于离心管中,加入10 mL 0.1%(v/v)磷酸溶液均质2 min,离心(4℃,10000 g,10 min),取上清液。上述步骤重复操作1次,合并上清液并用提取液定容至25 mL。提取液用0.22 μm水系膜过滤后进行高效液相色谱仪分析。有机酸测定条件:采用Diamonsil C18色谱柱(5 μm,4.6 mm id×250 mm)和Agilent 1200紫外可见检测器;检测波长为210 nm;柱温为30℃;进样量为5 μL;流动相为0.1%磷酸水溶液-甲醇(97:3,v/v),等度洗脱,流速为1 mL/min。

1.3.5 无机离子的测定 取2 g蟹肉置于离心管中,加入10 mL去离子水均质2 min,离心(4℃,10000 g,10 min),取上清液。上述步骤重复操作1次,合并上清液,并用去离子水定容至25 mL。提取液用0.22 μm水系膜过滤后进行离子色谱仪分析。阴离子检测条件:采用AS11-HC色谱柱和电导检测器;流动相为30 mmol/L NaOH,流速为1 mL/min。阳离子检测条件:采用CS12A色谱柱和电导检测器;流动相为20 mmol/L甲基磺酸,流速为0.25 mL/min。

1.3.6 味道强度值的计算 滋味物质的TAV值计算公式如下:TAV=C/T,式中,C代表样品中滋味物质的浓度,T代表该滋味物质的阈值。

1.3.7 味精当量值的计算 EUC的计算方法采用Yamaguchi等(1971)的方法,计算公式如下:

$$Y = \sum a_i b_i + 1218 (\sum a_i b_i) (\sum a_j b_j)$$

式中,Y为味精当量(mg MSG/g), a_i 和 a_j 分别代表鲜味FAA和鲜味核苷酸的浓度(均为mg/g), b_i 和 b_j 分别代表鲜味FAA和鲜味核苷酸的相对呈鲜系数(Glu,1; Asp,0.077; IMP,1; GMP,2.3; AMP,0.18),1218代表协同作用常数。

1.3.8 数据统计分析 电子舌的主成分分析(PCA)使用仪器自带的Alpha soft 14.0软件进行分析;其他实验结果均采用平均值±标准差(Mean±SD,n=3)表示,采用SPSS 21.0对所得数据进行统计分析,ANOVA进行方差分析,Duncan法进行多重比较,所

有显著性差异分析均在 $P=0.05$ 的水平下检验; 使用 Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 不同等级中华绒螯蟹肉电子舌的比较分析

不同等级中华绒螯蟹肉的滋味轮廓 PCA 结果见图 1。图中 PC1 和 PC2 的贡献率达到 97%，表明不同等级中华绒螯蟹滋味轮廓差异信息可以比较完整地显示在 PCA 图中。从图 1 可以看出，在 PC1 方向，A 级蟹肉的滋味轮廓与 B 级、C 级有明显区分；在 PC2 方向，B 级蟹肉与 A 级和 C 级蟹也有明显区分。

2.2 不同等级中华绒螯蟹肉中游离氨基酸的比较分析

不同等级中华绒螯蟹肉中 FAA 含量如表 1 所示。3 组蟹肉的主要 FAA 组成相似，Ala、Gly、Arg 和 Pro 4 种 FAA 含量较高，约占总 FAA 含量的 80%，这与 Shao 等(2014)和 Wang 等(2018)的研究结果一致。不同等级蟹肉的 FAA 含量存在一定差异，其中，蟹肉滋味的鲜甜程度与蟹肉中呈味 FAA(Glu、Gly、Ala、Asp、Ser 和 Pro)组成和含量有关(张娜, 2008); 呈鲜味 FAA (Asp 和 Glu)存在显著性差异($P<0.05$), C 级蟹

肉中呈鲜味 FAA 含量最高(130.03 mg/100 g), A 级蟹次之, B 级蟹最低; 呈甜味 FAA (Ser、Ala、Gly、Thr 和 Pro)在 A 级蟹中含量最高, 但 3 组样品间无显著性差异($P>0.05$); 呈苦味 FAA (Ile、Leu、His 和 Tyr)存在显著性差异($P<0.05$), 在 C 级蟹中含量最高。

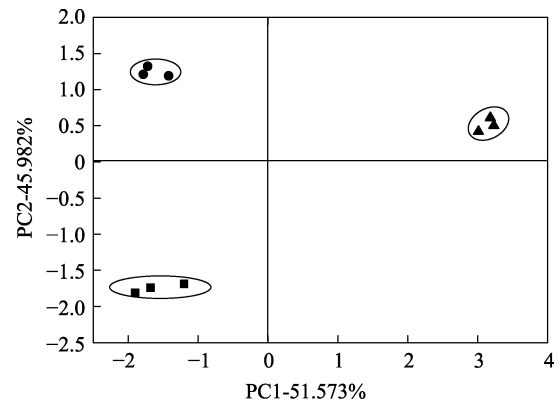


图 1 不同等级中华绒螯蟹滋味轮廓的主成分分析

Fig.1 PCA plot for the taste profile of Chinese mitten crabs at different grades

▲为 A 级蟹, ■为 B 级蟹, ●为 C 级蟹

▲: Grade A crabs, ■: Grade B crabs, ●: Grade C crabs

表 1 不同等级中华绒螯蟹游离氨基酸的组成/(mg/100 g)

Tab.1 Free amino acid composition of Chinese mitten crabs at different grades/(mg/100 g)

氨基酸 Amino acid	特征滋味 Taste attribute	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
天冬氨酸 Asp*	鲜/酸 Umami/sourness (+)	11.40±2.89 ^b	9.47±3.53 ^b	21.02±3.23 ^a
谷氨酸 Glu*	鲜/酸 Umami/sourness (+)	81.81±2.65 ^b	63.96±2.04 ^c	109.01±1.84 ^a
丝氨酸 Ser*	甜 Sweet (+)	8.88±1.56 ^a	6.04±0.60 ^b	6.17±0.43 ^b
丙氨酸 Ala*	甜 Sweet (+)	500.56±10.96 ^a	303.56±6.74 ^c	454.74±27.68 ^b
甘氨酸 Gly*	甜 Sweet (+)	420.33±20.14 ^c	495.75±30.20 ^a	440.58±18.44 ^{ab}
苏氨酸 Thr	甜 Sweet (+)	23.16±2.08 ^a	20.52±1.53 ^a	21.00±1.49 ^a
苯丙氨酸 Phe	苦 Bitter (-)	9.57±0.46 ^b	7.28±0.50 ^c	10.72±0.53 ^a
异亮氨酸 Ile	苦 Bitter (-)	5.92±0.71 ^a	5.35±0.44 ^a	2.29±0.10 ^c
亮氨酸 Leu	苦 Bitter (-)	13.73±0.94 ^a	11.10±0.62 ^c	13.43±0.91 ^a
组氨酸 His	苦 Bitter (-)	21.67±1.29 ^b	23.35±2.68 ^b	36.82±3.92 ^a
酪氨酸 Tyr	苦 Bitter (-)	16.98±0.66 ^a	14.86±2.82 ^a	11.16±0.72 ^c
精氨酸 Arg	苦/甜 Bitter/sweet (+)	585.74±27.14 ^a	572.01±23.39 ^a	452.26±28.07 ^b
缬氨酸 Val	甜/苦 Sweet/bitter (+)	16.54±2.02 ^{ab}	14.63±0.30 ^b	18.12±0.93 ^a
半胱氨酸 Cys	苦/甜/硫 Bitter/sweet/sulfurous (-)	142.95±10.51 ^b	160.94±8.87 ^a	130.43±3.14 ^b
甲硫氨酸 Met	苦/甜/硫 Bitter/sweet/sulfurous (-)	17.59±2.90 ^b	30.89±7.69 ^a	24.20±1.79 ^{ab}
赖氨酸 Lys	甜/苦 Sweet/bitter (-)	36.77±2.45 ^a	25.88±2.97 ^b	28.83±4.55 ^b
脯氨酸 Pro*	甜/苦 Sweet/bitter (+)	275.61±20.01 ^b	350.87±12.04 ^a	269.77±9.37 ^b
总计 Total		2189.22±69.08 ^a	2116.44±76.12 ^a	2050.54±73.72 ^a

注: *: 呈味 FAA; +: 对滋味有好的贡献; -: 对滋味有不好的贡献。不同字母表示差异显著, 下同

Note: * Flavor FAA; +: Had a good contribution to taste; -: Had a bad contribution to taste. Different letters indicated significant different. The same as below

2.3 不同等级中华绒螯蟹肉中呈味核苷酸的比较分析

不同等级中华绒螯蟹肉中呈味核苷酸的含量见表 2。IMP 和 AMP 是蟹肉中含量最高的 2 种呈味核苷酸, 均是 C 级蟹显著高于其他 2 组($P<0.05$); Hx 和 HxR 的含量较低且均无显著性差异($P>0.05$)。AMP 和 IMP 对蟹肉甜味和鲜味有贡献作用, 它们之间存在协同增效作用: 当低浓度的 IMP 存在时, 即使低浓度的 AMP 也能呈现鲜味, 并使甜味增加(Kawai *et al.*, 2002); 而由 IMP 降解产生的 HxR 和 Hx 是蟹肉中的异味物质, 呈苦味(Hong *et al.*, 2017; 宁正祥等, 1995)。

表 2 不同等级中华绒螯蟹呈味核苷酸含量/(mg/100 g)
Tab.2 Content of flavor nucleotides in Chinese mitten crabs at different grades/(mg/100 g)

核苷酸 Nucleotide	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
IMP	20.90±2.14 ^b	19.80±4.05 ^b	39.29±2.57 ^a
AMP	37.31±3.76 ^b	38.07±4.37 ^b	49.23±6.11 ^a
Hx	0.48±0.05 ^a	0.40±0.03 ^a	0.88±0.50 ^a
HxR	9.09±0.33 ^a	10.95±0.73 ^a	12.10±1.16 ^a

2.4 不同等级中华绒螯蟹肉中有机酸的比较分析

有机酸是水产品呈味的主要组成成分, 其中乳酸、琥珀酸、乙酸、丙酸和草酸已经被鉴定存在于甲壳纲动物体中(张娜, 2008)。乳酸可以提高缓冲能力, 也对呈味起增强作用; 而琥珀酸及其钠盐具有鲜味, 同时具有和谷氨酸类似的增强鲜味的特性(卜俊芝, 2012)。

不同等级中华绒螯蟹肉有机酸含量如表 3 所示。结果只检测到乳酸和柠檬酸, 因此, 只针对二者进行比较分析。3 组蟹肉的有机酸含量存在显著性差异($P<0.05$), A 级和 B 级蟹肉中乳酸含量显著高于 C 级

表 3 不同等级中华绒螯蟹有机酸含量/(mg/100 g)

Tab.3 Content of organic acids in Chinese mitten crabs at different grades/(mg/100 g)

有机酸 Organic acid	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
乳酸 Lactic acid	71.22±4.29 ^a	69.85±4.53 ^a	54.94±1.10 ^b
琥珀酸 Succinic acid	ND	ND	ND
柠檬酸 Citric acid	51.94±3.06 ^a	31.32±1.50 ^b	26.10±7.68 ^b
苹果酸 Malic acid	ND	ND	ND
乙酸 Acetic acid	ND	ND	ND

注: ND: 未检测到该物质

Note: ND: This substance was not detected

蟹($P<0.05$); A 级蟹的柠檬酸含量显著高于 B 级和 C 级蟹($P<0.05$), 是 C 级蟹的 2 倍。本研究测得的河蟹乳酸含量(54~74 mg/100 g)低于张娜(2008)(100~400 mg/100 g)和杨玲芝(2006)(300~600 mg/100 g)的研究结果, 可能与河蟹的养殖条件及捕捞时期有关。

2.5 不同等级中华绒螯蟹肉中无机离子的比较分析

无机离子的存在使有机成分的呈味效果得以充分发挥(夏延斌, 2008)。风味减缺实验表明, 将雪蟹(*Chinopeetes opilio*)和河豚鱼等浸出物中的 K^+ 和 Na^+ 除去, 甜味和鲜味急剧降低, 不仅失去本身特有的风味, 而且苦味增强, 出现异味(朱清顺等, 2008); 除去 PO_4^{3-} 后, 甜味、鲜味和咸味都略有降低; 除去 Cl^- , 则几乎所有的口味都减弱(Zhang *et al.*, 2019)。

不同等级中华绒螯蟹肉中无机离子含量见表 4。在检测到的 6 种无机离子中, Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 和 PO_4^{3-} 的含量较高, 可能对蟹肉滋味的贡献较大, 这与张娜(2008)和石婧等(2015)的研究结果一致; 3 组蟹的无机离子含量具有一定差异, C 级蟹的无机离子含量均高于 A 级和 B 级蟹, 其中, C 级蟹的 PO_4^{3-} 含量显著高于 A 级和 B 级蟹($P<0.05$)。

表 4 不同等级中华绒螯蟹无机离子含量/(mg/100 g)

Tab.4 Content of inorganic ions in Chinese mitten crabs at different grades/(mg/100 g)

无机离子 Inorganic ions	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
Na^+	123.25±5.41 ^a	155.85±19.54 ^a	162.02±19.26 ^a
K^+	226.03±1.53 ^a	240.10±19.56 ^a	246.26±9.26 ^a
Mg^{2+}	58.77±5.80 ^a	59.35±4.66 ^a	63.20±3.69 ^a
Ca^{2+}	20.94±4.62 ^a	19.84±6.07 ^a	26.56±5.27 ^a
Cl^-	243.96±18.05 ^a	239.04±14.82 ^a	267.30±8.90 ^a
PO_4^{3-}	345.19±7.35 ^b	360.40±30.34 ^b	434.47±31.42 ^a

2.6 不同等级中华绒螯蟹肉滋味强度值的比较分析

在对食品进行滋味强度的判定及探寻某个单一组分对其整体风味的贡献时, TAV 是最为经典和客观的方法。当滋味物质的 TAV ≥ 1 时, 表示其具有滋味活性, 可能对中华绒螯蟹整体滋味轮廓具有显著性贡献, 值越高, 其贡献度越大(赵樑等, 2016)。

由表 5 可知, 3 组蟹肉的滋味活性物质的差异如下: A 级蟹有 8 种(特有柠檬酸), B 级蟹有 9 种(特有 Met 和 Pro), C 级蟹有 9 种(特有 IMP 和 Cl^-)。Ala 和 Arg 的 TAV 是其他滋味活性物质的数倍, 对滋味贡献很大, 这与 Kong 等(2012)和 Zhuang 等(2016)的研究结果相近。

表 5 不同等级中华绒螯蟹肉滋味活性物质及其 TAV 值
Tab.5 Taste-active compounds and their TAV values in meat of Chinese mitten crabs at different grades

呈味物质 Flavor substance	味道阈值 Taste threshold/ (mg/100 g)	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
Glu	30	2.73	2.13	3.63
Ala	60	8.34	5.06	7.58
Gly	130	3.23	3.81	3.39
His	20	1.08	1.17	1.84
Arg	50	11.71	11.44	9.05
Met	30	0.59	1.03	0.81
Pro	300	0.92	1.17	0.90
IMP	25	0.84	0.79	1.57
柠檬酸 Citric acid	45	1.15	0.70	0.58
K ⁺	130	1.74	1.85	1.89
Cl ⁻	266	0.92	0.90	1.00
PO ₄ ³⁻	130	2.66	2.77	3.34

2.7 不同等级中华绒螯蟹肉味精当量的比较分析

味精当量(EUC)可以直观地反映鲜味 FAA 与鲜味核苷酸之间的协同增鲜作用,目前已经广泛地用于分析食品的鲜味(Chang *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008)。不同等级中华绒螯蟹肉味精当量见表 6。本研究测得的 EUC 值为 2.40~7.47 g MSG/100 g, 与陈德慰(2007) (4.20 g MSG/100 g)和汤辰婧(2014) (2.37~2.87 g MSG/100 g)的研究结果相近。C 级蟹肉的味精当量显著高于其他 2 组($P<0.05$), 达到 7.47 g MSG/100 g, 即每 100 g 蟹肉(以湿重计)所具有的鲜味强度大约相当于 7.47 g 味精所产生的鲜味,这与 C 级蟹肉中 Glu 和 IMP、AMP 的含量较高相关。

表 6 不同等级中华绒螯蟹肉味精当量分析/(g MSG/100 g)
Tab.6 Analysis of EUC in Chinese mitten crabs at different grades/(g MSG/100 g)

鲜味物质 Umami substance	A 级蟹 Grade A crabs	B 级蟹 Grade B crabs	C 级蟹 Grade C crabs
IMP	20.90±2.14 ^b	19.80±4.05 ^b	39.29±2.57 ^a
AMP	37.31±3.76 ^b	38.07±4.37 ^b	49.23±6.11 ^a
Asp	11.40±2.89 ^b	9.47±3.53 ^b	21.02±3.23 ^a
Glu	81.81±2.65 ^b	63.96±2.04 ^c	109.01±1.84 ^a
EUC	3.16	2.40	7.47

3 结论

本研究首先通过电子舌比较分析不同等级中华

绒螯蟹滋味轮廓, 并分析其非挥发性滋味物质差异, 采用 TAV 确定其主要的滋味物质及贡献, 最后通过 EUC 分析鲜味 FAA 和鲜味核苷酸之间的协同作用, 并对其鲜味进行评价。总的来说, C 级蟹鲜味更佳。在生活中, 消费者通常会选择更大的 A 级蟹, 一方面是其蟹肉及蟹黄、蟹膏更多, 食用方便; 另一方面可能与其肉质有关; 具体原因有待进一步从感官与滋味、肉质整体上进一步进行研究。本研究结果可为中华绒螯蟹的蟹味类产品的开发提供一定的参考, 进一步提高中华绒螯蟹的利用价值, 促进中华绒螯蟹产业的发展。

参 考 文 献

- BU J Z. Study on nutrition and flavor components of three kinds of sea crabs. Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2012, 1-87 [卜俊芝. 三种海蟹营养和风味成分的研究. 浙江工商大学硕士研究生学位论文, 2012, 1-87]
- Bureau of Fishery and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. 2018 China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [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. 2018 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- CHANG H L, CHAO G R, CHEN C C, *et al.* Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. Food Chemistry, 2001, 74(2): 203-207
- CHEN D W. Flavor and freezing technology of cooked Chinese mitten crab. Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2007, 1-96 [陈德慰. 熟制大闸蟹风味及冷冻加工技术的研究. 江南大学博士研究生学位论文, 2007, 1-96]
- CHIANG P D, YEN C T, MAU J L. Non-volatile taste components of various broth cubes. Food Chemistry, 2007, 101(3): 932-937
- HONG H, REGENSTEIN J M, LUO Y J. The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(9): 1787-1798
- JING D T, YANG F, YU D W, *et al.* Reasons for quality deterioration of obscure pufferfish fillets during frozen storage. Progress in Fisheries Science, 2019, 40(5): 166-172 [景电涛, 杨方, 余达威, 等. 暗纹东方鲀冻藏品质劣化的原因解析. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 166-172]
- KAWAI M, OKIYAMA A, UEDA Y. Taste enhancements between various amino acids and IMP. Chemical Senses, 2002, 27(8): 739-745

- KONG L, CAI C F, YE Y T, *et al.* Comparison of non-volatile compounds and sensory characteristics of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) reared in lakes and ponds: Potential environmental factors. *Aquaculture*, 2012, 364/365: 96–102
- LIU H B, JIANG T, LUO R J, *et al.* Evaluation of the taste-active values of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) from different geographic origins using a taste sensing system. *Food Science*, 2020, 41(16): 132–137 [刘洪波, 姜涛, 骆仁军, 等. 味觉分析系统对不同产地中华绒螯蟹滋味强度值的区分. *食品科学*, 2020, 41(16): 132–137]
- NING Z X, ZHAO M M. *Food biochemistry*. Guangzhou: South China University of Technology Press, 1995 [宁正祥, 赵谋明. *食品生物化学*. 广州: 华南理工大学出版社, 1995]
- SHAO L C, WANG C, HE J, *et al.* Meat quality of Chinese mitten crabs fattened with natural and formulated diets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2014, 23(1): 59–72
- SHI J, WANG S, GONG J, *et al.* Effect of different fattening models on non-volatile taste active compounds of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) meat. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(15): 347–351 [石婧, 王帅, 龚骏, 等. 不同育肥方式对中华绒螯蟹雄蟹肌肉呈味物质的影响. *食品工业科技*, 2015, 36(15): 347–351]
- TANG C J. Research on taste and quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 1–58 [汤辰婧. 中华绒螯蟹滋味品质的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 1–58]
- TSAI S Y, TSAI H L, MAU J L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry*, 2008, 107(3): 977–983
- WANG Q J, WU X G, LONG X W, *et al.* Nutritional quality of different grades of adult male Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(3): 944–955
- XIA Y B. *Food flavor chemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2008 [夏延斌. *食品风味化学*. 北京: 化学工业出版社, 2008]
- YAMAGUCHI S, YOSHIKAWA T, IKEDA S, *et al.* Measurement of the relative taste intensity of some 1- α -amino acids and 5'-nucleotides. *Journal of Food Science*, 1971, 36(6): 846–849
- YANG L Z, CHEN S S, QU Y H, *et al.* Studies on taste components in *Eriocheir sinensis*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(1): 92–96 [杨玲芝, 陈舜胜, 曲映红, 等. 中华绒螯蟹主要呈味成分研究. *上海水产大学学报*, 2007, 16(1): 92–96]
- YANG L Z. Studies on taste components in *Eriocheir sinensis* and their changes during heating. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2006, 1–53 [杨玲芝. 中华绒螯蟹主要呈味物质及其在加热过程中的变化. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2006, 1–53]
- YU D W, XU Y S, REGENSTEIN J M, *et al.* The effects of edible chitosan-based coatings on flavor quality of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 2018, 242: 412–420
- ZHANG N L, AYED C, WANG W L, *et al.* Sensory-guided analysis of key taste-active compounds in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(50): 13809–13816
- ZHANG N. Study on flavor compounds of Chinese mitten crab. Master's Thesis of Jiangnan University, 2008, 1–37 [张娜. 中华绒螯蟹风味物质的研究. 江南大学硕士研究生学位论文, 2008, 1–37]
- ZHAO L, WU N, WANG X C, *et al.* Comparison of the flavor components of Chinese mitten crab at different growth stages. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(7): 261–269 [赵樑, 吴娜, 王锡昌, 等. 不同生长阶段下中华绒螯蟹滋味成分差异研究. *现代食品科技*, 2016, 32(7): 261–269]
- ZHU Q S, BAI R F. Intrinsic quality comparison of cultured crab (*Eriocheir sinensis*). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(3): 463–468 [朱清顺, 柏如发. 养殖中华绒螯蟹风味品质比较研究. *中国农学通报*, 2008, 24(3): 463–468]
- ZHUANG K J, WU N, WANG X C, *et al.* Effects of 3 feeding modes on the volatile and nonvolatile compounds in the edible tissues of female Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Food Science*, 2016, 81(4): 968–981

(编辑 马瑾艳)

Comparison of the Taste Compounds in Different Grades of Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

SHAO Yang^{1,2}, YU Dawei^{1,2}, YANG Fang^{1,2}, GAO Pei^{1,2}, XU Yanshun^{1,2},
JIANG Qixing^{1,2}, XIA Wenshui^{1,2}①

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract This study aimed to compare the taste compounds of different grades of Chinese mitten crab (Grade A: 200 g; Grade B: 150 g; Grade C: 125 g). The taste profiles of the different grades were distinguished by an electronic tongue. Free amino acids, 5'-nucleotides, organic acids, and inorganic ions were analyzed by an automatic amino acid analyzer, high-performance liquid chromatography (HPLC), and an ion chromatography, and the taste activity value (TAV) and equivalent umami concentration (EUC) were also calculated. Grade A crabs had the highest sweetness amino acid content, and grade C crabs had the highest umami amino acid content. The taste nucleotides were the highest in the grade C crabs. For the organic acids, only lactic acid and citric acid were detected, and Grade A crabs > Grade B crabs > Grade C crabs. Grade C crabs had the highest phosphate (PO_4^{3-}) content, which was significantly ($P < 0.05$) higher than Grade A and Grade B crabs. The TAV values of alanine, glycine, histidine, arginine, phenylalanine, proline, potassium (K^+), chlorine (Cl^-), and PO_4^{3-} in the different grades were greater than 1 and contributed to Chinese mitten crab taste. Grade C crabs had the highest EUC value. Based on the contents of umami FAA, umami nucleotide, inorganic ions, and EUC value, the umami of grade C crabs was superior.

Key words Chinese mitten crab; Free amino acids; Taste nucleotides; Organic acids; Inorganic ions

① Corresponding author: XIA Wenshui, E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200229001

http://www.yykxjz.cn/

赵玲, 曹荣, 王联珠, 刘淇, 刘胜男. 条斑紫菜烤制前后特征风味变化研究. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 199–207
ZHAO L, CAO R, WANG L Z, LIU Q, LIU S N. Study on the characteristic flavor change of *Porphyra yezoensis* before and after roasting. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 199–207

条斑紫菜烤制前后特征风味变化研究*

赵玲 曹荣 王联珠 刘淇^① 刘胜男

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 为探讨烤制对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)主要风味物质的影响, 研究烤制前后条斑紫菜挥发性成分的变化。采用电子鼻、FlavourSpec[®]风味分析仪和固相微萃取-气相色谱-质谱联用(SPME-GC-MS)对比分析条斑紫菜在烤制前后挥发性风味物质的组成变化。电子鼻分析结果显示, 条斑紫菜烤制前后的挥发性成分存在一定差异, 二者的第一、二主成分相同, 均为烃类、含氮类物质, 但其对主成分的贡献率不同。风味分析表明, 条斑紫菜烤制前后挥发性成分差异显著, 烤制后出现吡嗪类特征风味物质。SPME-GC-MS 分析表明, 醛类、醇类、酮类和烷烃类构成了条斑紫菜的主体风味, 烤制后吡嗪、甲基吡嗪、2,5-二甲基-吡嗪、2-乙基-5-甲基-吡嗪、3-乙基-2,5-二甲基-吡嗪和 2-乙基-6-甲基-吡嗪等物质含量显著增加。综上所述, 经过烤制, 构成条斑紫菜的主要风味物质发生了明显变化, 其中吡嗪类物质的相对含量显著增加。

关键词 条斑紫菜; 烤制; 风味变化

中图分类号 S985.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0199-09

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)隶属于红藻门(Rhodophyta)、原红藻纲(Protofloridaeophyceae)、红毛菜目(Bangiiales)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*), 富含蛋白质、多糖、微量元素等, 极富营养价值及药用价值(王亚等, 2012; 赵玲等, 2018)。紫菜因其独特的风味和丰富的营养而深受广大消费者喜爱。随着经济发展和消费水平的提高, 消费者对风味的要求也随之提高, 尤其对以烤、调为主的紫菜加工品, 不仅以色泽、味感等评价产品质量, 并且将香型等嗅觉感受作为品质的重要评价指标(胡传明等, 2011)。焙烤是一种重要的食品加工方法, 可以改进食品的风味、色泽和质地, 促进食欲(吴巧, 2012)。条斑紫菜经过烤制后, 一般用于寿司料理、食品加工等, 也可直接食用。

近年来, 气相离子迁移谱仪(曹荣等, 2019)、人

工嗅辨器(Misry *et al*, 1996)以及电子鼻(卞瑞姣等, 2017)等检测技术的进步, 使得特征风味物质的研究成为可能。科研工作者对多种水产品的挥发性物质进行了研究, 且取得了理想的研究进展(高瑞昌等, 2013; 杨欣怡等, 2015; 王当丰等, 2016; 曹荣等, 2019), 绿藻、褐藻及红藻等多种海藻的挥发性物质已被分析鉴定(Akakabe *et al*, 2003; Boonprab *et al*, 2006), 但对紫菜挥发性物质的研究较少(胡传明等, 2011; 曹荣等, 2019; 姚兴存等, 2015), 且缺少对烤制前后条斑紫菜主要风味物质变化的研究。

本研究以条斑紫菜为研究对象, 分别采用电子鼻、FlavourSpec[®]风味分析仪和固相微萃取-气相色谱-质谱联用(SPME-GC-MS)对主要挥发性风味物质进行检测, 对比分析条斑紫菜在烤制前后挥发性成分的变化, 以期对条斑紫菜加工品的品质评定提供参考。

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 赵玲, E-mail: zhaoling@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 刘淇, 研究员, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-02-29, 收修改稿日期: 2020-04-06

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

条斑紫菜鲜菜于 2019 年 1 月 8 日采自江苏省如东内沙海域,由江苏省南通海旅水产品有限公司加工成干条斑紫菜,再通过远红外线烤箱三段式焙烤获得烤制条斑紫菜,烤制过程中未加任何食品添加剂。

PEN3 便携式电子鼻,德国 Airsense 公司; FlavourSpec[®]风味分析仪,德国 G.A.S 公司;气相色谱-质谱联用仪(7980A/5975C),美国 Agilent 公司;固相微萃取装置(DVB/CAR/PDMS 50/30 μm),美国 Supelco 公司。

1.2 方法

1.2.1 电子鼻检测 分别称取 1.0 g 剪碎的烤制前条斑紫菜和烤制后的条斑紫菜,置于 20 mL 顶空瓶中,加盖密封,依次用电子鼻进行检测,电子鼻的 10 个传感器所对应的代表性化合物类型见表 1。测定参数:清洗时间 100 s,气体流速 200 mL/min,数据采集时间 80 s。采用 WinMaster 软件进行数据的采集与处理,分析方法包括主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)和负荷加载分析(Loadings)。

表 1 电子鼻传感器构成及其性能
Tab.1 Composition of sensors in electronic nose and performance

序号 Number	传感器 Sensor	性能描述 Performance
1	W1C	芳香成分
2	W5S	灵敏度大,对氮氧化物很灵敏
3	W3C	氨水,对芳香成分灵敏
4	W6S	主要对氢气有选择性
5	W5C	烷烃芳香成分
6	W1S	对甲烷灵敏
7	W1W	对硫化物灵敏
8	W2S	对乙醇灵敏
9	W2W	芳香成分,对有机硫化物灵敏
10	W3S	对烷烃灵敏

1.2.2 挥发性成分检测 分别称取 1.0 g 剪碎的样品置于 20 mL 顶空瓶中,60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后进样。采用仪器配套的分析软件(LAV 和 Reporter、Gallery Plot、Dynamic PCA 三款插件以及 GC \times IMS library search)分析数据。

1.2.3 SPME-GC-MS 检测 参照王玉等(2018)的方法进行测定,固相微萃取方法:取 1.0 g 样品放入

20 mL 顶空瓶中,将 SPME 萃取头插入到顶空瓶中顶空 60 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 30 min,迅速插入 GC 进样口中。色谱条件:色谱柱为 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;采用分流模式进样(分流比 10:1);载气为氦气;柱流速为 1 mL/min;解吸时间为 5 min;解吸温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;采用阶段式程序升温模式(初始温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 5 min;10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$;250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min)。质谱条件为电离方式 EI;电子能量为 70 eV;离子源温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;传输线温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。扫描质量范围为 m/z 45~300。

2 结果与分析

2.1 烤制前后条斑紫菜的气味差异分析

2.1.1 主成分分析法(PCA)分析条斑紫菜烤制前后的电子鼻响应值 如图 1 所示,第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 95.24%和 4.37%,总贡献率为 99.61%,表明其基本涵盖了样品的整体信息,可以用来表征烤制前后条斑紫菜的气味组成。烤制前后条斑紫菜对应的电子鼻检测信号的特征区域没有重叠,样品距离较远,说明其有各自的气味特征,香气物质的种类或含量不同,主成分分析能较好地地区分样品,表明烤制前后条斑紫菜的气味有显著差异。

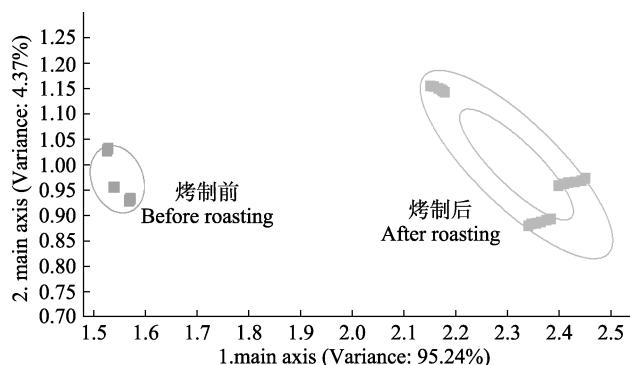


图 1 条斑紫菜烤制前后气味的 PCA 分析

Fig.1 PCA analysis of odors derived from *P. yezoensis* before and after roasting

2.1.2 线性判别法(LDA)分析条斑紫菜烤制前后的电子鼻响应值 如图 2 所示,判别式 LD1 和判别式 LD2 的贡献率分别为 99.14%和 0.11%,两判别式的总贡献率为 99.25%,基本涵盖样品的整体信息,采用 LDA 分析能够明显区分烤制前后条斑紫菜的气味组成,且 LDA 分析比 PCA 分析样品间的距离远,说明线性判别分析能提高样品的分类精度。

2.1.3 Loadings 负荷加载分析 图 3 为烤制前后条斑紫菜 Loadings 负荷加载分析,总贡献率为 99.61%。

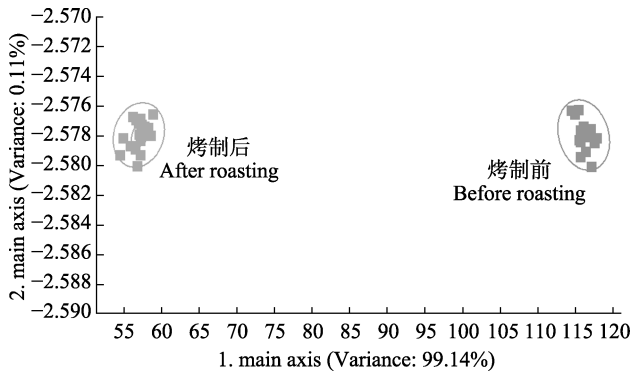


图 2 条斑紫菜烤制前后气味的 LDA 分析

Fig.2 LDA analysis of odors derived from *P. yezoensis* before and after roasting

不同传感器在负荷加载分析图中的位置可以反映传感器对于样品挥发性气味贡献率的大小;若某一传感器的响应值接近于零,说明该传感器的识别作用可以忽略;反之则说明该传感器的识别能力越强。

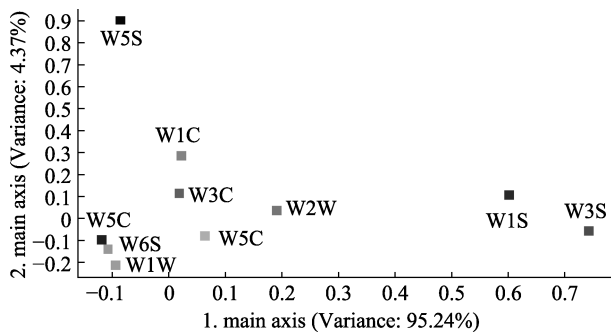


图 3 条斑紫菜烤制前后气味的 Loadings 分析

Fig.3 Loadings analysis of odors derived from *P. yezoensis* before and after roasting

从图 3 可以看出, W3S(烃类)、W5S(氮氧化合物)传感器对主成分贡献率最大,这说明烤制前后条斑紫菜的第一、二主成分相同,均为烃类、含氮类物质,其贡献率不同。

2.2 烤制前后条斑紫菜的特征性挥发性物质

气相离子迁移谱图中每一个点代表一种挥发性化合物,颜色越深、面积越大表示含量越高。如图 4 所示,烤制后,条斑紫菜中分离鉴定出 35 种挥发性组分,其中包含醛类、酮类、醇类、酯类以及芳香族化合物等。

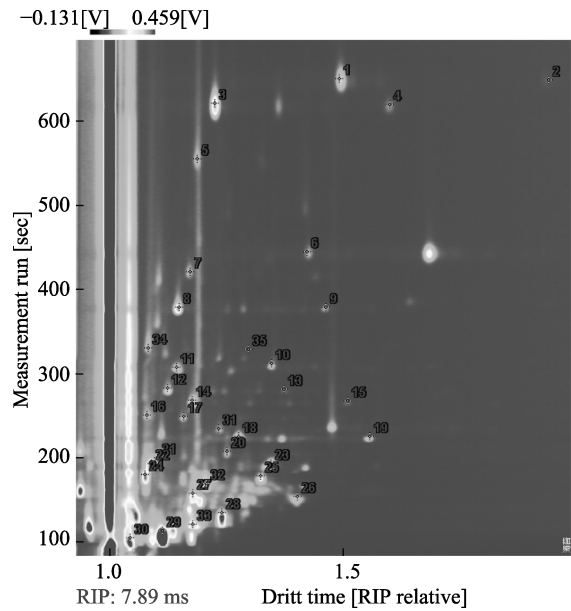


图 4 烤制后条斑紫菜的气相离子迁移谱
Fig.4 Gas phase ion mobility of *P. yezoensis* after roasting

图 5 中每一行代表 1 个样品中选取的全部信号峰,每一列代表同一挥发性有机物在烤制前后条斑紫菜中的信号峰。从图 5 中可以直观地看出,每种样品的完整挥发性有机物信息以及样品之间挥发性有机物的差异。由图 5 可知,条斑紫菜烤制前后挥发性风味物质含量差异显著,烤制前,条斑紫菜中壬醛、辛醛、己醛、戊醛、苯甲醛、2-乙基呋喃等物质的含量较

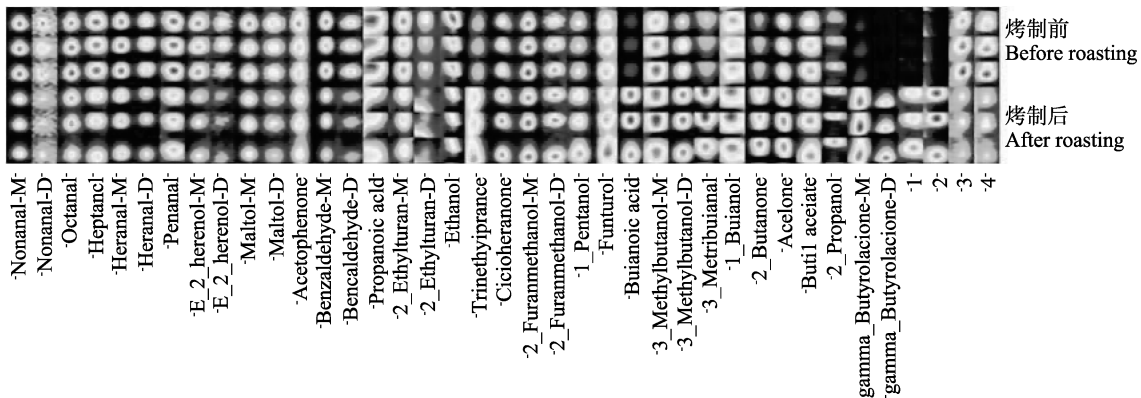


图 5 烤制前后条斑紫菜 Gallery Plot 图谱
Fig.5 Gallery plot of *P. yezoensis* before and after roasting

高; 烤制后, 甲基吡嗪、1-戊醇、呋喃甲醛、3-甲基丁醇、3-甲基丁醛、1-丁醇、丙酮等物质的含量较高。

2.3 SPME-GC-MS 分析

焙烤过程中会发生一系列化学反应, 由不同的前体物质合成或分解产生不同种类的香气物质, 包括酮类、醇类、醛类、酯类以及杂环类物质(如呋喃类、吡嗪类和吡咯类等)(静玮等, 2016)。

通过 SPME-GC-MS 分析, 烤制前后的紫菜样品分别鉴定出 83 种和 86 种挥发性物质, 按结构分类的结果见表 2。由表 2 可知, 醛类、酮类、醇类和烷烃

类是条斑紫菜挥发性成分的主要组成成分, 其含量组成一定程度上代表了条斑紫菜的特征风味组成。

2.3.1 醛类化合物 醛类化合物的阈值较低, 对气味的贡献大(高瑞昌等, 2013)。己醛通常产生一种原生味、鲜香的特征香味(赵庆喜等, 2007), 壬醛具有青草气味((阚建全, 2002; Phat *et al*, 2016), (E,E)-2,4-庚二烯醛具有鱼腥味和金属味, 苯甲醛具有苦杏仁味(曹荣等, 2019), 因此, 它们可能对条斑紫菜的特征风味有重要贡献, 共同构成了其鲜腥的气味。烤制前后的条斑紫菜中均检测出 2-甲基-丁醛、3-甲基-丁醛、戊醛、己醛、(E)-2-戊烯醛、2-甲基-2-戊烯醛、2-己

表 2 烤制前后条斑紫菜的挥发性成分及相对含量

Tab.2 Changes in volatile compounds and relative contents of *P. yezoensis* before and after roasting

化合物名称 Compound	保留时间 Retention time/min	相对峰面积百分含量 Relative content/%	
		烤制前 Before roasting	烤制后 After roasting
醛类 Aldehydes			
乙醛 Acetaldehyde	1.74	4.52	—
丙醛 Propanal	2.10	1.96	—
2-甲基-丁醛 2-Methyl-butanal	3.25	0.54	1.68
3-甲基-丁醛 3-Methyl-butanal	3.33	1.26	2.94
戊醛 Pentanal	4.55	0.33	0.21
己醛 Hexanal	7.36	1.32	0.83
(E)-2-甲基-丁烯醛(E)-2-Methyl-2-butenal	7.64	1.61	—
(E)-2-戊烯醛(E)-2-Pentenal	8.58	0.42	0.27
2-甲基-2-戊烯醛 2-Methyl-2-pentenal	9.29	0.55	0.78
2-己烯醛 2-Hexenal	10.71	0.37	0.31
(Z)-4-庚烯醛(E,E)-4-Heptadienal	11.27	—	—
辛醛 Octanal	12.23	0.29	0.25
壬醛 Nonanal	14.24	1.20	1.40
(E,E)-2,4-庚二烯醛(E,E)-2,4-Heptadienal	15.99	—	0.49
苯甲醛 Benzaldehyde	16.49	1.94	2.05
BETA-环柠檬醛 2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde	18.01	0.11	—
酮类 Ketones			
丙酮 Acetone	2.25	2.24	3.44
2-丁酮 2-Butanone	3.08	0.89	—
2-戊酮 2-Pentanone	4.50	—	0.25
2,3-丁二酮 2,3-Butanedione	4.60	0.44	—
3-己酮 3-Hexanone	6.88	—	0.22
1-甲氧基-2-丙酮 1-Methoxy-2-propanone	7.89	—	0.64
3-羟基-2-丁酮 3-Hydroxy-2-butanone	12.14	0.39	0.54
4,4-二甲基-2-环戊烯-1-酮 4,4-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	16.16	—	0.37
3,5-辛二烯-2-酮 3,5-Octadien-2-one	16.40	1.36	—
1-甲基-2-吡咯烷酮 1-Methyl-2-pyrrolidinone	18.78	0.22	1.49
4-[2,2,6-三甲基-7-氧杂二环[4.1.0]庚-1-基]-3-丁烯-2-酮 4-(2,2,6-Trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-3-buten-2-one	23.15	—	0.20

续表 2

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	相对峰面积百分含量 Relative content/%	
		烤制前 Before roasting	烤制后 After roasting
(E)-4-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-3-丁烯-2-酮 (E)4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one	23.26	0.41	0.70
2-吡咯烷酮 2-Pyrrolidinone	23.63	—	0.37
甲基环戊烯醇酮 2-Ethylidenecyclohexanone	26.39	0.17	—
醇类 Alcohols			
1-甲氧基-2-丙醇 1-Methoxy-2-propanol	8.52	0.31	0.41
正丁醇 1-Butanol	9.00	0.22	0.30
1-戊烯-3-醇 1-Penten-3-ol	9.40	1.91	1.31
3-甲基-1-丁醇 3-Methyl-1-Butanol	11.42	—	0.31
(Z)-2-戊烯醇(Z)-2-Penten-1-ol	12.83	0.67	—
2-甲基-3-戊醇 2-Methyl-3-pentanol	13.27	—	0.89
2-十九烷醇 2-Nonadecanol	13.58	—	0.37
2-丁氧基乙醇 2-Butoxy-ethanol	14.35	2.26	1.97
2,6-二甲基-环己醇 2,6-Dimethyl-cyclohexanol	17.70	1.56	—
松油醇 a,a,4-Trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	19.10	0.42	—
苯氧基乙醇 2-Phenoxy-ethanol	24.96	0.21	0.25
(S)-2-甲基-1-十二烷醇(S)-2-Methyl-1-dodecanol	16.68	—	0.10
2-(十二烷氧基)乙醇 2-(Dodecyloxy)-ethanol	17.95	—	0.07
烷烃类 Alkanes			
己烷 Hexane	1.55	5.51	—
十甲基环戊硅氧烷 Decamethyl-cyclopentasiloxane	9.964	0.39	0.36
十二烷 Dodecane	10.25	2.04	1.28
十三烷 Tridecane	12.42	5.00	3.77
2,6,11-三甲基-十二烷 2,6,11-Trimethyl-dodecane	13.50	0.46	—
9-辛基-十七烷 9-Octyl-heptadecane	13.70	0.15	—
3-甲基-十三烷 3-Methyl-tridecane	13.72	0.28	—
环庚烷 Cyclotridecane	14.14	0.11	—
二十烷 Eicosane	14.49	0.49	—
十四烷 Cyclotetradecane	15.09	0.11	—
10-甲基-二十烷 10-Methyl-eicosane	13.69	—	0.15
十四烷基环氧乙烷 Tetradecyl oxirane	16.06	—	0.82
环十二烷 Cyclododecane	16.95	—	0.15
2,2-二甲基丙亚基环己烷 Neopentylidene cyclohexane	18.01	—	0.25
十七烷 Heptadecane	19.12	—	0.56
4-(乙酰苯基)苯甲烷(4-Acetylphenyl)phenylmethane	26.18	—	0.24
1-戊烯 1-Pentene	11.41	0.38	—
1-二十六烯 1-Hexacosene	16.68	0.12	—
1-十八烯 1-Octadecene	16.96	0.22	—
8-十七烷烯 8-Heptadecene	19.60	2.31	5.90
长叶烯[1S-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,8a.beta.)]- decahydro-4,8,8-trimethyl-9-methylene-1,4-methanoazulene	17.21	3.16	—
反式 3 癸烯 Trans-3-decene	12.73	—	0.23
1,4-辛二烯 1,4-Octadiene	21.04	—	0.12
1-十四烯 1-Tetradecene	22.77	—	0.06
(Z)-4-甲基-2-己烯(Z)-4-Methyl-2-hexene	19.47	—	0.34

续表 2

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	相对峰面积百分含量 Relative content/%	
		烤制前 Before roasting	烤制后 After roasting
苯并环丁烯 Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene	11.57	—	0.14
4-苯基-1-环己烯 3-Cyclohexen-1-yl-benzene	19.95	0.32	0.39
酯类 Esters			
草酸环丁基十三酯 Oxalic acid, cyclobutyl tridecyl ester	13.49	—	0.26
亚硫酸十五烷基戊酯 Sulfurous acid, pentadecyl pentyl ester	13.54	—	0.15
草酸异丁基十五烷基酯 Oxalic acid, isobutyl pentadecyl ester	15.18	0.31	—
丙酸戊酯 Propanoic acid, pentyl ester	15.79	0.27	0.48
丁内酯 Butyrolactone	18.15	0.47	—
磷酸三乙酯 Triethyl phosphate	18.48	1.28	1.77
3-环己烯羧酸乙酯 Ethyl 3-cyclohexenecarboxylate	18.97	0.63	—
2,4,4-三甲基戊烷-1,3-二基双(2-甲基丙酸酯) Propanoic acid, 2-methyl-1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	21.62	3.79	1.18
庚烷-2-基丁酸酯 Butanoic acid, 1-methylhexyl ester	21.73	0.16	—
(1-羟基-2,4,4-三甲基戊-3-基) 2-甲基丙酸酯 Propanoic acid, 2-methyl-2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	21.74	—	0.05
2-氟苯甲酸, 2,5-二氯苯酯 2-Fluorobenzoic acid, 2,5-Dichlorophenyl ester	23.15	0.15	—
顺丁烯二酸二丁酯 2-Butenedioic acid (Z)-, dibutyl ester	24.37	0.28	0.24
二氢猕猴桃内酯 5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuranone	27.38	0.42	0.63
邻苯二甲酸异壬酯 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	29.33	0.29	—
吡嗪类 Pyrazines			
吡嗪 Pyrazine	10.54	—	0.32
甲基吡嗪 Methyl-pyrazine	11.70	0.25	0.55
2,5-二甲基-吡嗪 2,5-Dimethyl-pyrazine	12.83	—	1.10
2-乙基-5-甲基-吡嗪 2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	14.14	—	0.37
3-乙基-2, 5-二甲基-吡嗪 3-Ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	15.09	—	0.69
2-乙基-6-甲基-吡嗪 2-Ethyl-6-methyl-pyrazine	14.03	—	0.21
呋喃类 Furans			
2-乙基-呋喃 2-Ethyl-furan	3.99	0.13	0.21
2,3-二氢呋喃 2,3-Dihydrofuran	6.23	0.48	0.33
5-甲基-2(5H)呋喃酮 5-Methyl-2(5H)-furanone	18.89	0.73	—
4H-吡喃-4-酮 4H-Pyran-4-one	17.49	0.35	—
3-甲基-2(5H)-呋喃酮 3-Methyl-2(5H)-furanone	19.47	0.58	—
呋喃甲醛 Furfural	15.49	—	0.49

烯醛、辛醛、壬醛、苯甲醛等, 醛类化合物总含量分别占 16.42% 和 11.70%。

2.3.2 酮、醇类化合物 3,5-辛二烯-2-酮对腥味有一定的增强作用, 它可能对条斑紫菜的特征风味有一定的贡献; 而分子量较大的不饱和酮类化合物具有花香味(陈婉珠等, 2006), 碳链越长, 其散发的特征花

香味越强, 这可能与烤制品散发的清醇香味有关。

饱和醇的阈值较高, 对气味贡献较小(刘红等, 2010); 只有含量高的醇类才会对气味产生较大的影响, 而条斑紫菜样品中饱和醇类含量不高, 因此, 对气味的贡献值不大。醇类化合物中的 1-戊烯-3-醇具有独特的鱼腥味, 为不饱和醇, 阈值比饱和醇的低,

对整体风味有一定的贡献。

2.3.3 烷烃类化合物 烤制前后的条斑紫菜中共检测出 27 种烷烃类化合物,其中 8-十七烷烯的相对含量较高,已知其是淡水褐藻和一些海藻的特征风味物质(胡传明等,2011),因此,也可能是条斑紫菜的重要风味物质之一。

2.3.4 酯类化合物 烤制前后的条斑紫菜中均检测出二氢猕猴桃内酯,其属于类胡萝卜素降解物质,具有花香味,所以,酯类对条斑紫菜整体风味也有一定的贡献。

2.3.5 吡嗪和呋喃类化合物 吡嗪是含氮的杂环化合物,具有典型焙烤香气,在烤制食品中经常出现(Marsili *et al*, 1996; Mottram *et al*, 1998),它们可能是条斑紫菜烤制后香味的重要来源。条斑紫菜烤制后,吡嗪类物质包括甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2-乙基-5-甲基吡嗪、3-乙基-2,5-二甲基吡嗪和 2-乙基-6-甲基吡嗪等的种类和相对含量显著增加;其中,2 种吡嗪类物质,2,5-二甲基吡嗪和 3-乙基-2,5-二甲基吡嗪,因仅在条斑紫菜中被检出而作为其特有的化合物(李微等,2016)。

2-乙基呋喃有较强的焦香香气(Mottram *et al*, 1998),呋喃类化合物一般是通过葡萄糖或者果糖等糖的热降解反应产生的(静玮等,2016),呋喃甲醛的生成说明条斑紫菜经过烤制后其糖类物质发生了热降解反应。

3 讨论

挥发性风味是水产品最典型的特征之一,是评价产品品质的一个重要指标,气味是由于其产品的挥发性成分的种类以及组成比例不同而造成的。胡传明等(2011)研究表明,浙江省象山栽培海区的坛紫菜和江苏省南通栽培海区的条斑紫菜含量最高的挥发性组分是 8-十七烯,其次是十五烷,醛类化合物种类最多。曹荣等(2019)研究发现,福建省漳州海域不同采收期的坛紫菜挥发性成分差别明显,一水坛紫菜的挥发性成分以 2-乙基呋喃以及一些阈值较高的酮、醇类为主;二水和三水坛紫菜中丁内酯、2-己烯-1-醇、1-辛烯-3-醇含量相对较高;四水和五水坛紫菜中具有青草味的壬醛和具有苦杏仁味的苯甲醛含量较高。由此可见,不同养殖地区的紫菜挥发性风味成分也有明显差异。

本研究采用电子鼻、FlavourSpec[®]风味分析仪和固相微萃取气相色谱质谱联用(SPME-GC-MS),对比分析了江苏省如东内沙海域的条斑紫菜在烤制前后

挥发性成分的变化,研究表明,条斑紫菜烤制前后挥发性成分差异显著,二者的第一、第二主成分相同,均为烃类、含氮化合物类物质,但其对主成分的贡献率不同;烤制后出现吡嗪类特征风味物质.SPME-GC-MS 分析表明,醛类、醇类、酮类和烷烃类构成了条斑紫菜的主体风味,烤制后,吡嗪、甲基吡嗪、2,5-二甲基-吡嗪、2-乙基-5-甲基-吡嗪、3-乙基-2,5-二甲基-吡嗪和 2-乙基-6-甲基-吡嗪等含量显著增加。综上所述,经过烤制,构成条斑紫菜的挥发性风味物质发生了明显变化,其中吡嗪类物质的相对含量显著增加。这有助于明确焙烤风味产生的途径,进一步优化加工工艺,但风味的形成机理尚需深入研究。

参 考 文 献

- AKAKABE Y, MATSUI K, KAJIWARA T. 2,4-Decadienals are produced via (R)-11-HPITE from arachidonic acid in marine green alga *Ulva conglobata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2003, 11(17): 3607–3609
- BIAN R J, CAO R, ZHAO L, *et al*. Application of the electronic nose for assessing the freshness of *Cololabis saira*. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 243–247 [卞瑞姣, 曹荣, 赵玲, 等. 电子鼻在秋刀鱼鲜度评定中的应用. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 243–247]
- BOONPRAB K, MATSUI K, AKAKABE Y, *et al*. Formation of aldehyde flavor (*n*-hexanal, 3Z-nonenal and 2E-nonenal) in the brown alga, *Laminaria angustata*. *Journal of Applied Phycology*, 2006, 18(3/4/5): 409–412
- CAO R, LIU N, WANG L Z, *et al*. Flavor analysis of *Porphyra haitanensis* harvested during different periods. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 686–692 [曹荣, 刘楠, 王联珠, 等. 不同采收期坛紫菜的风味比较. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 686–692]
- CHEN W Z, RUI H M, ZHANG L. Analysis of kelp astringent substances by HS-SPME-GC-MS. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(12): 71–73 [陈婉珠, 芮汉明, 张玲. 海带腥味物质的 HS-SPME-GC-MS 分析. *食品工业科技*, 2006, 27(12): 71–73]
- GAO R C, SU L, HUANG X Y, *et al*. Research progress of flavor components in fishery products. *Fisheries Science*, 2013, 32(1): 59–62 [高瑞昌, 苏丽, 黄星奕, 等. 水产品风味物质的研究进展. *水产科学*, 2013, 32(1): 59–62]
- HU C M, XU J L, ZHU J Y, *et al*. Characteristic volatile matters in *Porphyra* (Bangiales). *Marine Sciences*, 2011, 35(5): 106–111 [胡传明, 徐继林, 朱建一, 等. 紫菜特征挥发性物质分析. *海洋科学*, 2011, 35(5): 106–111]
- JING W, SU Z P, LIN L J. Volatile profiling of macadamia nuts during roasting. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(6): 1224–1231 [静玮, 苏子鹏, 林丽静. 澳洲坚果焙烤过程中挥发性成分的特征分析. *热带作物学报*, 2016,

- 37(6): 1224–1231]
- KAN J Q. Food chemistry. Beijing: China Agricultural University Press, 2002, 309–360 [阚建全. 食品化学. 北京: 中国农业大学出版社, 2002, 309–360]
- LI W, OMANNISA M, XU J L, *et al.* Comparative study of volatile components from two strains of *Pyropia haitanensis* in different culture areas. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 147–156 [李微, 阿曼尼萨·买买提, 徐继林, 等. 不同海域不同品种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)挥发性成分的比较分析. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 147–156]
- LIU H, YANG R H, DAI Z Y, *et al.* The preparation of meat flavor essence from silver carp and the analysis of flavor components. *Journal of Chinese Institute of Food Science of Technology*, 2010, 10(2): 149–153 [刘红, 杨荣华, 戴志远, 等. 利用鲢鱼制备肉味香精及其香气成分的分析. 中国食品学报, 2010, 10(2): 149–153]
- MARSILI R. Techniques for analyzing food aroma. New York: Food Science and Technology, 1996, 81–112
- MISRY B S, REINECCIUS T, OLSON L K. Gas chromatography-olfactometry for the determination of key odorants in foods. New York: Marcel Dekker, 1996, 265–292
- MOTTRAMDS D S. Flavor formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 1998, 62(4): 415–424
- PHAT C, MOON B K, LEE C. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. *Food Chemistry*, 2016, 192: 1068–1077
- WANG D F, LI T T, LIU N, *et al.* Analysis of effects of protamine on volatile compounds for grass carp slices by HS-SPME-GC-MS technology combined with electronic nose. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(10): 163–170 [王当丰, 李婷婷, 刘楠, 等. 顶空固相微萃取-气质联用法结合电子鼻分析鱼精蛋白对草鱼片挥发性气味的的影响. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 163–170]
- WANG Y, WANG R D, XUE Y, *et al.* Analysis of volatile flavor compounds changes during traditional processing of salted Spanish mackerel. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(9): 268–275 [王玉, 王睿迪, 薛勇, 等. 传统加工咸鲛鱼的挥发性风味成分. 现代食品科技, 2018, 34(9): 268–275]
- WANG Y, ZHANG C H, GE Y. Comparison of 12 elemental concentrations in different *Porphyra* products. *Guangdong Trace Elements Science*, 2012, 19(9): 14–19 [王亚, 张春华, 葛滢. 不同紫菜产品中 12 种元素含量的比较研究. 广东微量元素科学, 2012, 19(9): 14–19]
- WU Q. Analysis and regulation on the aroma in baked quail eggs. Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2012 [吴巧. 烤制鹌鹑蛋香气分析与调控研究. 合肥工业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- YANG X Y, LIU Y, XU C H, *et al.* Extraction and analysis of volatile flavor compounds in aquatic products: A review. *Food Science*, 2015, 36(5): 289–295 [杨欣怡, 刘源, 许长华, 等. 水产品中挥发性风味物质提取和分析研究进展. 食品科学, 2015, 36(5): 289–295]
- YAO X C, QIU C J, LAI X Y. Preparation and flavor component analysis of *Porphyra yezoensis* flavor essence. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 33(3): 28–34 [姚兴存, 邱春江, 赖小燕. 紫菜风味香精的制备及其风味成分分析. 食品科学技术学报, 2015, 33(3): 28–34]
- ZHAO L, CAO R, WANG L Z, *et al.* Nutritional analysis and umami assessment of *Pyropia yezoensis* from Jing Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 134–140 [赵玲, 曹荣, 王联珠, 等. 靖海湾条斑紫菜的营养及鲜味评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 134–140]
- ZHAO Q X, XUE C H, XU J, *et al.* Analysis of volatile compounds in bighead carp by microwave distillation and solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(2): 267–271 [赵庆喜, 薛长湖, 徐杰, 等. 微波蒸馏-固相微萃取-气相色谱-质谱-嗅觉检测器联用分析鳙鱼鱼肉中的挥发性成分. 色谱, 2007, 25(2): 267–271]

(编辑 马瑾艳)

Study on the Characteristic Flavor Change of *Porphyra yezoensis* before and after Roasting

ZHAO Ling, CAO Rong, WANG Lianzhu, LIU Qi^①, LIU Shengnan

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract With recent advances in detection technology the volatile substances in green algae, brown algae, red algae, and other algae have been identified. However, few studies have investigated the volatile substances of laver (genus *Porphyra*), especially, the analysis of the flavor change in *Porphyra yezoensis* after roasting. To address this issue, the electronic nose, FlavourSpec[®] flavor analyzer and SPME-GC-MS were used to compare the volatile components of *P. yezoensis* before and after roasting. The results of the electronic nose analysis showed that there were some differences in the volatile components derived from *P. yezoensis* before and after roasting. The two main components were the same, but the contribution of hydrocarbon compounds to the main components were different. Thus, the electronic nose was capable of discriminating the flavor differences in *P. yezoensis* before and after roasting. Flavor analysis showed that the volatile components of *P. yezoensis* before and after roasting were significantly different. The contents of nonanal, octanal, hexanal, valeraldehyde, benzaldehyde, and 2-ethyl-furan, were relatively higher in *P. yezoensis*. After roasting, the contents of methyl-pyrazine, 1-pentanol, furfural, 3-methyl-butanol, and 3-methyl-butanal were higher. The characteristic flavor and relative content of pyrazines also increased after roasting. The SPME-GC-MS analysis showed that the total volatile flavor compounds of laver samples before and after roasting were 83 and 86, respectively. The major volatile compounds of *P. yezoensis* were aldehydes, alcohols, ketones, and alkanes. The pyrazines consisted of methyl pyrazine, 2,5-dimethyl-pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine and 2-ethyl-6-methyl-pyrazine. These compounds increased significantly after roasting. In summary, the main flavor substances of *P. yezoensis* varied significantly after roasting, especially the content of pyrazines (increased significantly). This research clarifies how the roast flavor is generated, allowing us to optimize our processing technology. Future research is required to understand the mechanisms underlying the formation of flavor.

Key words *Porphyra yezoensis*; Roast; Flavor change

① Corresponding author: LIU Qi, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200816001

http://www.yykxjz.cn/

邓小雪, 程腾, 赵芸, 许加超, 李昭勇, 付晓婷. 海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的制备及性能. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 208–214

DENG X X, CHENG T, ZHAO Y, XU J C, LI Z Y, FU X T. Preparation and properties of sodium alginate/enteromorpha polysaccharide composite film. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 208–214

海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的制备及性能*



邓小雪¹ 程腾¹ 赵芸¹ 许加超^{1①} 李昭勇^{2①} 付晓婷¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266000;

2. 青岛市纤维纺织品监督检验研究院 山东 青岛 266061)

摘要 为探讨海藻酸钠与浒苔多糖的协同作用,本研究首次以海藻酸钠和浒苔多糖为基材,甘油为增塑剂制备生物降解复合膜,探究了海藻酸钠与浒苔多糖质量比、共混溶液总浓度、甘油含量对复合膜拉伸强度、断裂伸长率、水蒸气透过率和水溶性的影响,同时,利用扫描电子显微镜技术(SEM)、傅里叶红外光谱(FTIR)进行微观结构表征。结果显示,海藻酸钠与浒苔多糖之间具有良好的相容性和协同作用,无明显的相分离现象。组分质量比、共混总浓度和甘油含量均对膜性能有较大影响,其中,质量比影响最显著,添加适量浒苔多糖可提高海藻酸钠膜的拉伸强度和断裂伸长率,降低海藻酸钠膜的水蒸气透过率,但膜水溶性略微提高。在组分质量比为 8:2 时,膜拉伸强度从 99.22 MPa 增加到 108.41 MPa,断裂伸长率从 5.14% 增加到 6.20%,水蒸气透过率从 6.445×10^{-11} g/(m·s·Pa) 降低到 6.027×10^{-11} g/(m·s·Pa),复合膜的综合性能达到最优。进一步优化了共混总浓度和甘油含量,最佳共混总浓度为 1.6%(m/v),最佳甘油含量为 0.9%(m/v)。本研究表明,浒苔多糖的添加增强了海藻酸钠膜的机械性能和阻隔性能。

关键词 海藻酸钠; 浒苔多糖; 复合膜; 性能

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0208-07

海藻酸钠是从褐藻中提取的一种阴离子多糖,是由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)组成的线性聚合物,结构单元以 MG、MM 及 GG 的形式排列(Lee *et al*, 2012; Bai *et al*, 2019; Guo *et al*, 2016)。海藻酸钠可与大多数的二价或多价金属离子反应,形成不可逆的稳定凝胶, Ca^{2+} 是最常见的交联剂,1 个 Ca^{2+} 可与海藻酸钠中的 2 个 GG 片段形成典型的“蛋盒结构”(叶世著, 2015; Galus *et al*, 2013)。由于海藻酸钠具有安全无毒、良好的成膜性和生物相容性的优点,

被广泛用作膜材料(董峰等, 2019)。单一组分膜通常存在一些理化性能和功能上的缺陷,因此,2 种或 3 种组分构成的复合膜的研究越来越广泛(Zhu *et al*, 2014)。

浒苔多糖是从浒苔(*Ulva prolifera*)中提取的一种水溶性多糖,主要由鼠李糖、葡萄糖醛酸、木糖等组成(Yu *et al*, 2017; 段元慧等, 2014)。浒苔多糖具有抗氧化、抗菌和降血脂等多种生物活性(潘晓慧等, 2019; 孙元芹等, 2013),可应用于保健食品、药品、化妆品、

* 山东省科技重大专项(2019JZZY020613)和青岛市科技发展计划(20-3-4-31-nsh)共同资助 [This work was supported by Major Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Province (2019JZZY020613), and Scientific and Technological Demonstration Project of Qingdao(20-3-4-31-nsh)]. 邓小雪, E-mail: 17863803440@163.com

① 通讯作者: 许加超, 教授, E-mail: xujia@ouc.edu.cn; 李昭勇, 高级工程师, E-mail: qdlizhy@163.com

收稿日期: 2020-08-16, 收修改稿日期: 2020-08-25

杀菌剂和动物饲料等行业。

目前,国内外未见海藻酸钠与浒苔多糖成膜性的研究。为探究海藻酸钠与浒苔多糖间的协同作用,提高海藻酸钠膜的性能,本文首次研究了海藻酸钠与浒苔多糖复合膜的制备、力学和阻隔性能测定及微观表征,以期改善纯海藻酸钠膜的综合性能,同时扩大浒苔多糖的应用范围,也为浒苔及其多糖在农业、食品、化妆及药物领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

海藻酸钠(黏度为 500 mPa·s),青岛海之林生物科技有限公司;浒苔多糖,山东省青岛海兴源生物科技有限公司;丙三醇,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;CaCl₂,分析纯,天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要设备及仪器

数显恒温水浴锅(HH-2),常州国华电器公司;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9090A),上海精宏实验设备有限公司;电热真空干燥箱(DZG-6020),上海培因实验仪器公司;测厚规(10JEWELS),威海裕福量具有限公司;质构仪(TMS-PRO),美国食品技术公司;扫描电子显微镜(JSM-840),日本东京电子公司;X 射线晶体衍射仪(D8 Advance X),德国 Bruker 公司;傅里叶红外变换光谱(Nicolet iN10),美国 Nicolet 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 将一定量的海藻酸钠溶解于蒸馏水中,60℃水浴搅拌 1 h,得到海藻酸钠溶液,然后按照一定比例添加浒苔多糖和甘油,继续搅拌至完全溶解。真空脱气 1 h,将配制好的胶液倾倒在 15 cm×15 cm 亚克力板上。然后将干燥好的膜浸泡于质量分数为 2% CaCl₂ 溶液(w/v)中进行交联,交联结束后,使用蒸馏水冲洗交联膜。再自然晾干,将制备的海藻酸钠/浒苔多糖复合膜置于相对湿度为 50%的干燥器中调试平衡 3 d,以备后续性能测定使用。

1.3.2 性能测试与结构表征 SEM 分析:利用液氮冷冻处理使膜自然断裂,并将膜的表面和断面进行镀金处理,在 20 kV 加速电压下,使用扫描电子显微镜进行微观结构观察。

FTIR 分析:将复合膜充分干燥,剪碎后研磨,溴化钾压片制样,取适量样品测试。测试条件:扫描波数范围为 400~4000 cm⁻¹,扫描次数为 16 次,分辨

率为 4 cm⁻¹。

厚度的测定:使用精密度为 0.001 mm 的测厚规测量海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的厚度。每个组分选择 3 张膜进行测量,随机在每张膜上选取 10 个点,并分别计算平均值。

力学性能的测定:本研究对复合膜力学性能的测量包括拉伸强度和断裂伸长率。参考 ASTM Method D882 标准并稍作修改(ASTM, 2012)。将膜裁成 50 mm×15 mm 的条形,设定起始夹距为 30 mm,拉伸速率为 60 mm/min,在 TMS-Pro 质构仪上进行测定,每组样品测量 10 条,最终结果取其平均值。

拉伸强度(TS)和断裂伸长率(EB)计算公式如下:

$$TS = F_{\max} / A$$

式中, F_{\max} 表示样品断裂所需的最大力(N); A 表示膜的横截面积(膜厚度×膜宽度)(m²)。

$$EB = (L / L_0) \times 100\%$$

式中, L 表示样品断裂时的伸长量(m); L_0 表示样品的初始长度(m)。

水蒸气透过率的测定:参照 Han 等(2016)的方法,并稍作修改。将膜裁成直径为 8 cm 的圆,称取 25 g CaCl₂(使用前 120℃烘干至恒重)置于 3 cm×5 cm 的恒重称量瓶中(相对湿度为 0%),将膜紧紧密封于称量瓶顶部,将其放置于装有定量蒸馏水的干燥器(相对湿度为 100%)中,温度保持在 25℃。12 h 内每 2 h 测量一次称量瓶的质量,每个组 3 次平行,并计算其平均值。计算公式如下:

$$WVP = \frac{\Delta m \times D}{A \times T \times \Delta p}$$

式中, Δm 为测量前后称量瓶质量增量(g); D 为样品厚度(m); A 为测试杯口的面积(m²); T 为测量间隔时间(h); Δp 为膜两侧的水蒸气压力差(Pa)。

水溶性的测定:参照 Norajit(2010)的方法,稍作修改。将膜裁成 3 cm×3 cm 的方形样品,放入 105℃烘箱中 24 h,称重 m_0 。然后将干燥好的膜浸入装有 50 ml 蒸馏水的锥形瓶中,25℃浸泡 24 h,取出膜后再次放入 105℃烘箱中,烘至恒重,称重 m_1 。每个组分取 3 个试样测定,计算其平均值。计算公式如下:

$$WS = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100\%$$

1.3.3 数据分析 所有数据采用平均值±标准差(Mean±SD)形式表示,利用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,通过 SPSS 软件进行 Duncan 分析,所有实验至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 扫描电镜

如图1所示,纯海藻酸钠膜的表面平整光滑,均匀分布密密麻麻的小突起,这可能由海藻酸钠与 Ca^{2+} 交联引起(Xu *et al*, 2003)。然而,随着浒苔多糖含量的增加,复合膜电镜图呈现出不同的形态。与纯海藻酸钠膜相比,多糖质量比为9:1、8:2、7:3的复合膜的表面更为光滑,断面规则分布着一些条状结构,网络结构更加致密紧实,这可能有利于提高复合膜的性能。但质量比为6:4和5:5的复合膜形貌稍变粗糙并有杂质,断面结构不均匀,不致密,但均没有观察到相分离的现象。

2.2 傅里叶红外光谱

通过傅里叶红外光谱可分析纯海藻酸钠膜、海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的组成以及多糖分子间作用力。如图2所示,海藻酸钠膜在3362、1598、1420

和 1031 cm^{-1} 处有特征峰。其中, 3362 cm^{-1} 处为—OH的伸缩振动吸收峰, 1598 和 1420 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应—COOH的反对称伸缩振动吸收峰和对称伸缩振动吸收峰, 1031 cm^{-1} 处为糖苷键吸收峰(Zhang *et al*, 2017; 陈妮娜等, 2018)。海藻酸钠/浒苔多糖复合膜与纯海藻酸钠膜的红外光谱基本类似,主要差异是羟基基团的拉伸振动峰向较低的波长发生偏移。

2.3 海藻酸钠/浒苔多糖质量比对复合膜性能的影响

如图3所示,随着浒苔多糖含量的增加,膜拉伸强度从99.22 MPa增加到108.41 MPa,然后下降到68.25 MPa,断裂伸长率也呈现类似的趋势。与纯海藻酸钠膜相比,海藻酸钠/浒苔多糖质量比为9:1和8:2的复合膜具有更佳的力学性能。这与扫描电镜观察到的结果相符合。复合膜的最佳多糖质量比为8:2。如表1所示,随着2种多糖比例的下降,复合膜厚度和水蒸气透过率显著下降($P<0.05$),水溶性逐渐升高。

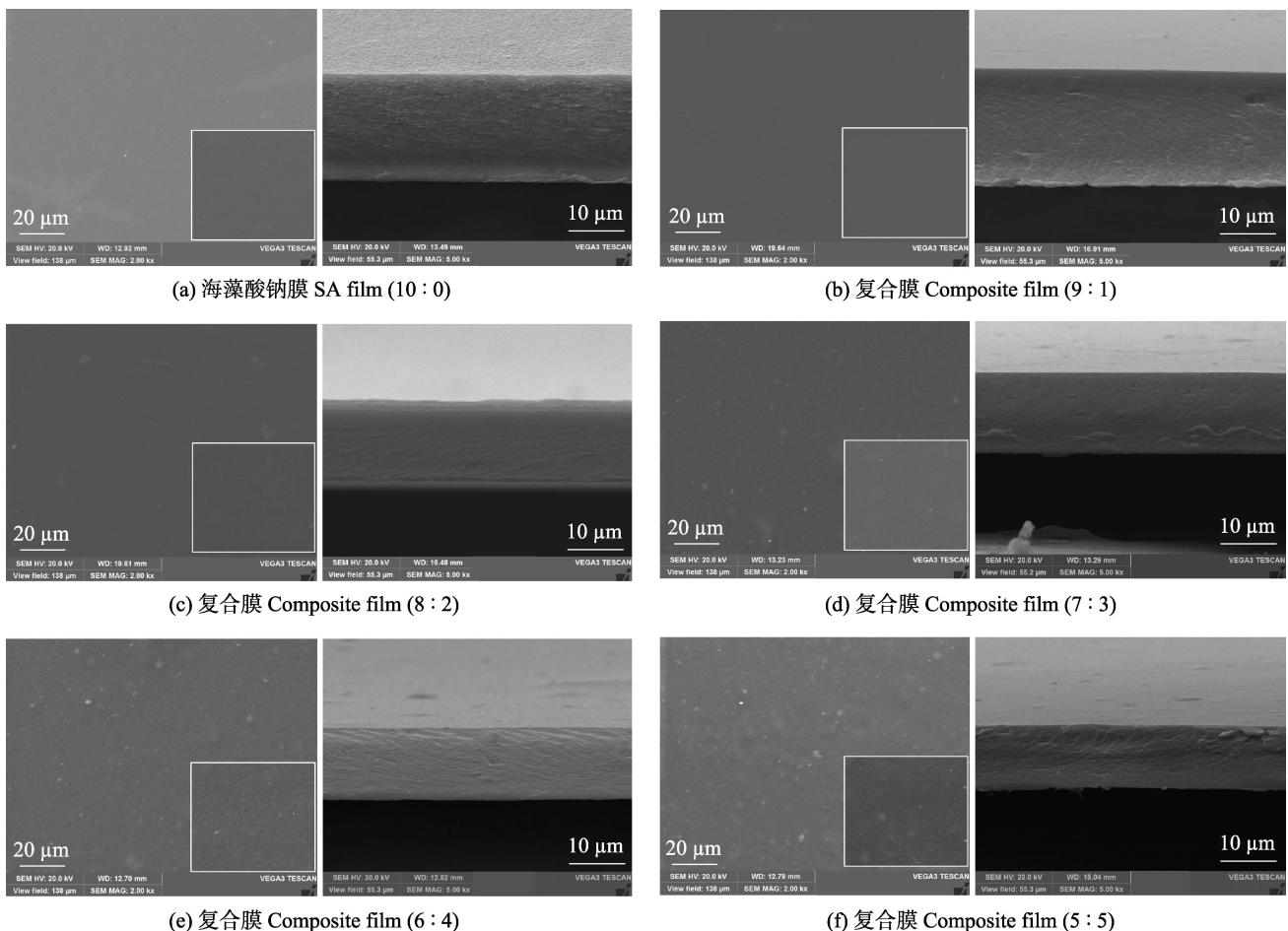


图1 不同质量比的膜表面(左)及断面(右)微观结构

Fig.1 Microstructure of surface (left) and cross-section (right) of film with different component ratio

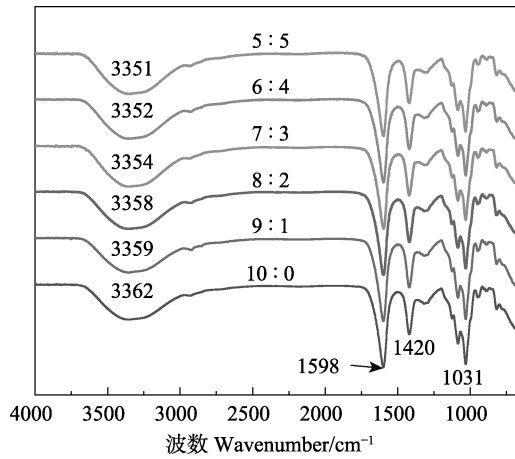


图 2 海藻酸钠膜及海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的红外光谱
Fig.2 FTIR spectra of SA films and SA/EP composite films

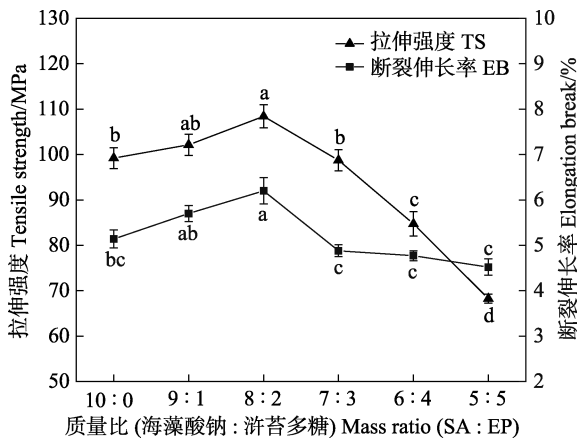


图 3 海藻酸钠/浒苔多糖质量比对复合膜力学性能的影响
Fig.3 Effects of component ratio of SA/EP on the mechanical properties of composite films

不同上标字母表示在统计上有显著差异($P < 0.05$)。下同
Different superscript letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$). The same as below

表 1 海藻酸钠/浒苔多糖质量比对复合膜物理性能的影响
Tab.1 Effects of component ratio on the physical properties of composite films

海藻酸钠/浒苔多糖质量比 Component mass ratio (SA : EP)	厚度 Thickness/mm	水蒸气透过率 Water vapor permeation/ [$\times 10^{-11}$ g/(m·s·Pa)]	水溶性 Water solubility/%
10 : 0	0.025 6 \pm 0.000 3 ^a	6.445 \pm 0.073 ^a	3.52 \pm 0.64 ^b
9 : 1	0.021 5 \pm 0.000 3 ^b	6.256 \pm 0.102 ^{ab}	4.07 \pm 0.46 ^b
8 : 2	0.021 4 \pm 0.000 4 ^b	6.027 \pm 0.172 ^{ab}	4.29 \pm 0.68 ^{ab}
7 : 3	0.018 2 \pm 0.000 3 ^c	5.795 \pm 0.131 ^b	5.35 \pm 1.10 ^{ab}
6 : 4	0.015 7 \pm 0.000 3 ^d	4.744 \pm 0.094 ^c	6.28 \pm 0.45 ^{ab}
5 : 5	0.014 2 \pm 0.000 3 ^c	4.171 \pm 0.091 ^d	6.98 \pm 1.29 ^a

2.4 海藻酸钠/浒苔多糖共混膜液总浓度对复合膜性能的影响

如图 4 所示,随着总浓度的增加,膜拉伸强度先增大后趋于稳定,断裂伸率先增大后下降。如表 2 所示,随着共混总浓度的增大,复合膜厚度和水蒸气透过率逐渐增大,水溶性呈先减小后增大的趋势,并在总浓度为 1.6%处得到最小值。

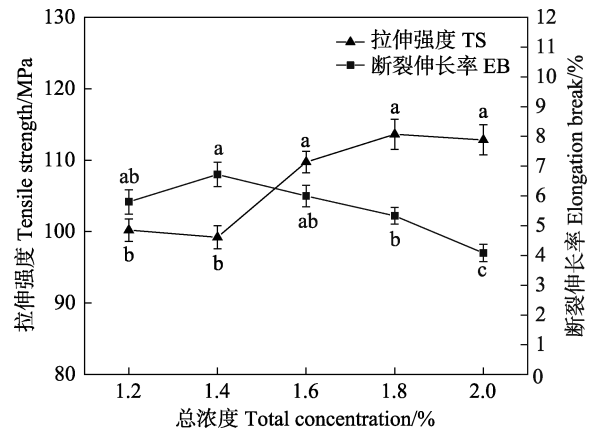


图 4 海藻酸钠/浒苔多糖总浓度对复合膜力学性能的影响
Fig.4 Effects of total concentration of SA and EP on the mechanical properties of composite films

表 2 海藻酸钠/浒苔多糖总浓度对复合膜物理性能的影响
Tab.2 Effects of total concentration of SA and EP on the physical properties of composite films

总浓度 Total concentration/%	厚度 Thickness/mm	水蒸气透过率 Water vapor permeation/ [$\times 10^{-11}$ g/(m·s·Pa)]	水溶性 Water solubility/%
1.2	0.018 9 \pm 0.000 5 ^c	3.924 \pm 0.075 ^d	5.66 \pm 0.49 ^a
1.4	0.019 7 \pm 0.000 3 ^c	4.909 \pm 0.118 ^c	4.21 \pm 0.80 ^{ab}
1.6	0.022 4 \pm 0.000 5 ^b	6.231 \pm 0.068 ^b	3.44 \pm 0.28 ^b
1.8	0.023 0 \pm 0.000 6 ^b	6.808 \pm 0.171 ^a	4.22 \pm 0.84 ^{ab}
2.0	0.027 3 \pm 0.000 7 ^a	6.937 \pm 0.110 ^a	5.04 \pm 0.16 ^{ab}

2.5 甘油含量对海藻酸钠/浒苔多糖复合膜性能的影响

预实验发现,不添加甘油的海藻酸钠/浒苔多糖复合膜脆性大,烘干过程易裂,不能保证膜结构的完整性,本研究选取 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%和 1.5%的甘油含量进行优化。如图 5 所示,随着甘油含量增加,膜拉伸强度一直下降,而断裂伸长率逐渐升高。如表 3 所示,甘油含量对膜厚度无显著影响($P > 0.05$)。水蒸气透过率和水溶性随甘油含量增加而增大。

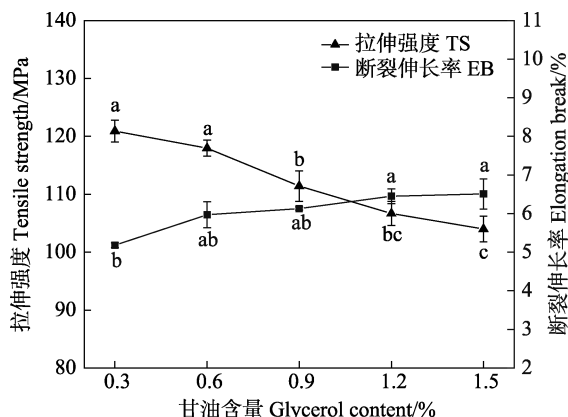


图5 甘油含量对海藻酸钠/浒苔多糖复合膜力学性能的影响

Fig.5 Effects of glycerol content on the mechanical properties of SA/EP composite films

表3 甘油含量对海藻酸钠/浒苔多糖复合膜物理性能的影响

Tab.3 Effects of glycerol content on the physical properties of SA/EP composite films

甘油含量 Glycerol content/ %	厚度 Thickness/ mm	水蒸气透过率 Water vapor permeation/ [$\times 10^{-11}$ g/(m \cdot s \cdot Pa)]	水溶性 Water solubility/ %
0.3	0.020 1 \pm 0.000 4 ^a	5.296 \pm 0.035 ^b	2.50 \pm 0.81 ^b
0.6	0.021 4 \pm 0.000 4 ^a	5.197 \pm 0.065 ^b	3.53 \pm 0.70 ^{ab}
0.9	0.020 1 \pm 0.000 6 ^a	6.017 \pm 0.052 ^a	4.29 \pm 0.88 ^{ab}
1.2	0.020 9 \pm 0.000 5 ^a	6.068 \pm 0.058 ^a	4.57 \pm 0.17 ^a
1.5	0.020 1 \pm 0.000 8 ^a	6.205 \pm 0.046 ^a	4.99 \pm 0.32 ^a

3 讨论

3.1 微观表征分析

扫描电镜图表明,含量低于30%的浒苔多糖可均匀分散在膜基质中,海藻酸钠与适量浒苔多糖具有良好的相容性,浒苔多糖能够均匀地镶嵌在海藻酸钠稳定的“蛋壳”结构中。傅里叶红外光谱分析显示,复合膜与海藻酸钠膜有大致相同的主峰,主要差异是羟基基团的拉伸振动峰。随着海藻酸钠与浒苔多糖比例的减小,代表—OH的吸收峰移至较低的波数,说明添加浒苔多糖增强了复合膜内部的分子间作用力,2种多糖分子链上的羟基和羧基之间以及自身有较强的氢键作用。

3.2 多糖质量比对复合膜性能的影响

海藻酸钠/浒苔多糖质量比对复合膜的性能有显著影响。通过图3和表1分析可知,海藻酸钠与浒苔多糖具有良好的相容性。添加浒苔多糖增强了链条分

子内和分子间的氢键作用,使得复合膜网络结构更紧实。另一方面,浒苔多糖均匀镶嵌在海藻酸钠“蛋壳”结构中,膜基质中链条纠缠可能更加复杂,从而提高了膜的机械性能,降低了膜的透气性。但当浒苔多糖含量超过30%时,复合膜的机械性能下降,水溶性增加,这可能是由于浒苔多糖几乎没有成膜性,过多的浒苔多糖会破坏海藻酸钠稳定的结构。相类似的复合膜研究中,Xiao等(2002)研究发现,海藻酸钠/羧甲基魔芋葡甘聚糖复合膜在8:2组分比下达到最佳的力学性能。柳有财等(2018)研究发现,海藻酸钠/丝素比为3:1时,复合膜有最好的机械性能。

综上所述,海藻酸钠与浒苔多糖间具有良好的协同作用,适量浒苔多糖的添加可提升海藻酸钠膜的机械和阻隔性能,在8:2时取得最优质量比。

3.3 共混总浓度对复合膜性能的影响

当多糖浓度增大时,膜溶液中的分子数量增加,复合膜交联度也会随之增加,聚合物分子链间的相互作用增强,从而提高了复合膜的拉伸强度(Lazaridou *et al.*, 2003)。但共混膜液浓度过高时,膜内部分子易发生聚集,会使膜内分子链无序排列,且膜液黏度大,脱气困难,使膜结构不均匀、不致密,导致膜断裂伸长率下降,水溶性增加。膜水蒸气透过率一直增大的一部分原因是膜厚度的增大。综上所述,海藻酸钠/浒苔多糖复合膜在1.6%总浓度下综合性能最优。

3.4 甘油含量对复合膜性能的影响

甘油作为增塑剂,可削弱分子间的相互作用力,破坏复合膜的内部结构,从而导致膜拉伸强度下降(卞紫秀等, 2018)。但甘油是小分子有机物,易与膜基质中其他大分子结合,增加链段流动性,增强复合膜塑性,而增加薄膜的柔软性。水蒸气透过率和水溶性随着甘油含量增加而增大,这归因于甘油中含有大量亲水基团,甘油含量过高,亲水基团含量增多,增大膜内的自由体积,使得复合膜阻隔性能下降。综合海藻酸钠/浒苔多糖复合膜的机械性能及阻隔性能,甘油含量0.9%最为适宜。

本研究探讨了海藻酸钠与浒苔多糖的协同作用,优化了总浓度和甘油含量2个因素。结果表明,海藻酸钠与浒苔多糖具有良好的相容性和协同作用,复合膜内部结构均匀、致密。适量浒苔多糖可增强复合膜的机械性能,降低膜的水蒸气透过率。通过优化得出最佳膜配方参数:质量比8:2,总浓度1.6%,甘油含量0.9%。在最佳配方参数下,复合膜综合性能最优,复合膜拉伸强度为111.42 MPa,断裂伸长

率为6.13%,水蒸气透过率为 $6.017 \times 10^{-11} \text{ g}/(\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$,水溶性为4.29%。

参 考 文 献

- American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting: ASTM D882. Philadelphia: Annual Book of ASTM Standards, 2012
- BAI Y, ZHAO Y, LI Y, *et al.* UV-shielding alginate films crosslinked with Fe^{3+} containing EDTA. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 239: 115480
- BIAN Z X, DONG Z, ZHANG X, *et al.* Preparation and performances of sodium alginate/carrageenan composite packaging film. *China Plastics Industry*, 2018, 46(9): 39–43 [卞紫秀, 董增, 张旭, 等. 海藻酸钠与卡拉胶复合膜的制备及性能. *塑料工业*, 2018, 46(9): 39–43]
- CHEN N N, ZHU Y Y, YANG L Y, *et al.* Preparation and characterization of cross-linking composite films based on sodium alginate and pomelo pectin. *China Food Additives*, 2018, 170(4): 124–133 [陈妮娜, 朱亚燕, 阳丽媛, 等. 海藻酸钠-果胶改性复合膜的制备及表征. *中国食品添加剂*, 2018, 170(4): 124–133]
- DONG F, HUANG S C, WEI Z Z, *et al.* Preparation and properties of alginate-nanocrystalline cellulose blend films. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2019, 37(3): 401–416 [董峰, 黄帅超, 魏占锋, 等. 海藻酸钠-纳米纤维素共混膜的制备及性能. *材料科学与工程学报*, 2019, 37(3): 401–416]
- DUAN Y H, XING L J, DING H Y, *et al.* Analysis of monosaccharides in *Enteromorpha polysaccharide* by pre-column derivatization high performance liquid chromatography. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 117–123 [段元慧, 邢丽红, 丁海燕, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定浒苔多糖的组成. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 117–123]
- GALUS S, LENART A. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 2013, 115(4): 459–465
- GUO L L, ZHENG D, XU J C, *et al.* Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136: 259–265
- HAN Y Y, WANG L J. Sodium alginate/carboxymethyl cellulose films containing pyrogallol acid: Physical and antibacterial properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 97(4): 1295–1301
- LAZARIDOU A, BILIADERIS C G, KONTOGIORGOS V. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 52(2): 151–166
- LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(1): 106–126
- LIU Y C, KE M F, ZHANG J H, *et al.* Preparation and properties of silk fibroin/sodium alginate composite films. *Journal of Silk*, 2018, 55(6): 1–7 [柳有财, 柯梅芳, 张俊华, 等. 丝素/海藻酸钠复合薄膜的制备与性能. *丝绸*, 2018, 55(6): 1–7]
- NORAJIT K, KIM K M, RYU G H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 2010, 98(3): 377–384
- PAN X H, WU H, PAN M, *et al.* Separation, purification and component analysis of *Enteromorpha polysaccharides* from Jiangsu. *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, 28(18): 2274–2278 [潘晓慧, 吴皓, 潘旻, 等. 江苏产浒苔多糖的分离纯化和成分分析. *中国新药杂志*, 2019, 28(18): 2274–2278]
- SUN Y Q, LI Q C, LU J, *et al.* Optimization of processing techniques for *Enteromorpha prolifera* dried fish floss by response surface analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 166–171 [孙元芹, 李翘楚, 卢珺, 等. 响应面法优化浒苔鱼松的加工工艺. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 166–171]
- XIAO C B, WENG L H, ZHANG L N. Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, 84(13): 2554–2560
- XU J B, BARTLEY J P, JOHNSON R A. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide (WSC). *Journal of Membrane Science*, 2003, 218(1/2): 131–146
- YE SZ. Permeability of calcium alginate and blends modified complex film. Master's Thesis of Guizhou University, 2015 [叶世著. 海藻酸钙及其共混改性复合膜的渗透性研究. 贵州大学硕士研究生学位论文, 2015]
- YU Y, LI Y, DU C, *et al.* Compositional and structural characteristics of sulfated polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 165: 221–228
- ZHANG N, XU J C, GAO X, *et al.* Factors affecting water resistance of alginate/gellan blend films on paper cups for hot drinks. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 435–442
- ZHU G, SHENG L, TONG Q. Preparation and characterization of carboxymethyl-gellan and pullulan blend films. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35: 341–347

(编辑 冯小花)

Preparation and Properties of Sodium Alginate/Enteromorpha Polysaccharide Composite Film

DENG Xiaoxue¹, CHENG Teng¹, ZHAO Yun¹, XU Jiachao^{1①}, LI Zhaoyong^{2①}, FU Xiaoting¹

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

2. Qingdao Institute of Textile Fibre Supervision and Inspection, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract Owing to its non-toxicity, excellent biodegradability, film-forming property, and biocompatibility, sodium alginate (SA) is used as a common and promising raw material for biopolymer films. However, pure SA films tend to have defects in performance and functionality; therefore, blend films, consisting of two or more types of components, are more widely used as precursors for biopolymer films. To investigate the synergy between SA and Enteromorpha polysaccharide (EP), a degradable composite film was fabricated by blending SA and EP with glycerol as a plasticizer. The effect of different polysaccharide mass ratios, total mixed solution concentrations, and glycerol contents on the tensile strength, elongation at break, water vapor permeation, and water solubility of the films was investigated. In addition, the microstructure of the films was characterized through Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Results showed a good compatibility and synergy between SA and EP. Moreover, no obvious phase separation was observed in all SA/EP composite films. The component mass ratio, total concentration, and glycerol content had a significant influence on the properties of composite films. Among these factors, mass ratio had the most significant influence on the films. The addition of an appropriate amount of EP improved the tensile strength and elongation at break of the SA film and reduced its water vapor transmission rate; however, it slightly increased the water solubility of the SA/EP composite film. When the component mass ratio was modified from 10:0 to 8:2, the tensile strength increased from 99.22 MPa to 108.41 MPa, the elongation at break increased from 5.14% to 6.20%, and the water vapor transmission rate decreased from 6.445×10^{-11} g/(m·s·Pa) to 6.027×10^{-11} g/(m·s·Pa), which were the comprehensive optimal mechanical and barrier properties of the films. The total concentration and glycerol content of the SA/EP composite films were further optimized. The best total concentration and glycerol content were 1.6% (*m/v*) and 0.9% (*m/v*), respectively. The results demonstrate that the addition of EP enhanced the mechanical and barrier properties of the SA films and that there is a relatively strong synergistic effect between SA and EP.

Key words Sodium alginate; Enteromorpha polysaccharide; Composite film; Properties

① Corresponding author: XU Jiachao, E-mail: xujia@ouc.edu.cn; LI Zhaoyong, E-mail: qdlizhy@163.com

《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	解绥启 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4期 2021年8月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.42 No.4 Aug. 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.yykxjz.cn

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕

印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed

Subscription

Overseas Distributed

by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Jin Xianshi

by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

by China Post Group Corporation Shandong Branch

Post Offices All Over China

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