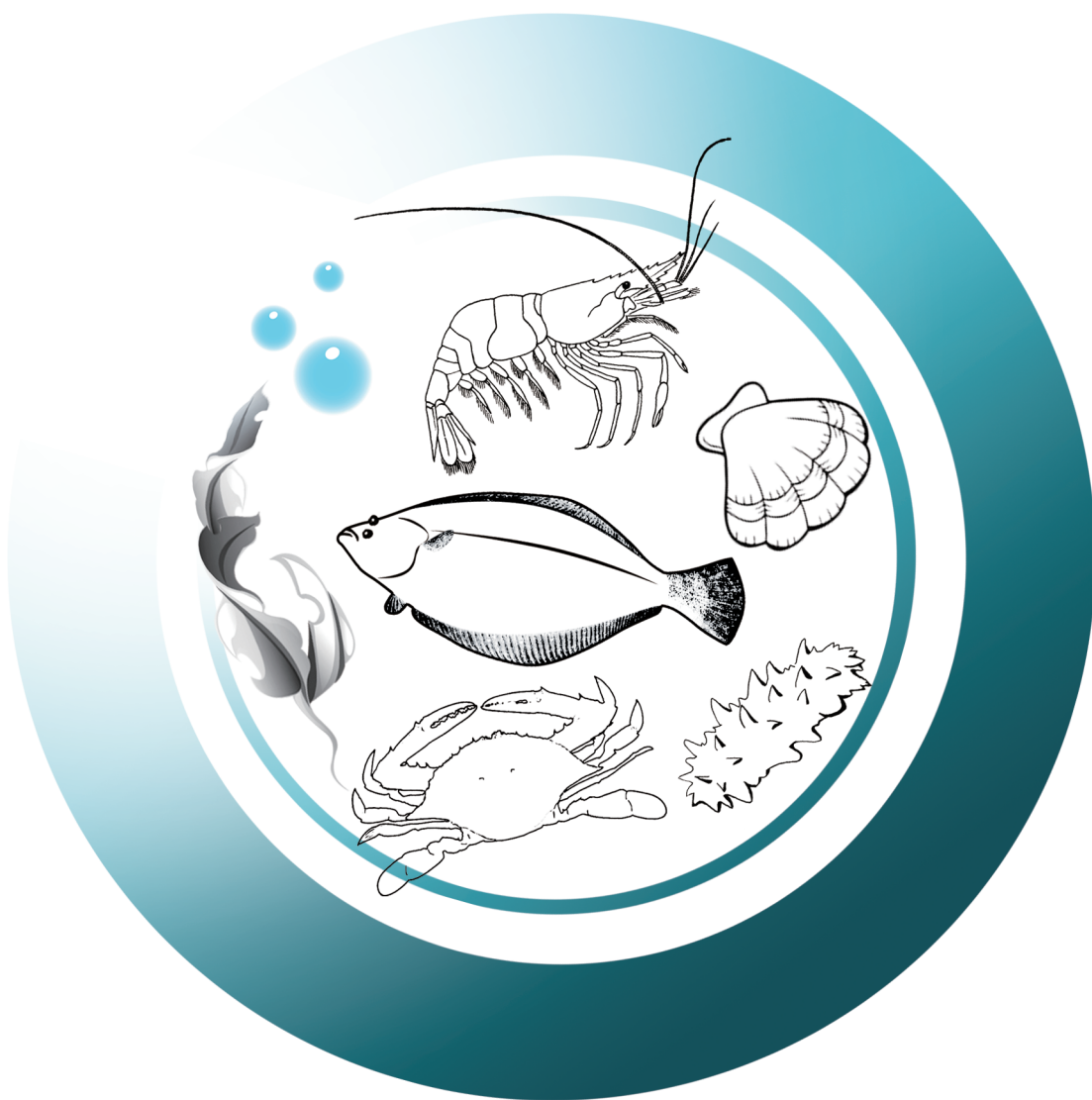


# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第43卷 VOL.43 第2期 NO.2



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办  
中国水产学会



科学出版社 出版  
Science Press

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 43 卷 第 2 期

2022 年 4 月

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

## 目 次

基于结构差异性正方体鱼礁的流场效应研究	郭禹 秦传新 章守宇	(1)
基于 BP 神经网络的阿根廷滑柔鱼资源 CPUE 标准化研究	章贤成 汪金涛 陈新军	(11)
红纤维虾形草移植植株存活、生长和生理对不同水动力条件的响应	程冉 侯鑫 王欢 张沛东 康斌 李文涛	(21)
基于形态学和高通量测序的海水池塘生态养殖系统中浮游植物多样性比较	乔玲 常志强 李健 任成喆	(32)
青海湖裸鲤的游泳能力及鱼梯通过效果	李新丹 肖新平 周卫国 罗江 周杨浩 荣义峰 祁洪芳 史建全 杜浩	(44)
温度梯度对四大家鱼临界游泳速度的影响	王晓 廖冬芽 俞立雄 高雷 段辛斌 陈大庆 苏云垓 欧阳珊	(53)
中国产细纹狮子鱼的骨学和肌肉学研究	亢世华 金显仕 王俊	(62)
全脂黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆养殖性能、生理代谢及体色的影响	贲玲芝 史雪莹 郭金龙 陈秀玲 张配瑜 刘海燕	(80)
斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析	唐荣叶 苏孟园 杨汶珊 徐杰杰 王涛 尹绍武	(89)
鲤低氧适应性状的全基因组关联分析	吴碧银 许建 曹顶臣 徐鹏 张瀚元 朱优秀 江炎亮 赵紫霞	(98)
橘色双冠丽鱼体色相关基因 <i>mitf</i> 的结构及表达调控特性	陈旭东 邬国强 宋红梅 汪学杰 牟希东 刘奕 刘超 胡隐昌	(107)
军曹鱼 <i>dnd</i> 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达	邝杰华 马骞 陈刚 毛非凡 周启苓 黄建盛 施钢 张健东	(119)
西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉的营养成分比较及评价	赵仲孟 张露 赵瀚 黄志鹏 柯红雨 段元亮 李强 周剑	(129)
池塘养殖牙鲆肠道和环境菌群结构对益生菌制剂的响应	姜燕 李存玉 徐永江 柳学周 于超勇 王滨 郑伟 史宝	(137)
氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢酶和抗氧化酶活力的影响	周钱森 任宪云 徐垚 刘萍 李健	(147)
低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和细胞凋亡的影响	于振兴 任宪云 邵慧鑫 刘萍 李健	(157)
凡纳滨对虾动态能量收支模型参数的测定	刘洋 朱建新 陈小傲 段娇阳 薛致勇 曲克明	(167)
凡纳滨对虾不同生长阶段肠道可培养细菌耐药性研究	杨泽禹 万夕和 史文军 王李宝 黎慧 沈辉 乔毅 蒋葛 成婕	(175)
脊尾白虾 <i>EcERR</i> 基因的克隆与表达分析	张春霞 李健 李吉涛 王佳佳 李文洋 李明栋	(185)
缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析	孔祥辉 王莎莎 董迎辉 任建峰 林志华	(194)
铁促进半叶紫菜华北变种丝状体的生长发育及其生理生化基础	梁洲瑞 汪文俊 刘福利 张朋艳 袁艳敏 姚海芹 孙修涛 王飞久	(204)
不同养殖水域中华绒螯蟹滋味差异分析	郭宏慧 杨方 高沛 余达威 许艳顺 姜启兴 夏文水	(215)
山东 4 种常见虾头品质分析与评价	王凤霞 张姗姗 张轩铭 王利振 张梦启 李培海 李晓彬 刘可春 邢澍	(228)



# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.43 No.2 April 2022

Flow Field Effect of Cube Reef Monocase of Different Structure .....	GUO Yu, QIN Chuanxin, ZHANG Shouyu	(1)
CPUE Standardization of <i>Illex argentinus</i> Based on BP Neural Network .....	ZHANG Xiancheng, WANG Jintao, CHEN Xinjun	(11)
Survival, Growth, and Physiological Responses of Surfgrass Transplants to Different Hydrodynamic Regimes .....	CHENG Ran, HOU Xin, WANG Huan, ZHANG Peidong, KANG Bin, LI Wentao	(21)
Comparison of Phytoplankton Community Diversity in the Ecological Aquaculture System of a Marine Pond Using Morphological Analysis and High-Throughput Sequencing .....	QIAO Ling, CHANG Zhiqiang, LI Jian, REN Chengzhe	(32)
Swimming Capacity of <i>Gymnocypris przewalskii</i> and the Efficiency of Fish Passing the Fish Ladder .....	LI Xindan, XIAO Xinping, ZHOU Weiguo, LUO Jiang, ZHOU Yanghao, RONG Yifeng, QI Hongfang, SHI Jianquan, DU Hao	(44)
Effect of Temperature Gradient on the Critical Swimming Speed of Four Major Chinese Carps .....	WANG Xiao, LIAO Dongya, YU Lixiong, GAO Lei, DUAN Xinbin, CHEN Daqing, SU Yungai, OUYANG Shan	(53)
Osteological and Myological Characteristics of <i>Liparis tanakae</i> from Chinese Coasts .....	KANG Shihua, JIN Xianshi, WANG Jun	(62)
Effects of Replacement of Fish Meal with Full-Fat <i>Hermetia illucens</i> Larvae on Culture Performance, Physiological Metabolism, and Skin Color in Turbot .....	BEN Lingzhi, SHI Xueying, GUO Jinlong, CHEN Xiuling, ZHANG Peiyu, LIU Haiyan	(80)
Analysis of Microsatellite Distribution Characteristics in the Channel Catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) Genome .....	TANG Rongye, SU Mengyuan, YANG Wenshan, XU Jiejie, WANG Tao, YIN Shaowu	(89)
Genome-Wide Association Analysis of Hypoxia Adaptation Traits in Common Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	WU Biyin, XU Jian, CAO Dingchen, XU Peng, ZHANG Hanyuan, ZHU Youxiu, JIANG Yanliang, ZHAO Zixia	(98)
Structure and Expression Analysis of Body Color-Related <i>mitf</i> Gene in <i>Amphilophus citrinellus</i> .....	CHEN Xudong, WU Guoqiang, SONG Hongmei, WANG Xuejie, MU Xidong, LIU Yi, LIU Chao, HU Yinchang	(107)
Cloning and Expression Analysis of <i>dnd</i> During Annual Gonadal Development of Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> ) .....	KUANG Jiehua, MA Qian, CHEN Gang, MAO Feifan, ZHOU Qiling, HUANG Jiansheng, SHI Gang, ZHANG Jiandong	(119)
Analysis and Evaluation of Nutritive Composition in Muscles of <i>Acipenser baerii</i> , <i>Acipenser schrenckii</i> , and Their Hybrids .....	ZHAO Zhongmeng, ZHANG Lu, ZHAO Han, HUANG Zhipeng, KE Hongyu, DUAN Yuanliang, LI Qiang, ZHOU Jian	(129)
Responses of Microbiota Structure in the Intestinal Tract and Pond Culture Environment of Japanese Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) to Probiotics .....	JIANG Yan, LI Cunyu, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, YU Chaoyong, WANG Bin, ZHENG Wei, SHI Bao	(137)
Effects of Ammonia Stress on Metabolic and Antioxidant Enzyme Activities in <i>Panulirus ornatus</i> .....	ZHOU Qiansen, REN Xianyun, XU Yao, LIU Ping, LI Jian	(147)
Effect of Low Temperature Stress on Antioxidant System and Apoptosis of <i>Marsupenaeus japonicus</i> .....	YU Zhenxing, REN Xianyun, SHAO Huixin, LIU Ping, LI Jian	(157)
Determining the Parameters of the Dynamic Energy Budget Model of <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	LIU Yang, ZHU Jianxin, CHEN Xiaobao, DUAN Jiaoyang, XUE Zhiyong, QU Keming	(167)
Study on Bacterial Resistance in <i>Litopenaeus vannamei</i> Intestinal Culturable Bacteria at Different Growth Stages .....	YANG Zeyu, WAN Xihe, SHI Wenjun, WANG Libao, LI Hui, SHEN Hui, QIAO Yi, JIANG Ge, CHENG Jie	(175)
Cloning and Expression Analysis of <i>EcERR</i> in <i>Exopalaemon carinicauda</i> .....	ZHANG Chunxia, LI Jian, LI Jitao, WANG Jiajia, LI Wenyang, LI Mingdong	(185)
Analysis of Expression Characteristics of Related Genes in Response to Acute Thermal Stress in the Razor Clam <i>Sinonovacula constricta</i> .....	KONG Xianghui, WANG Shasha, DONG Yinghui, REN Jianfeng, LIN Zhihua	(194)
Iron Promotes the Growth and Development of Conchocelis of <i>Pyropia katadae</i> var. <i>hemiphylla</i> and Its Physiological and Biochemical Bases .....	LIANG Zhourui, WANG Wenjun, LIU Fuli, ZHANG Pengyan, YUAN Yanmin, YAO Haiqin, SUN Xiutao, WANG Feijiu	(204)
Analysis of Flavor Compounds of Chinese Mitten Crabs ( <i>Eriocheir sinensis</i> ) from Different Regions .....	GUO Honghui, YANG Fang, GAO Pei, YU Dawei, XU Yanshun, JIANG Qixing, XIA Wenshui	(215)
Analysis and Evaluation of Shrimp Head Quality from Four Common Shrimp Species in Shandong Province, China .....	WANG Fengxia, ZHANG Shanshan, ZHANG Xuanming, WANG Lizhen, ZHANG Mengqi, LI Peihai, LI Xiaobin, LIU Kechun, XING Shu	(228)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201102001

http://www.yykxjz.cn/

郭禹, 秦传新, 章守宇. 基于结构差异性正方体鱼礁的流场效应研究. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 01-10  
GUO Y, QIN C X, ZHANG S Y. Flow field effect of the cube reef monocase of different structure. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 01-10

# 基于结构差异性正方体鱼礁的流场效应研究\*



郭禹<sup>1</sup> 秦传新<sup>1,2①</sup> 章守宇<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 国家渔业资源环境大鹏观测实验站 广东 广州 510300;  
2. 南方海洋广东省实验室 广东 广州 511458; 3. 上海海洋大学 上海 201306)

**摘要** 人工鱼礁结构差异是影响流场规模效应的主要因素之一, 本研究选择大字型、米字型、回字型、交叉型、框架型和实体型 6 种鱼礁单体, 分析均匀布设模式下礁体自身结构特征对流场效应的影响规律, 进一步建立结构差异性单位鱼礁的规模效应模型。基于流场效应规律提出礁体结构特征指标分别为鱼礁空方体积比、透空率和迎流面相对截面积, 进一步得到上升流体积效应模型为  $V_u=0.448R_u^{-1.679}-C_p(29.868C_p-6.921)+R_{sa}(56.18R_{sa}-35.42)$ , 背涡流体积效应模型为  $V_b=R_u(1830R_u-128)-R_v(95R_v-105)+C_p(138C_p-154)-R_{sa}(418R_{sa}-180)$ 。最后, 基于流场体积效应模型, 提出以流场体积为依据的礁体结构参数选择建议, 可为以流场体积为建设目标的最优鱼礁结构设计提供参数指导。

**关键词** 流场效应; 单位鱼礁; 体积模型; 数值实验; 正方体鱼礁

**中图分类号** S953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0001-10

人工鱼礁作为海洋牧场建设的一种技术手段和基础设施(杨红生, 2016; 刘鸿雁等, 2019; Fariñas-Franco *et al*, 2014), 随着海洋牧场建设的发展, 其效果逐渐受到越来越多研究者的关注。在合理规划条件下, 经济、高效的人工鱼礁建设模式是增强建设效果、保障海洋牧场实现效益生态化的前提(王震等, 2019)。鱼礁结构差异会产生不同效果的流场形式(肖荣, 2015; 姜昭阳等, 2019), 进而影响人工鱼礁的投放效果。因此, 需要合理规划单位人工鱼礁布设模式(Kim

*et al*, 2016、2019; 李豹德, 1985), 其中, 鱼礁单体结构也是考量因素之一。在规划人工鱼礁建设过程中, 除对不同单位鱼礁建设模式流场效应进行研究, 更应注重研究结构差异性单位鱼礁的流场特性, 为科学设计人工鱼礁单体结构提供理论依据。

目前, 研究者仅从鱼礁单体的流场效应的角度对人工鱼礁结构差异进行了分析。李珺等(2010a)通过改变正方体鱼礁中部的孔洞大小, 发现不同通透性的人工鱼礁单体流场效应存在差异; 于定勇等(2019)对不

\* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0900905)、中国水产科学研究院南海水产研究所基本科研业务费专项资金资助项目(2020YJ04; 2020SY01)、南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)、防城港市白龙珍珠湾海域国家级海洋牧场示范区礁区地形扫测(鱼礁探测)和海洋环境要素状况与渔业资源状况调查评估项目(FCZC2019-G3-10045-GXYL)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Plan: Blue Granary Technology Innovation Project (2018YFD0900905), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2020YJ04; 2020SY01), Southern Ocean Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) Talent Team Introduced Major Special Projects (GML2019ZD0402), Survey and Evaluation Project of Topographic Survey (Artificial Reef Detection), and Marine Environment Element and Fishery Resources of the National Marine Ranch Demonstration Area in Bailong Pearl Bay, Fangchenggang City (FCZC2019-G3-10045-GXYL)]. 郭禹, E-mail: guoyu25895177@163.com

① 通讯作者: 秦传新, 副研究员, E-mail: qinx@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2020-11-02, 收修改稿日期: 2020-11-18

同开口比的鱼礁单体流场效应进行研究,也发现礁体结构会影响流场效果。然而,现有研究忽略了实际礁体内部结构的差异(付东伟等, 2012);另一方面,已有研究仅以鱼礁单体为分析对象,而实际人工鱼礁投放均以单位鱼礁为基本单元(Kim *et al.*, 2014),同时,研究结果仅说明结构差异会改变流场效应,但针对以单位鱼礁为基本单元的流场效应的变化规律并无探讨。因此,对结构差异性礁体以单位鱼礁形式为基础单体的流场效应研究更能有效指导人工鱼礁建设。为准确评价结构差异性单位鱼礁建设效果,合理选择投放海域的人工鱼礁结构,需要准确提取代表礁体结构差异的特征指标,进一步分析、评价多种结构差异性单位鱼礁的流场效果,建立人工鱼礁流场效应评价模型,进而合理规划人工鱼礁结构设计。

本研究以单位鱼礁流场效应作为人工鱼礁建设效果的主要评价因素,以均匀布设模式的单位鱼礁形式为基础,根据目前我国人工鱼礁实际投放特征,选择具有代表性的鱼礁单体,包括大字型、米字型、回字型、交叉型、框架型和实体型6种人工鱼礁结构。通过提取6种礁型结构特征指标,分析礁体结构特征指标对流场效应的影响规律,建立结构差异性单位鱼礁的规模效应模型,进一步为人工鱼礁合理规划建设提供全面的数据参考与科学指导。

## 1 数值实验与体积效应模型建立

### 1.1 人工鱼礁单体选择

为使结构差异性单位鱼礁流场效应研究对实际鱼礁投放具有指导作用,本研究选择目前大规模投放的大字型、米字型、回字型、框架型和交叉型正方体鱼礁结构作为研究对象,同时为使数据更加全面,补充相应大小的实体型人工鱼礁结构进行对比分析,6种鱼礁单体均为由钢筋混凝土构成的 $3\text{ m}\times 3\text{ m}\times 3\text{ m}$ 正方体结构,鱼礁单体边长为 $3\text{ m}$ ,图1所示为6种人工鱼礁礁体结构示意图,其单体面积(area of reef monocase,  $A_m$ )(鱼礁单体占地面积)相同。其中,大字型鱼礁单体4个侧面呈大字,鱼礁上下底面以对角线相连呈交叉型,礁体方柱与外框截面均为 $0.3\text{ m}\times 0.3\text{ m}$ 的正方形,礁体内部中空。米字型鱼礁6个侧面均呈米字,米字方柱与外框截面均为 $0.3\text{ m}\times 0.3\text{ m}$ 的正方形,且礁体内部中空。回字型人工鱼礁6个侧面均呈回字型,结构较为复杂。交叉型人工鱼礁由钢筋混凝土构成 $3\text{ m}\times 3\text{ m}\times 3\text{ m}$ 正方体,鱼礁单体边长为 $3\text{ m}$ ,人工鱼礁单体体积为 $27\text{ m}^3$ ,外框宽 $0.25\text{ m}$ ,中间交错形方柱宽 $0.3\text{ m}$ 。相较于大字型和米字型鱼礁单体,回字型和交叉型鱼礁单体的内部构建位于礁体中部而非侧面。框架型鱼礁单体主要由12个截面为 $0.3\text{ m}\times$

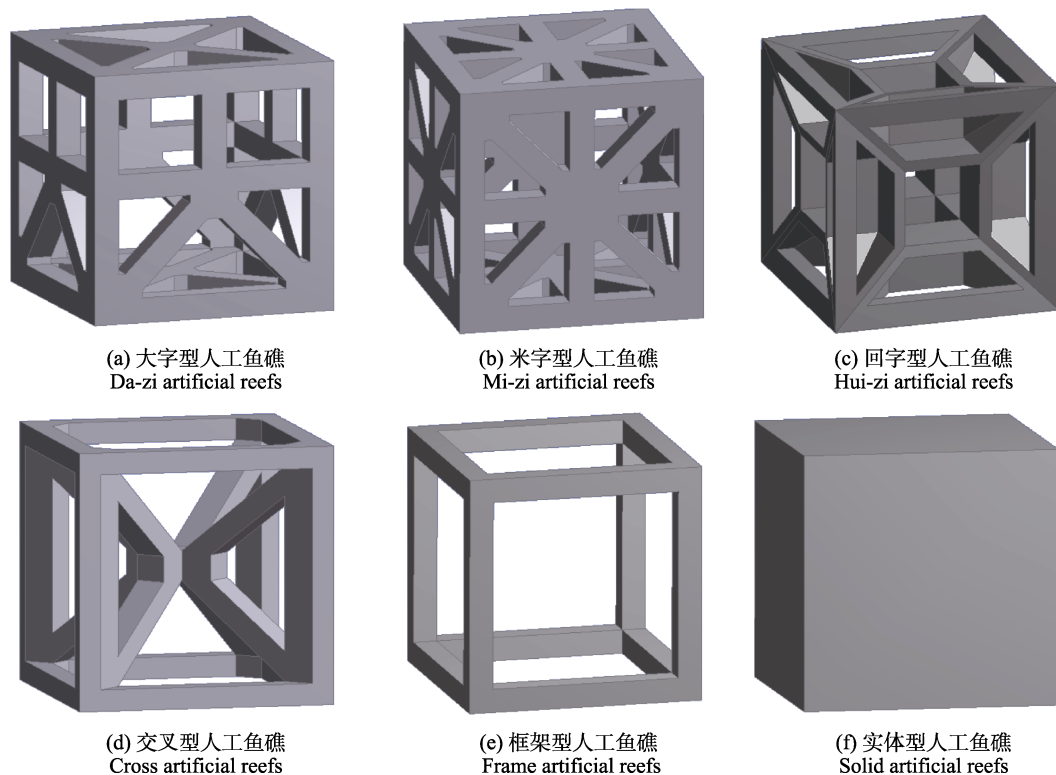


图1 人工鱼礁结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of artificial reefs

0.3 m 的正方形外框构成。实体型鱼礁单体则为实心正方体, 为研究中补充的极端礁体参考。本研究中的大字型和米字型人工鱼礁主要应用于福建省海洋牧场建设, 回字型和交叉型人工鱼礁主要投放于东海区海洋牧场, 框架型人工鱼礁以其简单的结构特征优势在各个海洋牧场中均有投放。

## 1.2 单位鱼礁布设模式与计算域

为分析不同鱼礁结构的单位鱼礁流场效应, 本研究均选择投放量适宜且流场效应最佳时的间距作为单位鱼礁建设规模标准(郭禹等, 2019), 故研究中的6种单位鱼礁均为4×4的均匀布设模式, 布设间距均为1.5倍鱼礁单体边长。

数值实验计算域范围以单位鱼礁边长(side length of unit artificial reef,  $S_{lu}$ )的倍数为基础参数, 来流面至单位鱼礁迎流面的长度为 $3S_{lu}$ , 单位鱼礁尾至出流面长度为 $15S_{lu}$ , 鱼礁左、右侧面至水槽壁面均为 $3S_{lu}$ , 水深设为鱼礁单体的10倍, 来流方向与单位鱼礁迎流面角度为 $90^\circ$ , 来流速度(inlet velocity,  $v_i$ )为1.0 m/s, 具体数值实验计算域如图2所示。数值实验中, 入口边界条件为速度入口, 出口边界条件为

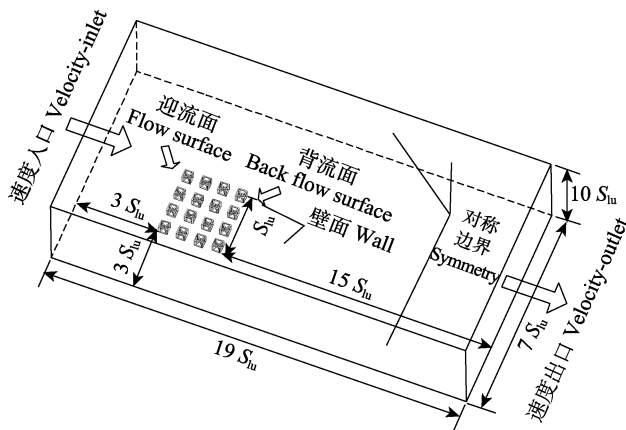


图2 单位人工鱼礁数值实验计算域  
Fig.2 Experimental calculation domain sketch of artificial reefs

速度出口, 人工鱼礁表面与计算域底面均为壁面边界条件, 采用无滑移边界参数, 计算域侧面与上顶面设为对称边界条件。实验中流体密度设为 $1024 \text{ kg/m}^3$ , 重力参数为 $9.81 \text{ m/s}^2$ 。研究中流场数据采用 ANSYS 软件的大涡模拟模型获得, 模拟数据通过验证切实可用(李珺等, 2010b)。

## 1.3 流场效应与人工鱼礁规模化指标筛选

本研究中, 单位人工鱼礁布设间距均为1.5倍鱼礁单体边长, 产生的流场效应间均存在协调效应(郭禹等, 2020), 因此, 在选择流场效应规模指标时, 以流场相对体积即人工鱼礁产生的整个流场效应区作为流场效应规模指标进行说明。本研究分别选择4种目标速度比(target velocity ratio,  $R_{tv}$ )作为上升流与背涡流区选取标准, 上升流区为单位鱼礁前端垂向流速分别大于0.05、0.10、0.15和0.20倍来流速度的速度区域, 背涡流区为单位鱼礁后方来流向流速中绝对值分别小于0.70、0.75、0.80和0.85倍来流速度的速度区域, 流场效应指标还包括相对面积(relative area,  $A_r$ )、相对高度(relative height,  $H_r$ )、相对长度(relative length,  $L_r$ )和流场平均相对速度(average relative velocity,  $V_{ar}$ ), 具体计算公式如下:

$$A_r = S_{\max}/A_{rm} \quad (1)$$

$$H_r = H_{\max}/S_{lu} \quad (2)$$

$$L_r = L_{\max}/S_{lu} \quad (3)$$

$$V_{ar} = V_m/v_i \quad (4)$$

式中,  $S_{\max}$  为流场最大面积;  $H_{\max}$  为流场最大作用高度;  $L_{\max}$  为流场最大作用长度;  $V_m$  为流场平均速度。

由于本研究单位鱼礁建设模式相同, 故代表单位人工鱼礁规模的指标仅为鱼礁结构特征参数, 主要包括单体鱼礁透空率和空方体积比。单体鱼礁透空率(permeability coefficient,  $C_p$ )指沿来流方向人工鱼礁区内投影面积与边界投影面积的比值, 空方体积比(volume ratio,  $R_v$ )指鱼礁单体实际混凝土体积与空方体积的比值, 6种不同结构人工鱼礁单体结构特征指标参数见表1。

表1 人工鱼礁结构指标参数

Tab.1 Structural indicators of artificial reefs

结构指标 Structural indicators	大字型鱼礁 Da-zi artificial reefs	米字型鱼礁 Mi-zi artificial reefs	回字型鱼礁 Hui-zi artificial reefs	交叉型鱼礁 Cross artificial reefs	框架型鱼礁 Frame artificial reefs	实体型鱼礁 Solid artificial reefs
透空率 $C_p$ /%	40.89	30.34	20.11	31.48	64	0
空方体积比 $R_v$ /%	21.87	42.66	23.37	27.37	10.4	100

## 1.4 规模效应模型建立

采用单一指标法建立人工鱼礁规模效应模型

(李松等, 2016), 模型自变量为单位鱼礁规模指标, 包括目标速度比、鱼礁单体透空率、空方体积比和相对截面积。因变量分别为上升流与背涡流流场相对体



积指标,通过分析每个自变量(鱼礁规模指标)与流场体积效应指标间的关系,建立流场体积效应的最佳单一指标回归模型(人工鱼礁规模效应模型)(汪岚等,2008)。本研究利用 MATLAB 中的拟合函数 polyfit 进行实验数据的单元回归拟合,应用 nlinfit 函数建立各流场效应指标与人工鱼礁规模指标的多元非线性模型,使用 Gauss-Newton 法进行模型优化(董大校,2009)。

## 2 结果与分析

### 2.1 上升流流场效应

不同鱼礁单体构成的单位鱼礁流场效应存在一定差异,不同目标速度比条件下,6种单位鱼礁上升流流场体积效应变化规律见图3。如图3所示,代表上升流流场空间范围的3个特征指标相对体积、相对面积

和相对高度均随着目标速度比增加逐渐降低,上升流平均相对速度随着目标速度比增加逐渐增大,4种速度比条件下,各单体类型的单位鱼礁上升流相对体积、面积、高度和平均相对速度变化规律相同。每种速度比条件下,6种差异型鱼礁单体的流场相对体积与相对面积由大到小所对应的单位鱼礁类型依次为:实体型>米字型>回字型>大字型>交叉型>框架型,其中,实体型鱼礁透空率最小,空方体积比最大,框架型鱼礁透空率最大而空方体积比最小;6种鱼礁上升流相对高度和速度由大到小对应的单位鱼礁类型依次为:实体型>米字型>大字型>交叉型>回字型>框架型,同样实体型与框架型鱼礁受透空率与空方体积比影响,但其他4种结构礁体上升流效应受透空率与空方体积比影响规律较小。此结果说明,上升流效应受鱼礁结构差异影响,但透空率和空方体积比2个指标不足以表征礁体结构各异的特点。

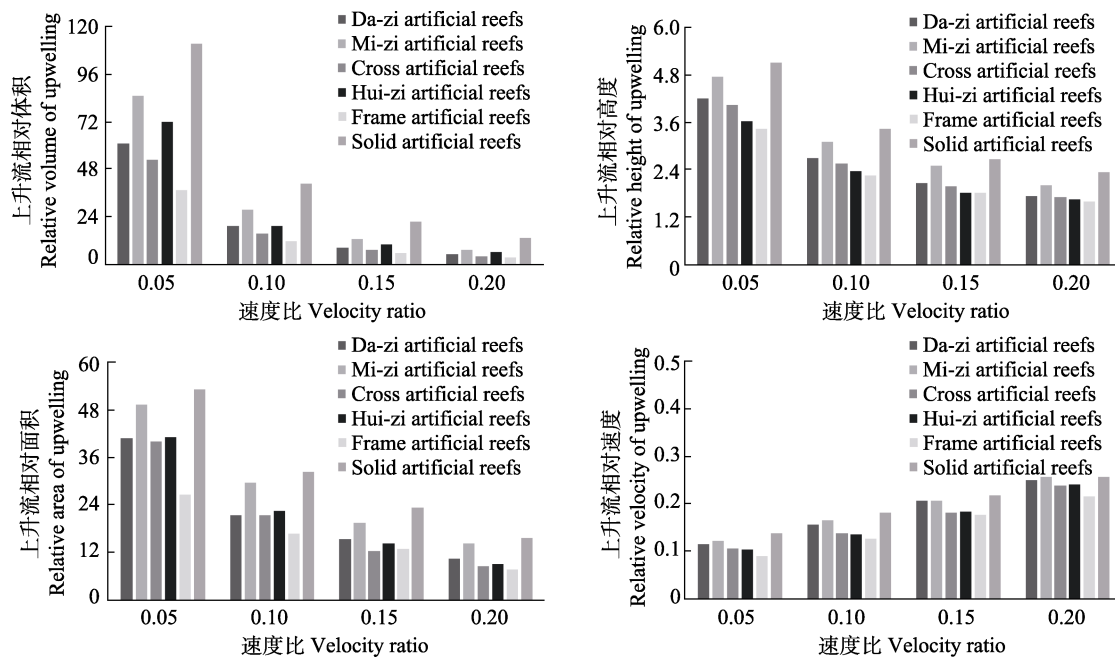


图3 6种单位鱼礁上升流效应  
Fig.3 Upwelling effect of 6 types of artificial reefs

### 2.2 背涡流流场效应

不同目标速度比条件下,6种单位鱼礁背涡流流场效应特征见图4。如图4所示,背涡流相对体积、相对面积、相对长度和平均相对速度均随着目标速度比增加逐渐增大,且每种目标速度比条件下各类型礁体背涡流效应变化规律相同。其中,交叉型单位鱼礁背涡流相对体积最大,其次为回字型人工鱼礁,二者结构具有相似特征,即鱼礁内部构件位于礁体中部,

而大字型和米字型单位鱼礁背涡流相对体积最小,二者在结构上同样具有相似特征,即鱼礁内部构件位于鱼礁侧面。实体型单位鱼礁背涡流相对面积最大,框架型单位鱼礁背涡流相对面积最小,其他鱼礁相对面积呈2种特征,其一是鱼礁体构件位于外侧的大字型与米字型单位鱼礁,其相对面积低于另一种礁体构件位于内部的交叉型和回字型单位鱼礁。背涡流流场相对长度与速度同样受鱼礁内部结构构件位置影响,均表现为鱼礁体构件位于内部的单位鱼礁流场相对

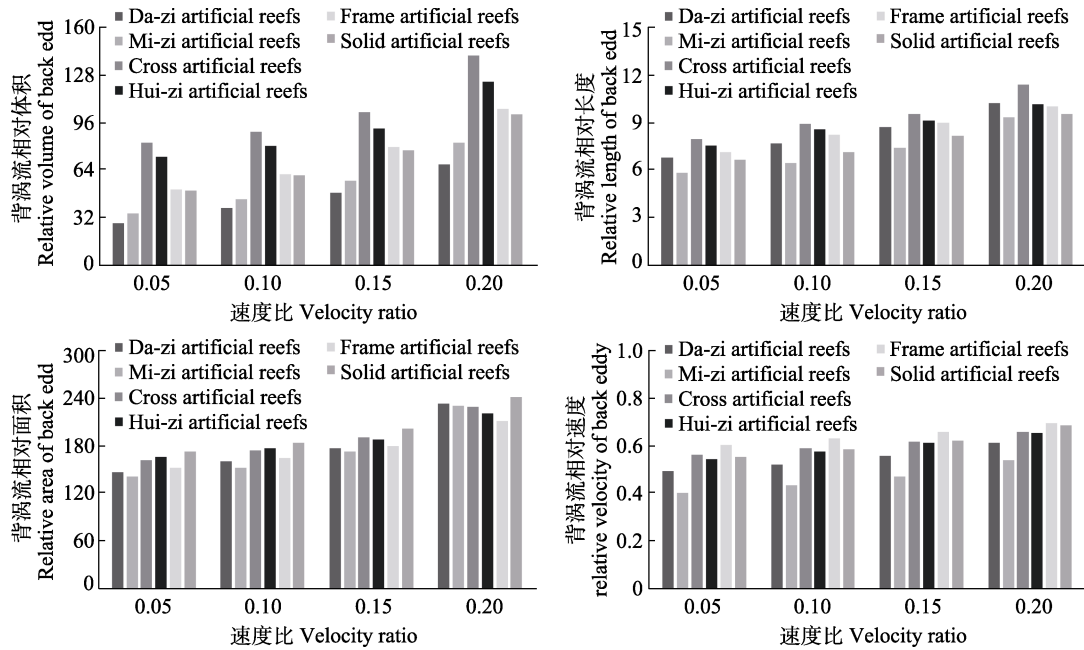


图 4 6 种单位鱼礁背涡流效应  
Fig.4 Back eddy effect of 6 types of artificial reefs

长度与速度高于构件位于侧面的鱼礁。

此结果进一步说明,透空率和空方体积比是影响结构差异性单位鱼礁流场效应的因素,即可作为表征鱼礁结构差异的特征指标,但并不完全。本研究根据流场效应受鱼礁结构内部构件位置差异影响的规律,提出迎流面相对截面积(relative cross-sectional area of MR,  $R_{sa}$ )指标用于表征礁体结构差异特征,迎流面相对截面积是指人工鱼礁单体迎流面礁体实际面积与总面积的比值,大字型、米字型、交叉型、回字型、框架型和实体型鱼礁相对截面积分别为 0.59、0.70、0.36、0、0.36 和 1。

### 2.3 上升流体积效应模型

以上升流与背涡流效应研究中影响结构差异性人工鱼礁上升流流场相对体积变化的因子为自变量,分别分析人工鱼礁上升流相对体积随各自变量因子的变化规律。图 5~图 7 分别为目标速度比、透空率

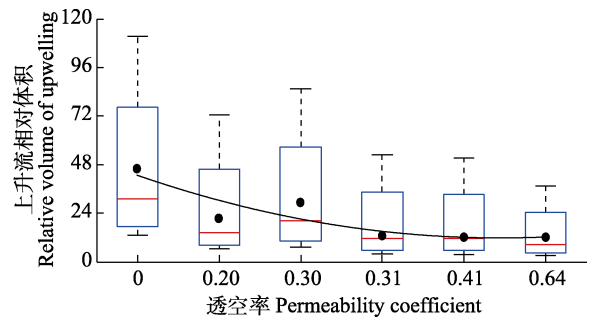


图 6 透空率与上升流相对体积拟合效果  
Fig.6 Curves of permeability coefficient versus relative upwelling volume

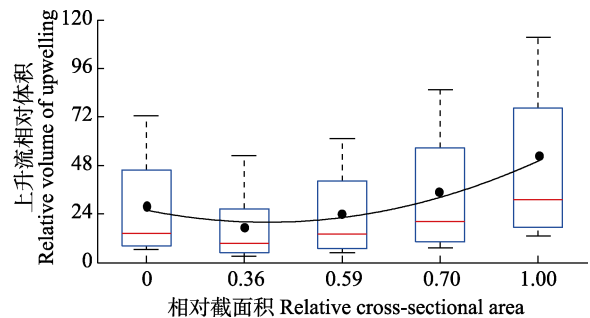


图 7 相对截面积与上升流相对体积拟合效果  
Fig.7 Curves of relative cross-sectional area versus relative upwelling volume

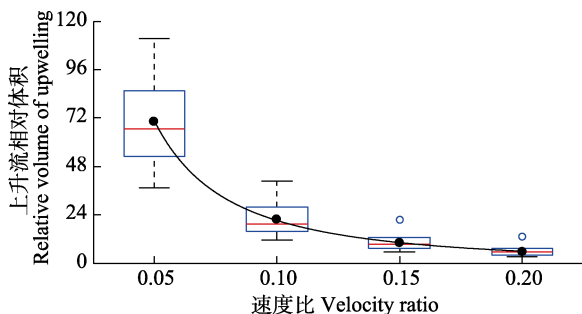


图 5 速度比与上升流相对体积拟合效果  
Fig.5 Curves of velocity ratio versus relative upwelling volume

和相对截面积 3 个鱼礁建设指标与上升流相对体积的拟合效果图。其中单位鱼礁空方体积比虽然影响上升流相对体积,但上升流相对体积与空方体积比间无明显的函数关系,故模型建立时不考虑此项。如图 5 所示,上升流相对体积随目标速度比增加呈幂函数变

化, 单元回归模型基本形式为  $V_{u1}=0.424R_u^{-1.71}$ ,  $R^2=0.91$ ; 上升流相对体积随透空率的增加呈现逐渐递减的二次函数关系, 其单元回归模型基本形式为  $V_{u2}=0.831C_p^2-11.481C_p+54.393$ ,  $R^2=0.90$ ; 上升流相对体积随迎流面相对截面积取值增加呈先降低后增加的二次函数关系, 回归模型基本形式为  $V_{u3}=3.581R_{sa}-15.903R_{sa}+37.87$ ,  $R^2=0.97$ ; 根据单元回归模型建立上升流体积综合评价模型, 模型公式的一般形式为  $V_u=a_1R_u^{a_2}+b_1C_p^2+b_2C_p+c_1R_{sa}+c_2R_{sa}$ 。

最终得到均匀布设模式下结构差异性人工鱼礁上升流体积与鱼礁结构指标的定量关系:

$$V_u=0.448R_u^{-1.679}-C_p(29.868C_p-6.921)+R_{sa}(56.18R_{sa}-35.42)$$

式中,  $R_u$  为目标速度比,  $C_p$  为鱼礁透空率,  $R_{sa}$  为迎流面相对截面积。模型主要分为 3 项, 分别为目标速度比项  $0.448R_u^{-1.679}$ 、鱼礁透空率项  $C_p(29.868C_p-6.921)$  和迎流面相对截面积项  $R_{sa}(56.18R_{sa}-35.42)$ , 3 项均为各自独立项, 彼此间无相互联系。结构差异性单位鱼礁上升流相对体积效应模型适用于人工鱼礁结构重要参数的选择。以实际人工鱼礁结构特性为基础, 上升流体积效应模型各参数取值范围分别为: 流场目标速度比取值为大于 0 的任意实数; 人工鱼礁透空率取值范围为  $0 < C_p \leq 1$ ; 相对截面积取值范围为  $0 \leq R_{sa} \leq 1$ 。

在对模型极限值分析中, 目标速度比项值最小为 0; 当单位鱼礁透空率值越大, 透空率项值越小, 对上升流相对体积增加量越大; 当鱼礁迎流面相对截面积值为 0 时, 相对截面积项值越大, 对上升流相对体积增加量越大, 当相对截面积值为 0.795 时, 相对截面积项值最小, 对上升流相对体积正效应越小。因此, 若投放正方体鱼礁时, 当以上升流相对体积为选择依据, 对应最佳相对体积状态的鱼礁结构特征指标参数选择规律分别为: 鱼礁透空率值越大越好, 建议当迎流面相对截面积小于 0.795 时, 值越大越好; 当大于 0.795 时, 值越小越好。

用上升流相对体积回归模型求解出的各单位鱼礁结构指标下相应流场相对体积拟合值与模拟值数据对比结果及对应残差(图 8)。通过回归模型计算的上升流相对体积值与数值实验值基本一致, 残差数据显示, 上升流体积模型不存在异常值点, 模型拟合效果较好。上升流相对体积回归模型规划值与模拟值相对误差为 18.72%,  $R^2=0.90$ , 说明此回归模型拟合效果较好,  $F=188$ , 大于  $F_{\alpha(0.1)}=2.17$ , 说明回归方程总体显著成立, 该方程可以较准确地反映单体结构差异特征指标对上升流流场体积的影响效果与规律。

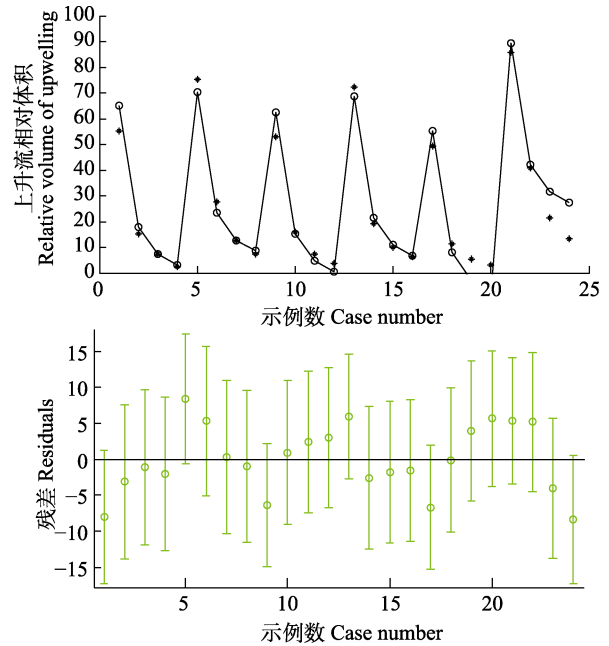


图 8 上升流相对体积回归值与残差  
Fig.8 Relative volume of upwelling regression and residual

## 2.4 背涡流体积效应模型

图 9~图 12 分别为目标速度比、空方体积比、透空率和相对截面积 4 个鱼礁结构指标与背涡流相对体积的拟合效果图。如图 9 所示, 背涡流相对体积随着目标速度比增加呈现逐渐增加的二次函数关系, 模型基本形式为  $V_{u1}=1830R_u^2-128R_u+56$ ,  $R^2=1$ ; 背涡流相对体积随鱼礁空方体积比呈现先增加后降低的二次函数关系, 模型基本形式为  $V_{u2}=-4.8R_v^2+32.936R_v+44.756$ ,  $R^2=0.89$ ; 背涡流相对体积随透空率增加同样呈现先增加后降低的二次函数关系, 模型基本形式为  $V_{u3}=-2.9C_p^2+20.41C_p+54.22$ ,  $R^2=0.88$ ; 背涡流相对体积随着迎流面相对截面积取值增加呈先降低后增加的二次函数关系, 模型基本形式为  $V_{u4}=7.139R_{sa}-48.839R_{sa}+137.33$ ,  $R^2=0.92$ ; 根据单元回归模型建立背涡流体积综合评价模型, 模型公式的一般形式为  $V_b=a_1R_u^2+a_2R_u+b_1C_p^2+b_2C_p+c_1R_v^2+c_2R_v+d_1R_{sa}+d_2R_{sa}$ 。

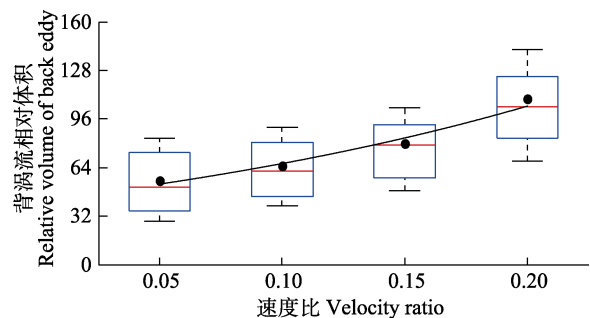


图 9 速度比与背涡流相对体积拟合效果  
Fig.9 Curves of velocity ratio versus relative back eddy volume

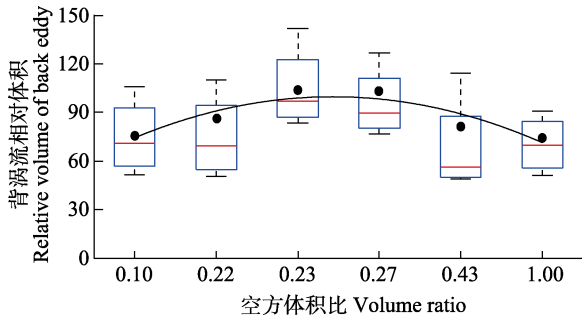


图 10 空方体积比与背涡流相对体积拟合效果  
Fig.10 Curves of volume ratio versus relative back eddy volume

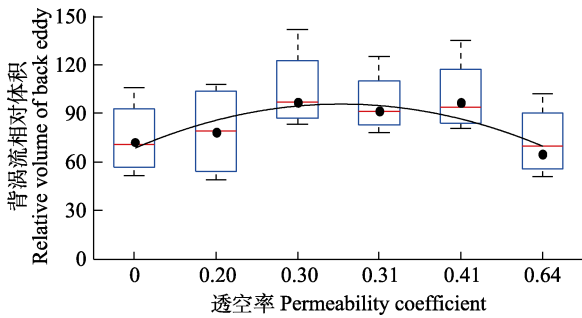


图 11 透空率与背涡流相对体积拟合效果  
Fig.11 Curves of permeability coefficient versus relative back eddy volume

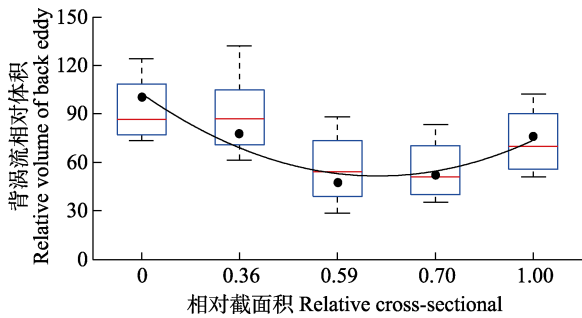


图 12 相对截面积与背涡流相对体积拟合效果  
Fig.12 Curves of relative cross versus sectional area-relative back eddy volume

最终得到结构差异性单位鱼礁建设模式下流场背涡流相对体积与单位鱼礁结构指标的定量关系:

$$V_b = R_u(1830R_u - 128) - R_v(95R_v - 105) + C_p(138C_p - 154) - R_{sa}(418R_{sa} - 180)$$

式中,  $R_u$  为目标速度比,  $R_v$  为空方体积比,  $C_p$  为鱼礁透空率,  $R_{sa}$  为鱼礁迎流面相对截面积。背涡流相对体积模型主要包括 4 项, 分别为目标速度比项  $R_u(1830R_u - 128)$ 、空方体积比项  $R_v(95R_v - 105)$ 、透空率项  $C_p(138C_p - 154)$  和迎流面相对截面积项  $R_{sa}(418R_{sa} - 180)$ , 4 项同样为各自独立项, 彼此间无相互联系。背涡流相对体积规模效应模型中, 鱼礁结构特征指标参数取值范围分别为: 流场目标速度比取

值为大于 0 的任意实数, 空方体积比取值范围为  $0 < R_v \leq 1$ , 人工鱼礁透空率取值范围为  $0 < C_p \leq 1$ , 相对截面积取值范围为  $0 \leq R_{sa} \leq 1$ 。

在对模型极限值分析中, 目标速度比项取值最小值为 0; 当鱼礁空方体积为 0.905~1 时, 随空方体积比增加, 空方体积比项值越大; 空方体积比为 1 时取得最大值, 对背涡流相对体积增加量越小; 当空方体积比为 0.452 时, 空方体积比项值最小, 对背涡流相对体积增加量则越大; 当鱼礁透空率取值在 0.95~1 之间时, 随着透空率取值增加, 透空率项取值越大, 相应对背涡流体积增加量越大; 当透空率为 0.476 时, 透空率项值最小, 对背涡流相对体积增加量则越小; 当鱼礁迎流面相对截面积值越大, 相对截面积项取值越小, 对背涡流相对体积增加量越大。因此, 若投放正方体鱼礁时, 当以背涡流相对体积为选择依据, 对应最佳相对体积状态的鱼礁结构特征指标参数选择规律分别为: 建议当空方体积比小于 0.452 时, 取值越大越好; 当空方体积比大于 0.452 时, 取值越小越好; 建议优先选择空方体积比为 0.452 的鱼礁结构; 建议当透空率小于 0.476 时, 取值越小越好, 当透空率大于 0.476 时, 取值越大越好, 建议避免选择透空率为 0.476 的鱼礁结构; 相对截面积建议取值越大越好。

用结构差异性单位鱼礁背涡流相对体积回归模型求解出的各单位鱼礁规模指标下相应流场相对体积拟合值与模拟值数据对比结果及对应残差见图 13。通过回归模型计算的背涡流相对体积值与数值实验

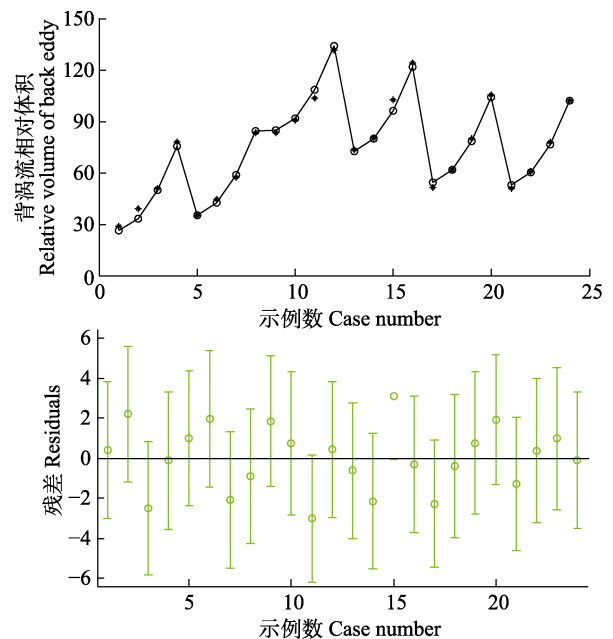


图 13 背涡流相对体积回归值与残差  
Fig.13 Relative volume of back eddy regression and residual



值基本一致,残差数据显示背涡流相对体积模型不存在异常值点,模型拟合效果较好。背涡流相对体积回归模型规划值与模拟值相对误差值为 3.5%, $R^2=0.99$ ,说明回归拟合效果较好, $F=1500$ ,大于 $F_{\alpha(0.1)}=2.17$ ,说明总体回归方程显著成立,则该方程可较准确的反映结构差异性单位鱼礁规模指标对流场体积的影响效果与规律。

### 3 讨论

人工鱼礁单体结构差异直接影响鱼礁建设的经济投入与作用效果(Perkol *et al.*, 2006; Ajemian *et al.*, 2015; 王佳浩等, 2020),合理选择鱼礁单体结构是保证经济、高效人工鱼礁建设的基础。本研究通过对 6 种内部结构差异性正方体鱼礁结构的单位鱼礁流场效应进行分析,获得不同礁体结构人工鱼礁流场特征规律。根据对鱼礁结构特征与流场效应间的相互关联,进一步通过定量方式建立上升流与背涡流流场体积规模效应模型,提出基于正方体结构鱼礁以流场体积效应最优化为目标的鱼礁结构特征指标参数值选择建议。具体如下:当以上升流相对体积最优为建设依据时,鱼礁透空率取值越大越好;当迎流面相对截面积小于 0.795 时,迎流面截面积取值越大越好;当大于 0.795 时,迎流面截面积取值越小越好;避免选择相对截面积为 0.452 的鱼礁结构。当以背涡流相对体积最优为选择依据时,建议当空方体积比小于 0.452 时,空方体积比取值越大越好;当空方体积比大于 0.452 时,空方体积比取值越小越好;优先选择空方体积比为 0.452 的鱼礁结构;当透空率小于 0.476 时,透空率取值越小越好;当透空率大于 0.476 时,透空率取值越大越好;避免选择透空率为 0.476 的鱼礁结构;相对截面积取值越大越好。

本研究中,实体型人工鱼礁的上升流与背涡流相对体积、面积、高度和速度均为 6 种礁中最大值,框架型鱼礁为最小值,其中实体型鱼礁自身空方体积比最大且透空率最小,而框架型鱼礁正相反,说明开口形状相同时,仅以空方体积比和透空率 2 个指标可以代表礁体的结构差异,且透空率越小,流场效应越弱(宋朝祥, 2018; 庞运禧等, 2017)。而大字型、米字型、交叉型和回字型鱼礁内部结构形状不同,单位鱼礁流场特征随空方体积比和透空率的变化存在差异,说明当鱼礁单体不仅开口比大小存在差异,且其内部结构特征也不同,空方体积比与透空率不足以表示流场特征的变化规律(Jiang *et al.*, 2016),因此,本研究首次提出表征礁体结构差异特征的指标迎流面相对截

面积,并得出此 3 个指标可较为准确地评价流场特征的结论。同时得出,单体内部构建位于礁体内部的鱼礁流场效应高于构建位于外部的鱼礁结构,此观点为人工鱼礁结构设计提供理论参考。

### 参 考 文 献

- AJEMIAN M J, WETZ J J, SHIPLEY-LOZANO B, *et al.* An analysis of artificial reef fish community structure along the Northwestern Gulf of Mexico Shelf: Potential impacts of "Rigs-to-Reefs" programs. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126354
- DONG D X. The multivariate nonlinear regression model based on MATLAB. *Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences)*, 2009, 29(2): 45–48 [董大校. 基于 MATLAB 的多元非线性回归模型. 云南师范大学学报(自然科学版), 2009, 29(2): 45–48]
- FARIÑAS-FRANCO J M, ROBERTS D. Early faunal successional patterns in artificial reefs used for restoration of impacted biogenic habitats. *Hydrobiologia*, 2014, 727(1): 75–94
- FU D W, LUAN S G, ZHANG R J, *et al.* Two-way analysis of variance of effects of cut-opening ratio and surface shape facing flowing in artificial fish-reefs on the flowing field. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(3): 274–278 [付东伟, 栾曙光, 张瑞瑾, 等. 人工鱼礁开口比和迎流面形状对流场效应影响的双因素方差分析. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 274–278]
- GUO Y, ZHANG S Y, LIN J. Flow field efficiency of Mi-zi artificial reefs in different construction modes based on numerical experiments. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(9): 2025–2038 [郭禹, 章守宇, 林军. 以数值实验为基础的米字型鱼礁布设模式差异下的流场效率. 水产学报, 2019, 43(9): 2025–2038]
- GUO Y, ZHANG S Y, LIN J. Study on unit reef construction mode based on upwelling effects. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(5): 71–79 [郭禹, 章守宇, 林军. 基于上升流效应的单位鱼礁建设模式研究. 南方水产科学, 2020, 16(5): 71–79]
- JIANG Z Y, GUO Z S, ZHU L X, *et al.* Structural design principle and research progress of artificial reef. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(9): 1881–1889 [姜昭阳, 郭战胜, 朱立新, 等. 人工鱼礁结构设计原理与研究进展. 水产学报, 2019, 43(9): 1881–1889]
- JIANG Z Y, LIANG Z L, ZHU L X, *et al.* Numerical simulation of effect of guide plate on flow field of artificial reef. *Ocean Engineering*, 2016, 116: 236–241
- KIM D, JUNG S, KIM J, *et al.* Efficiency and unit propagation indices to characterize wake volumes of marine forest artificial reefs established by flatly distributed placement models. *Ocean Engineering*, 2019, 175: 138–148

- KIM D, WOO J, YOON H S, *et al.* Efficiency, tranquillity and stability indices to evaluate performance in the artificial reef wake region. *Ocean Engineering*, 2016, 122: 253–261
- KIM D, WOO J, YOON H S, *et al.* Wake lengths and structural responses of Korean general artificial reefs. *Ocean Engineering*, 2014, 92: 83–91
- LI B D. Discussion on the direction of artificial reef construction in China from the construction of artificial reef in Japan. *Marine Fisheries*, 1985(6): 248–253 [李豹德. 从日本人工鱼礁建设探讨我国鱼礁建设的方向. *海洋渔业*, 1985(6): 248–253]
- LI J, LIN J, ZHANG S Y. The numerical experiment on the permeability of a cubic artificial reef and the effect on the flow field around the reef. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010a, 19(6): 836–840 [李珺, 林军, 章守宇. 方形人工鱼礁通透性及其对礁体周围流场影响的数值实验. *上海海洋大学学报*, 2010a, 19(6): 836–840]
- LI J, ZHANG S Y. The comparison between numerical simulation and water channel experiment on a Mi-zi artificial reef. *Journal of Fisheries of China*, 2010b, 34(10): 1587–1594 [李珺, 章守宇. 米字型人工鱼礁流场数值模拟与水槽实验的比较. *水产学报*, 2010b, 34(10): 1587–1594]
- LI S, DU Y J. Model of concrete strength prediction based on multivariate nonlinear analysis. *Concrete*, 2016(3): 44–46 [李松, 杜应吉. 基于多元非线性分析的混凝土强度预测模型. *混凝土*, 2016(3): 44–46]
- LIU H Y, YANG C J, ZHANG P D, *et al.* An Ecopath evaluation of system structure and function for the Laoshan Bay artificial reef zone ecosystem. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(11): 3926–3936 [刘鸿雁, 杨超杰, 张沛东, 等. 基于 Ecopath 模型的崂山湾人工鱼礁区生态系统结构和功能研究. *生态学报*, 2019, 39(11): 3926–3936]
- PANG Y X, LI F C, LI Y. Study on three-dimensional numerical simulation of flow field effect of multi-aperture artificial fish reef under identical penetration rate. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2017, 28(2): 133–141 [庞运禧, 李芳成, 李尧. 同透空率下多孔人工鱼礁流场效应的三维数值模拟研究. *水资源与水工程学报*, 2017, 28(2): 133–141]
- PERKOL-FINKEL S, SHASHAR N, BENAYAHU Y. Can artificial reefs mimic natural reef communities? The roles of structural features and age. *Marine Environmental Research* 2006, 61: 121–135
- SONG C X. Study on the parameterization design method of three pyramidal artificial reefs based on Revit. Master's Thesis of Hainan University, 2018 [宋朝祥. 基于 Revit 的三棱锥型人工鱼礁参数化设计方法研究. 海南大学硕士研究生学位论文, 2018]
- WANG J H, LIU L L, CAI X C, *et al.* Numerical simulation study on influence of disposal space on effects of flow field around porous square artificial reefs. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 40–48 [王佳浩, 刘莉莉, 蔡新晨, 等. 布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应影响的数值模拟研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 40–48]
- WANG L, HUANG C H. Research of color difference model of multivariate regression based on MATLAB. *Computers and Applied Chemistry*, 2008, 25(8): 1015–1018 [汪岚, 黄彩虹. 基于 MATLAB 色差预测多元回归模型的研究. *计算机与应用化学*, 2008, 25(8): 1015–1018]
- WANG Z, GONG P H, GUAN C T, *et al.* Effect of different artificial reefs on the community structure of organisms in Shique Beach of Qingdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 163–171 [王震, 公丕海, 关长涛, 等. 青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 163–171]
- XIAO R. Numerical simulation on features of flow field and transport of nutrient around hollow artificial reefs. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [肖荣. 镂空型人工鱼礁流场效应及营养盐运输的数值模拟研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- YANG H S. Construction of marine ranching in China: Reviews and prospects. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1133–1140 [杨红生. 我国海洋牧场建设回顾与展望. *水产学报*, 2016, 40(7): 1133–1140]
- YU D Y, YANG Y H, LI Y J. Research on hydrodynamic characteristics and stability of artificial reefs with different opening ratios. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(4): 128–136 [于定勇, 杨远航, 李宇佳. 不同开口比人工鱼礁体水动力特性及礁体稳定性研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(4): 128–136]

(编辑 马瑾艳)

## Flow Field Effect of Cube Reef Monocase of Different Structure

GUO Yu<sup>1</sup>, QIN Chuanxin<sup>1,2①</sup>, ZHANG Shouyu<sup>3</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National Agricultural Experimental Station for Fishery Resources and Environment, Dapeng, Guangzhou, Guangdong 510300, China;  
2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou, Guangdong 511458, China;  
3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** The differences in artificial reef structure is one of the main factors affecting the scale effect of the flow field. We selected six widely-used types of reef monocases, namely Da-zi, Mi-zi, Hui-zi, Frame, Cross, and Solid artificial reefs, to study the influence of reef body structure characteristics on the flow field effect in a uniform layout model and further establish the scale effect model of structurally different unit reefs. The results showed that, based on the law of flow field effect, the indices of reef structure characteristics were volume ratio, permeability coefficient, and relative cross-sectional area of reef monocase. The volume effect model of upwelling was  $V_u=0.448R_u^{-1.679}-C_p(29.868C_p-6.921)+R_{sa}(56.18R_{sa}-35.42)$ , and the back eddy volume model was  $V_b=R_u(1830R_u-128)-R_v(95R_v-105)+C_p(138C_p-154)-R_{sa}(418R_{sa}-180)$ . Finally, based on the volume effect model of the flow field, we propose suggestions for selecting structural parameters of the reef body, which provides reasonable parameter guidance for the structural design of an optimal reef based on the flow field volume.

**Key words** Flow field effect; Unit reef; Volume effect model; Numerical experiment; Cube reef monocase

① Corresponding author: QIN Chuanxin, E-mail: qincx@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210421002

http://www.yykxjz.cn/

章贤成, 汪金涛, 陈新军. 基于 BP 神经网络的阿根廷滑柔鱼资源 CPUE 标准化研究. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 11–20  
ZHANG X C, WANG J T, CHEN X J. CPUE standardization of *Illex argentinus* based on BP neural network. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 11–20

# 基于 BP 神经网络的阿根廷滑柔鱼资源 CPUE 标准化研究\*



章贤成<sup>1</sup> 汪金涛<sup>1,2①</sup> 陈新军<sup>1,2</sup>

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

**摘要** 西南大西洋阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)是世界上重要的经济柔鱼类,也是我国远洋鱿钓的主要捕捞对象之一。单位努力量渔获量(CPUE)是渔业中广泛使用的表达种群丰度的指标,但 CPUE 易受到其他因素的影响,需对其进行标准化。本研究利用 2012—2017 年 1—4 月中国大陆西南大西洋阿根廷滑柔鱼鱿钓生产统计数据以及对应区域的环境数据,构建了 20 种误差反向传播人工神经网络(error backpropagation network, EBP)模型以标准化 CPUE。模型以月份(month)、经度(Lon)、纬度(Lat)、海表面温度(SST)、95 m 深层水温(PT95)、叶绿素 *a* 浓度(Chl-*a*)、海表面盐度(SSS)为输入因子,隐含层结点数从 1~20 个逐步增加,输出层为 CPUE,以决定系数( $R^2$ )、最小均方误差(MSE)和平均相对方差(ARV)作为模型评价标准。结果显示,7-18-1 结构模型为最优模型,输入层因子权重从大到小依次为 SST、SSS、Month、PT95、Lon、Lat 和 Chl-*a*。研究表明,最优 BP 神经网络模型能较好地预测 CPUE 时空变化趋势,可以尝试用来作为阿根廷滑柔鱼 CPUE 标准化的新方法。

**关键词** 阿根廷滑柔鱼; BP 神经网络; CPUE 标准化; 环境因子

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0011-10

阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)属头足纲(Cephalopoda)、枪形目(Teuthoidea)、柔鱼科(Ommastrephidae)、滑柔鱼属(*Illex*),为大洋性浅海种,寿命短,生长迅速,整个种群几乎为单一世代组成,产卵后死亡。通常分布于西南大西洋 22°~54°S 塔哥尼亚大陆架和大陆坡 50~1000 m 水深的区域,尤其集中于 35°~52°S 的区域,是目前世界上最重要的商业性头足类之一(唐议, 2002; 王尧耕等, 2005)。我国

大陆渔船于 1997 年首次进入西南大西洋进行阿根廷滑柔鱼生产, 1998—1999 年共有 20 艘船在该海域进行鱿钓作业,到 2007 年,产量仅次于中国台湾和阿根廷,在 2015 年取得了年产 47 万 t 的突破,已成为我国远洋鱿钓渔业的一个重要组成部分(岳冬冬等, 2014; 宋伟华等, 2002)。

阿根廷滑柔鱼是一种典型的生态机会主义鱼种,对环境的微小变化和捕捞死亡率非常敏感(Waluda

\*国家重点研发计划(2019YFD0901404)和国家自然科学基金(NSFC41876141)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901404), and National Natural Science Foundation of China (NSFC41876141)]. 章贤成, E-mail: zxc1179@foxmail.com

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

收稿日期: 2021-04-21, 收修改稿日期: 2021-05-31



*et al*, 1999), 资源年际和年间波动较大, 准确估计西南大西洋阿根廷滑柔鱼的资源丰度是其可持续发展的基础。通常, 单位捕捞努力量渔获量(catch per unit effort, CPUE)作为一种丰度指数, 被假设为与资源丰度成正比(Hilborn *et al*, 1992), 在鱼类资源评估和管理中起着不可或缺的作用(Maunders *et al*, 2004)。然而, 名义 CPUE 与资源量间的正比关系常因受众多因素(如时间、空间、环境、渔船参数等)的影响而难以成立(田思泉等, 2010; 官文江等, 2014), 短生命周期的阿根廷滑柔鱼更是如此, 必须对其 CPUE 进行标准化(Chen *et al*, 2009)。

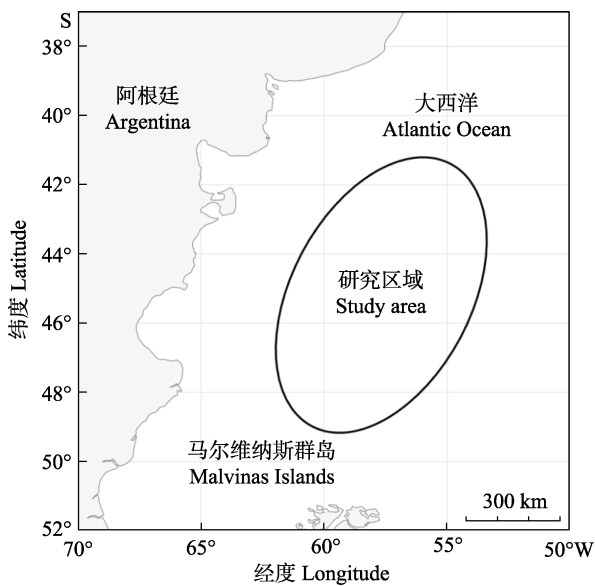


图 1 研究区域  
Fig.1 The study area

陆化杰等(2013a、b)利用广义线性模型(general linear model, GLM)、广义加性模型(generalized additive model, GAM)和基于贝叶斯的广义线性模型(general linear Bayesian model, GLBM)对阿根廷滑柔鱼进行了 CPUE 标准化, 认为 GAM 模型和 GLBM 模型更适用于西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔业的 CPUE 标准化。GLM 模型在处理因变量和多个预测变量之间的非线性关系方面有明显的局限性, 无法灵活表达非线性关系, 无法处理应变量间存在的相关性。GLBM 模型也是建立在线性假设基础上, 且在给定捕鱼期内, 渔船通常集中在环境条件相似的位置, 渔场环境梯度较小, 这可能会导致贝叶斯方法在预测中丢失有效信息(Cao *et al*, 2011)。GAM 模型虽然能提供更大的灵活性, 以适应解释变量和 CPUE 之间不同形式的关系, 但其任何形式的推断过程均可能存在问题(官文江等, 2014)。目前, 非线性技术已被用于 CPUE 标准化研

究, 如人工神经网络(artificial neural network, ANN), 与 GLM 和 GAM 相比, ANN 拥有更大的灵活性和非线性学习能力而实现了更高的预测性能, 不要求数据满足任何假设, 也不需要分析鱼类对于环境条件的响应函数和各环境条件之间的相互关系, 具有很好的自主学习能力和很强的泛化和容错能力, 已成为渔业研究中模拟非线性关系的一种强大方法(Suryanarayana *et al*, 2008; Demuth *et al*, 2014)。误差反向传播神经网络(error backpropagation network, EBP), 由 McClelland 等(1986)首先提出, 属于多层前向神经网络, 采用误差反向传播的监督算法, 能够学习和存储大量的模式映射关系, 在很多领域得到了广泛应用(韩力群, 2006; 汪金涛等, 2014a)。BP 神经网络已经被成熟运用于西南大西洋阿根廷滑渔场预报研究, 精度高(李娜等, 2017; 汪金涛等, 2015), 但尚无利用 BP 神经网络进行阿根廷滑柔鱼 CPUE 标准化的研究。

本研究选取 2012—2017 年 1—4 月我国鱿钓船队在西南大西洋的阿根廷滑柔鱼生产数据, 以 CPUE 为资源丰度相对指数, 结合与其资源丰度变化密切相关的环境因素(陈新军等, 2004; 张炜等, 2008; 伍玉梅等, 2009; 郑丽丽等, 2011), 包括海表面温度(sea surface temperature, SST)、95 m 深层水温(potential temperature 95, PT95)、叶绿素 *a* 浓度(Chlorophyll-*a*, Chl-*a*)、海表面盐度(sea surface salinity, SSS)以及经度(longitude)、纬度(latitude)和月份(month)等, 构建多种 BP 神经网络模型, 预测西南大西洋阿根廷滑柔鱼 CPUE 时空变化趋势, 并探索 CPUE 与上述因子之间的关系, 旨在为阿根廷滑柔鱼渔业生产及管理保护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

2012—2017 年 1—4 月我国鱿钓船队在西南大西洋的生产数据来源于中国远洋渔业数据中心, 数据字段包括作业日期、作业位置、作业船数和渔获量。

海洋环境数据包括 SST、Chl-*a*、SSS 和 PT95。其中, SST 和 Chl-*a* 数据来源于 Oceanwatch (<http://oceanwatch.pifsc.noaa.gov>), SSS 数据来源于哥伦比亚大学气候数据实验室网站(<http://iridl.ldeo.columbia.edu>), PT95 数据来源于夏威夷亚太数据中心(apdrc.soest.hawaii.edu)。时间跨度为 2012—2017 年 1—4 月, 空间跨度为 40°S~50°S、55°W~65°W。

将生产数据与环境数据按月的时间分辨率以及 0.2°×0.2°空间分辨率进行匹配融合, 形成网格状数据。

### 1.2 CPUE 计算及其归一化

CPUE 为每艘渔船每天的捕捞产量, 第  $y$  年、 $m$  月、经度  $i$ 、纬度  $j$  对应的月均 CPUE 定义为:

$$CPUE_{(y,m,i,j)} = \frac{C_{(y,m,i,j)}}{E_{(y,m,i,j)}} \quad (1)$$

式(1)中,  $CPUE_{(y,m,i,j)}$  表示  $y$  年  $m$  月、经度  $i$ 、纬度  $j$  的平均 CPUE;  $C_{(y,m,i,j)}$  表示  $y$  年  $m$  月、经度  $i$ 、纬度  $j$  的总产量;  $E_{(y,m,i,j)}$  表示  $y$  年  $m$  月, 位置在经度  $i$ 、纬度  $j$  的总作业船数。

为了使 CPUE 更加便于研究, 对生产数据中的名义 CPUE 去异常值和缺失值, 再用取对数法以及最大-最小值法对数据进行归一化处理, 最后得到 2498 条数据(图 2)。

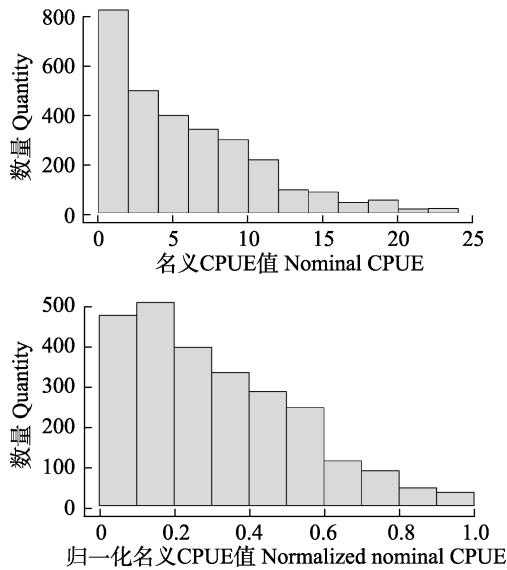


图 2 2012—2017 年 1—4 月 CPUE 频度分布  
Fig.2 CPUE frequency distribution from January to April, 2012 to 2017

### 1.3 神经网络模型

BP 算法主要由学习过程的正向传播和反向传播组成。正向传播时, 样本从输入层进入, 经过隐含层的处理后传向输出层。如果输出层的实际值与期望输出值之间误差过大, 则转向误差的反向传播阶段。反向传播过程则是从输出层到输入层的逐层反传过程, 并在反传的过程中将误差分摊给各层的单元, 获得各层单元的误差信号, 将此误差信号作为修正的依据。正向传播与误差的反向传播都是周而复始进行的, 权重在不断地调整, 即神经网络的训练学习过程, 此过程直至达到模型可接受的误差范围内才会结束(胡洁等, 2010)。BP 模型网络结构主要由输入层、隐含层

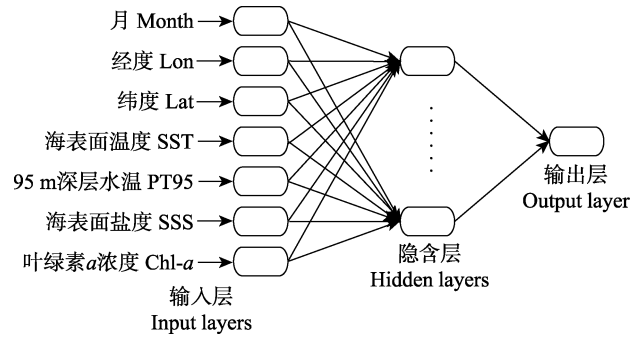


图 3 BP 神经网络结构  
Fig.3 The structure of back propagation network

(中间层)和输出层组成(图 3)。

随机选取数据集的 70%作为训练样本集, 30%作为测试样本集, 最大训练批次 100 次。神经网络模型的输入层包括时间因子(Month)、空间因子(Lon 和 Lat)和环境因子(SST、PT95、SSS 和 Chl-a), 输出层为 CPUE, 1 个隐含层, 结点数从 1 至 20 逐个增加, 建立不同结构的 BP 神经网络(图 3)。

研究以决定系数  $R^2$ 、最小均方误差(MSE)以及平均相对方差(ARV)评价各结构模型精度, 选择最优模型。利用简单的线性回归建模(观测值与神经网络预测值)提取  $R^2$ ,  $R^2$  越接近 1, 模型精度越高(邓多等, 2020)。MSE 也可作为判断最优模型的标准(汪金涛等, 2014b), MSE 的函数定义见公式(2), MSE 越小, 则 BP 神经网络预测的结果越准确。ARV 衡量神经网络泛化能力, ARV 的函数定义见公式(3), ARV 值越小, 模型越稳定, 神经网络泛化能力越强, 预测效果越好。如果  $ARV=0$ , 表示模型完全达到了预期结果(杨虞微等, 2005; Wang et al, 2018a)。

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - x_i)^2}{n} \quad (2)$$

$$ARV = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \hat{x}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_i)^2} \quad (3)$$

式中,  $n$  为 CPUE 的个数,  $x_i$  为 CPUE 的实际值,  $\hat{x}_i$  为 CPUE 的预估值,  $\bar{x}_i$  为名义 CPUE 的平均值。

利用多次交叉验证评价模型稳定性。每次循环时, 将数据按 70%和 30%的比例随机分为训练样本和测试样本, 模型训练结束后, 利用测试样本计算模型精度指标。进行 100 次循环得到 20 个模型的  $R^2$ 、MSE 和 ARV 值的分布, 综合 3 个指标的大小及变化趋势选取最优模型。

## 1.4 输入因子重要度

神经网络解释图(neural interpretation diagram, NID)可以将输入层到隐含层、隐含层到输出层之间的连接权重用直线表示。神经网络的非线性映射能力强,训练后的BP神经网络可获得各层间的连接权重,直线的粗细表示连接权重绝对值的大小,即信号作用的强弱(Özesmi *et al.*, 1999)。Garson 算法(Garson *et al.*, 1991)是基于连接权重的神经网络敏感性分析方法,它可以借助神经网络获得权重的灵敏度,利用连接权重的乘积得到输入变量对输出变量的重要程度,即相对贡献值,能直观反映输入层各个因子的重要程度。

## 1.5 预测 CPUE 时空分布

利用最优模型预测 2012—2017 年的 1—4 月滑柔鱼空间 CPUE,进行归一化处理绘制空间热力分布图,与名义 CPUE 进行空间位置对比分析。

## 2 结果

### 2.1 最优模型

模型精度分布图显示(图 4a), $R^2$  随隐含层结点数增加而逐渐增大,模型 18 的  $R^2$  最大;MSE 值随隐含层结点数增加,波动下降,模型 18 的 MSE 值最小(图 4b);ARV 值分布趋势与 MSE 值相似,模型 1~4 下降趋势明显,模型 5~16 较为平缓,模型 17~20 的 ARV 值先降后增,模型 19 的 ARV 值最低(图 4c)。综上所述,

模型 18 为相对最优模型(图 4)。

### 2.2 输入因子权重

模型因变量与自变量之间存在非常复杂的非线性关系(图 5),各变量的贡献率从大到小依次为 SST、SSS、month、PT95、Lon、Lat 和 Chl-*a* (图 6)。

### 2.3 CPUE 空间分布

整体上看,名义 CPUE 在该海域主要以东北-西南走向分布,2014 和 2015 年显著高于其他年份。预测值的范围较名义值分布更广,且变化更大。部分月份,如 2014 年 1—3 月,在研究海域东北边缘出现异常偏高;每年 1 月分布预测结果较差,高值区主要分布于研究海域西南部;每年 2 月预测 CPUE 最高,高值区主要分布在研究海域的西南部和东北部。每年 3、4 月预测结果分布在东北-西南条带状较为明显。部分月份高预测值分布在遵循东北-西南大趋势下出现较为明显的东西纬向上的延伸,如 2014 年 4 月。东北-西南走向的高值区分布模式与大部分月份的实际作业区分布较为吻合,如 2012 年 2 月、2015 年 3 月、2016 年 3 月、2017 年 3 月等比较显著(图 7)。

### 2.4 CPUE 时间变化

月均归一化名义 CPUE 在(0, 0.5)区间内有较大的波动,而月均归一化预测 CPUE 则波动幅度较小,主要在(0.2, 0.3)区间内小幅波动。在同一时间,虽然月均名义 CPUE 和月均预测 CPUE 大小有一定差别,

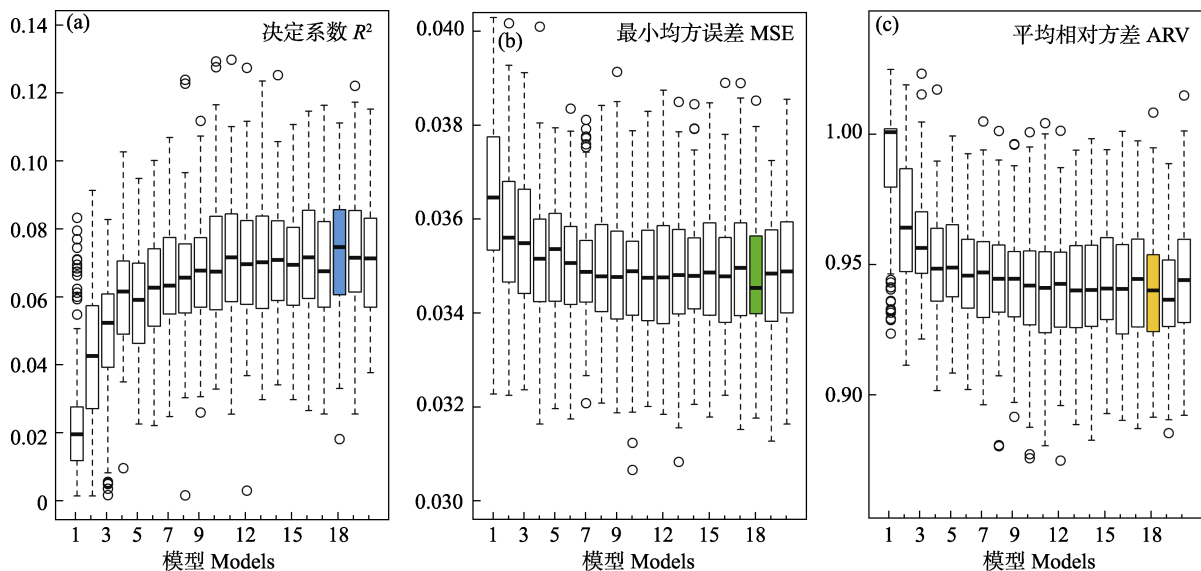


图 4 所有模型的  $R^2$ 、MSE 及 ARV 大小分布  
Fig.4 Distribution of  $R^2$ , MSE and ARV of all models



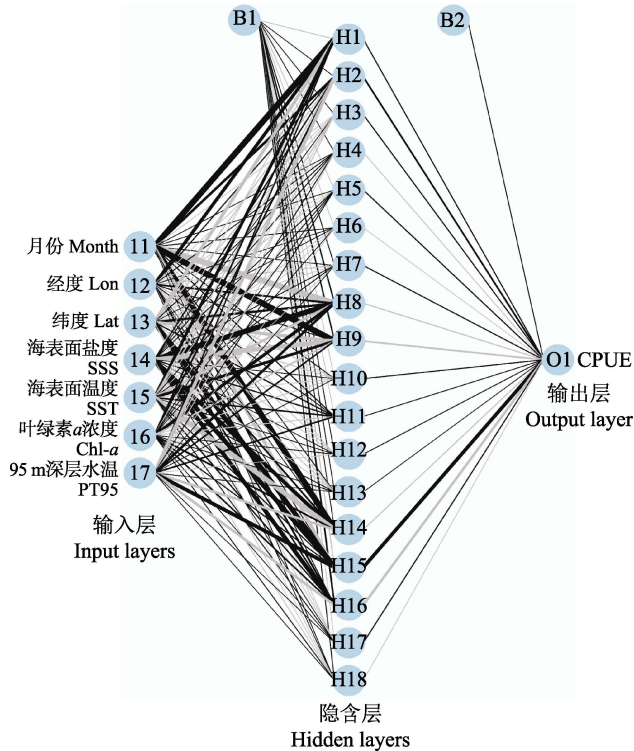


图 5 模型 18 神经网络解释图

Fig.5 Neural network interpretation of Model 18

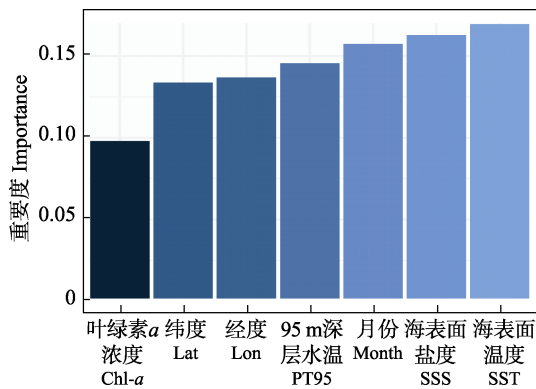


图 6 模型 18 Garson 图

Fig.6 Garson diagram of Model 18

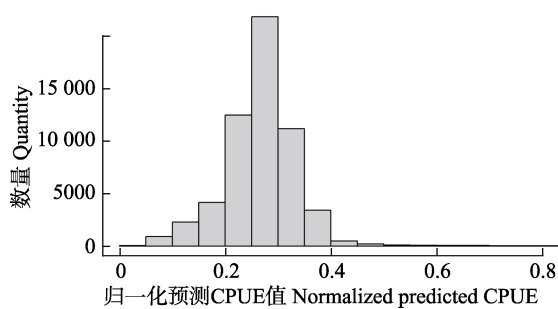


图 7 2012—2017 年 1—4 月预测 CPUE 频度分布

Fig.7 Predicted CPUE frequency distribution from January to April, 2012 to 2017

但在时间变化趋势上二者有较高的一致性(图 8), 且每年的 2 月预测值相对偏高, 这与空间分布图表达的结果较为吻合。时间变化趋势上, 在 2016 年 1 月出现了较大的偏差, 呈现负相关(图 9)。

### 3 分析与讨论

阿根廷滑柔鱼作为一种短生命周期的种类, 其资源变动和渔场分布对海洋环境条件较为敏感, 其资源的评估必须要采用标准化 CPUE。本研究提出一种基于 BP 神经网络的阿根廷滑柔鱼 CPUE 标准化的研究方法, 建立了对 2012—2017 年西南大西洋阿根廷滑柔鱼 CPUE 标准化的 20 种不同的神经网络模型, 根据  $R^2$ 、MSE 和 ARV 选出最优模型, 并对 CPUE 进行预测和验证。

#### 3.1 输入因子重要度

对阿根廷滑柔鱼 CPUE 分布影响权重自大到小分别为 SST、SSS、Month、PT95、Lon、Lat 和 Chl-a。各个因子间重要度相差较小, 说明都是影响阿根廷滑柔鱼时空分布的重要因素, 其中, SST 为最重要的海洋环境因子。这与以往学者的研究结果较为一致, 如 Sacau 等(2005)在阿根廷滑柔鱼资源丰度时空预测建模研究中认为, SST、Lon、Lat 和 Month 为最重要的影响因子; Chang 等(2015)研究认为, 海水温度是海洋因子的代表, 加之巴西暖流和福克兰寒流在此汇聚, 使海水温度对滑柔鱼分布有更显著影响; Bazzino 等(2005)发现, 3—8 月, 阿根廷滑柔鱼偏爱水深为 80~280 m 的中层和外部大陆架较冷水层, 11、12 月, 偏爱深度为 70~90 m 的较浅、较温暖水层, 表明种群分布与深层温度之间存在显著关联, 阿根廷滑柔鱼具有昼夜垂直移动现象, 通常其深层温度及温跃层有无也是寻找中心渔场的指标之一(陈新军等, 2012)。本研究建模时, 在输入层因子中加入 95 m 水层温度, 且表明 PT95 为较重要的环境因子(图 6)。在空间要素中, Lon 的贡献率略大于 Lat, 这可能是由于受巴西暖流和马尔维纳斯寒流的影响(Piola *et al*, 2019), 海水温、盐结构也会有纬向上的扰动, 海水温、盐度会随之发生变化, 影响滑柔鱼分布。Chl-a 是代表海水浮游生物量的指标之一, 对西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔场的形成有重要影响(Wang *et al*, 2020), 但在该模型中贡献率最低, 可能是由于 Chl-a 浓度受海水温、盐状况影响较大(金思韵等, 2012), 其重要度在海表面温度以及海表面盐度都有贡献时显得较后者更低。



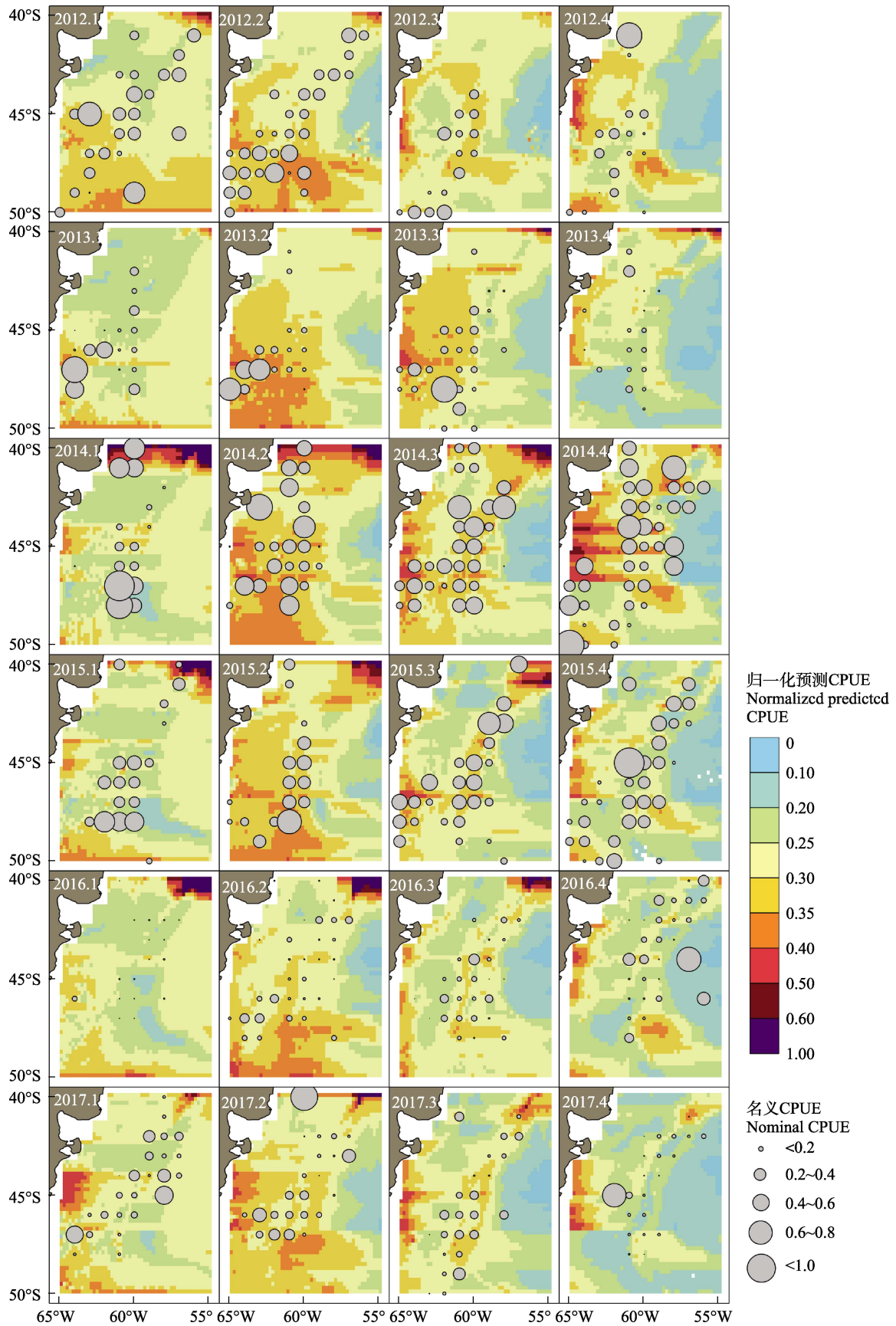


图 8 名义 CPUE 与预测 CPUE 分布  
Fig.8 Distribution of nominal CPUE and predicted CPUE

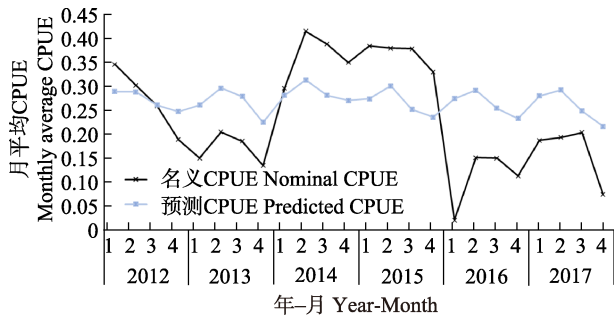


图 9 CPUE 月变化

Fig.9 Monthly variation of CPUE

### 3.2 CPUE 空间分布

预测结果较实际值偏低,这是由于BP神经网络模型在进行预测的过程中,误差累计现象明显(付川等, 2019)。从预测CPUE的空间分布看,与实际的名义CPUE分布有一定的相关性,有着近似的分布趋势,但也有一些月份模型预测效果较差,其原因可能是商业捕捞数据量较小,并且由于此次CPUE预测是对整个研究海域而言,以局限的点预测完整的面,导致部分月份精准性较差。部分月预测结果在研究海域东北角出现异常,可能是由于模型的系统性误差导致,无法对研究区域边缘进行准确预测。预测CPUE主要呈东北-西南走向分布,这可能与渔船作业区域、线路和阿根廷滑柔鱼洄游路线有关。1—2月,中国鱿钓渔船在西南大西洋捕捞的阿根廷滑柔鱼主要以夏季产卵群体(summer spawning stock, SSS)为主;从2月中旬开始,有部分南部巴塔哥尼亚群体(south patagonic stock, SPS);从3月开始,SPS成为渔场的主要亚群,SSS群体的产卵场主要分布在福克兰或巴西海流控制下44°S附近陆坡,SPS群体的产卵场主要分布在42~47°S的大陆坡中部(刘岩等, 2012)。阿根廷滑柔鱼的洄游路线主要是从南部冷水索饵区(马尔维纳斯/福克兰洋流)到偏北部温暖的产卵区(巴西洋流)(Bazzino *et al*, 2005),且东北-西南走向也与南美洲大陆西海岸线相平行,垂直于大陆架逐渐向深海延伸的方向,得益于寒暖流的交汇所带来的底层海水上泛带来了大陆架陆坡底层的营养物质,阿根廷滑柔鱼资源分布与海岸线接近平行,也说明了水深与不同水层的水温对分布有着重要影响。本研究在环境数据中加入的95m水层水温表现出较高的贡献率,也进一步佐证了上面的观点。由于模型预测只考虑建模时的输入因子,但鱼类种群分布受到多样而复杂的因素的影响,尤其是一年生的阿根廷滑柔鱼,对环境变化和人为活动非常敏感(Arkipkin *et al*, 2013),使模型预测结果并不完全理想。模型的不确定性主要来自数

据采集和模型参数的不确定性(Wang *et al*, 2018b)。本研究渔获数据仅来源于中国大陆,数据量较为欠缺,进一步影响了模型预测。

### 3.3 CPUE 时间变化

从时间变化来看,预测CPUE波动很小,且数值较名义CPUE普遍较小,可能是由于预测过程在很大程度上消除了空间、时间和环境因素对CPUE的影响,使其波动较小。名义CPUE与预测CPUE在变化趋势上有较强的一致性,表明该BP神经网络模型能够预测CPUE的时间变化趋势,但无法准确地预测CPUE值。预测月均值在每年的2月达到最高,实际的阿根廷滑柔鱼渔汛期主要在1—4月(郑丽丽等, 2011; 陈新军等, 2005),且在2、3月名义CPUE达到高峰,这与预测结果较为一致。在时间序列上,主要在2016年1月出现较大偏差,是由于该月名义CPUE异常偏低,可能是由于2015年的过度捕捞影响了阿根廷滑柔鱼的资源补充。在其他时间段,模型预测结果与实际趋势较吻合。

研究认为,7-18-1结构模型为最优模型,海表面温度(SST)、海表面盐度(SSS)、月份(Month)、95m深层水温(PT95)、经度(Lon)、纬度(Lat)、叶绿素a浓度(Chl-a)皆对阿根廷滑柔鱼的CPUE分布有显著影响。CPUE空间预测结果为东北、西南偏高,整体呈东北-西南走势,与作业区域分布趋势较为接近。预测CPUE与名义CPUE时空变化趋势有很强的一致性,表明该模型虽然无法准确预测CPUE,但可以预测CPUE变化趋势。因此,该神经网络模型能较好地预测CPUE的时间和空间变化趋势,可以尝试用作阿根廷滑柔鱼CPUE标准化的新方法。

### 3.4 不足及未来展望

本研究考虑了SSS、Chl-a、SST和PT954个环境要素,若数据资料充足,可以考虑将海平面高度及异常、更多水层水温、海水密度、南极震荡(Antarctic oscillation, AAO)、南方涛动指数(southern oscillation index, SOI)、净初级生产力等要素纳入研究,可以增加模型准确性。后续研究还可以考虑其他时间分辨率和空间分辨率,对比研究结果,以寻求最佳时间和空间分辨率。本研究仅分析了单隐含层的BP神经网络结构模型,对于多隐含层的神经网络结构是否能用于标准化资源丰度或者提高预报精度,有待进一步研究。另外,BP神经网络是一种黑箱模型,其本质是一种梯度下降算法,不可避免地具有收敛速度慢、局部最优、稳定性差等缺点,如何提高该方法在渔业分

布研究中的准确性和稳定性也有待更多的探索。因为零值对神经网络建模有一定负面影响,本研究对所采用的渔业数据的零值进行了剔除,BP神经网络容易陷入局部极小值,如何在零膨胀情况下或其他极小值干扰的情况下合理建模也是亟待解决的问题。

## 参 考 文 献

- ARKHIPKIN A I. Squid as nutrient vectors linking southwest Atlantic marine ecosystems. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2013, 95: 7–20
- BAZZINO G, QUINONES R A, NORBIS W. Environmental associations of shortfin squid *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Northern Patagonian Shelf. *Fisheries Research*, 2005, 76(3): 401–416
- CAO J, CHEN X, CHEN Y, *et al.* Generalized linear Bayesian models for standardizing CPUE: An application to a squid-jigging fishery in the northwest Pacific Ocean. *Scientia Marina*, 2011, 75(4): 679–689
- CHANG K Y, CHEN C S, WANG H Y, *et al.* The Antarctic oscillation index as an environmental parameter for predicting catches of the Argentine shortfin squid (*Illex argentinus*) (Cephalopoda: Ommastrephidae) in southwest Atlantic waters. *Fishery Bulletin*, 2015, 113(2): 202–212
- CHEN C S, CHIU T S. Standardizing the CPUE for the *Illex argentinus* fishery in the southwest Atlantic. *Fisheries Science*, 2009, 75(2): 265–272
- CHEN X J, LU H J, LIU B L, *et al.* Forecasting fishing ground of *Illex argentinus* by using habitat suitability model in the southwest Atlantic. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(3): 431–438 [陈新军, 陆化杰, 刘必林, 等. 利用栖息地指数预测西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔场. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(3): 431–438]
- CHEN X J, ZHAO X H. The relationship between the distribution of production of squid *Illex argentinus* and sea surface temperature in the southwest Atlantic Ocean. *Journal of Dalian Ocean University*, 2005, 20(3): 222–228 [陈新军, 赵小虎. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼产量分布与表温关系的初步研究. *大连水产学院学报*, 2005, 20(3): 222–228]
- CHEN X J, LIU J L. Preliminary analysis on the relationship between the distribution of fishing ground of *Illex argentinus* and SST in the Patagonian shelf. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 19–24 [陈新军, 刘金立. 巴塔哥尼亚大陆架海域阿根廷滑柔鱼渔场分布及与表温的关系分析. *海洋水产研究*, 2004, 25(6): 19–24]
- DEMUTH H B, BEALE M H, DE JESS O, *et al.* *Neural network design*. Martin Hagan, 2014
- DENG D, CHEN J K, PEI L. A deep confidence network-based method for predicting the safety factor of deep slip stability of gravity dams. *Water Resources Planning and Design*, 2020(9): 140–145 [邓多, 陈建康, 裴亮, 等. 基于深度置信网络的重力坝深层抗滑稳定安全系数预测方法. *水利规划与设计*, 2020(9): 140–145]
- FU C, LIU G, ZHAO Z D, *et al.* Forecast model of natural gas daily load in winter based on residual correction. *Oil-Gas Field Surface Engineering*, 2019, 38(10): 25–30 [付川, 刘刚, 赵忠德, 等. 基于残差修正的冬季天然气日负荷预测模型. *油气田地面工程*, 2019, 38(10): 25–30]
- GARSON D G. *Interpreting neural network connection weights*. Miller Freeman, Inc., 1991, 47–51
- GUAN W J, TIAN S Q, WANG X F, *et al.* A review of methods and model selection for standardizing CPUE. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 852–862 [官文江, 田思泉, 王学昉, 等. CPUE 标准化方法与模型选择的回顾与展望. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 852–862]
- HAN L Q. *Artificial neural network tutorial*. Beijing: Beijing University of Posts and Telecommunications Press, 2006 [韩力群. *人工神经网络教程*. 北京: 北京邮电大学出版社, 2006]
- HILBORN R, WALTERS C J. Quantitative fisheries stock assessment: Choice, dynamics and uncertainty. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1992, 2(2): 177–178
- HU J, ZENG X J. Fast learning algorithm of global convergence for BP-neural network. *Journal of Systems Science and Mathematical Sciences*, 2010, 30(5): 604–610 [胡洁, 曾祥金. 一种快速且全局收敛的 BP 神经网络学习算法. *系统科学与数学*, 2010, 30(5): 604–610]
- JIN S Y, PAN J M, HAN Z B. Spatial and temporal variability of chlorophyll *a* during the austral summer in Prydz Bay, Antarctica. *Chinese Journal of Polar Research*, 2012, 24(4): 361–371 [金思韵, 潘建明, 韩正兵. 南极夏季普里兹湾叶绿素 *a* 的时空变化研究. *极地研究*, 2012, 24(4): 361–371]
- LI N, LU H J, CHEN X J. Comparison of different forecasting model for fishing ground of *Illex argentinus* based on artificial neural networks in the southwest Atlantic Ocean. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(1): 65–71 [李娜, 陆化杰, 陈新军. 基于不同 BP 神经网络的西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔场预报模型比较. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(1): 65–71]
- LIU Y, ZHANG X M, ZHOU Y, *et al.* An analysis of biological characteristics of Argentine shortfin squid *Illex argentinus* collected by trawl in southwest Atlantic in 2011. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(3): 39–47 [刘岩, 张秀梅, 周游, 等. 2011 年西南大西洋拖网渔获物阿根廷滑柔鱼生物学分析. *南方水产科学*, 2012, 8(3): 39–47]
- LU H J, CHEN X J, CAO J, *et al.* CPUE standardization of *Illex argentinus* for Chinese Mainland squid-jigging fishery in the southwest Atlantic Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2013a, 37(6): 951–960 [陆化杰, 陈新军, 曹杰, 等. 中国大陆阿根廷滑柔鱼鱿钓渔业 CPUE 标准化. *水产学报*, 2013a, 37(6): 951–960]
- LU H J, CHEN X J, CAO J. CPUE standardization of *Illex*

- argentinus* for Chinese Mainland squid-jigging fishery based on generalized linear Bayesian models. *Acta Ecologica Sinica*, 2013b, 33(17): 5375–5384 [陆化杰, 陈新军, 曹杰. 基于 GLBM 模型的中国大陆阿根廷滑柔鱼鱿钓渔业 CPUE 标准化. *生态学报*, 2013b, 33(17): 5375–5384]
- MAUNDER M N, PUNT A E. Standardizing catch and effort data: A review of recent approaches. *Fisheries Research*, 2004, 70(2/3): 141–159
- MCCLELLAND J L, RUMELHART D E. PDP Research Group. Parallel distributed processing. Cambridge, MA: MIT Press, 1986
- ÖZESMI S L, ÖZESMI U. An artificial neural network approach to spatial habitat modelling with interspecific interaction. *Ecological Modelling*, 1999, 116(1): 15–31
- PIOLA A R, MATANO R P. Ocean currents: Atlantic western boundary: Brazil current/Falkland (Malvinas) current. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences: Encyclopedia of Ocean Sciences (Third Edition), 2019, 3: 414–420
- SACAU M, PIERCE G J, WANG J, *et al.* The spatial-temporal pattern of Argentine shortfin squid *Illex argentinus* abundance in the southwest Atlantic. *Aquatic Living Resources*, 2005, 18(4): 361–372
- SONG W H, XIONG P F. Research on the developing of Argentine shortfin squid-jig fishing in the south-west Atlantic. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2002(1): 62–68 [宋伟华, 熊鹏飞. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼作业前景的探讨. *海洋湖沼通报*, 2002(1): 62–68]
- SURYANARAYANA I, BRAIBANTI A, RAO R S, *et al.* Neural networks in fisheries research. *Fisheries Research*, 2008, 92(2/3): 115–139
- TANG Y. Analysis on biological characteristics of the catch of squid jigging in the southwest Atlantic. *Marine Fisheries*, 2002(1): 17–22 [唐议. 西南大西洋鱿钓作业渔获物——阿根廷滑柔鱼生物学分析. *海洋渔业*, 2002(1): 17–22]
- TIAN S Q, CHEN X J. Impacts of different calculating methods for nominal CPUE on CPUE standardization. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(2): 240–245 [田思泉, 陈新军. 不同名义 CPUE 算法对 CPUE 标准化的影响. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(2): 240–245]
- WALUDA C M, TRATHAN P N, RODHOUSE P G. Influence of oceanographic variability on recruitment in the *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) fishery in the south Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 183: 159–167
- WANG J T, GAO F, LEI L, *et al.* Application of BP neural network based on principal component analysis in fishing grounds of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*) in the southeast Pacific Ocean. *Haiyang Xuebao*, 2014a, 36(8): 65–71 [汪金涛, 高峰, 雷林, 等. 基于主成分和 BP 神经网络的智利竹筴鱼渔场预报模型研究. *海洋学报*, 2014a, 36(8): 65–71]
- WANG J T, GAO F, LEI L, *et al.* Impacts of temporal and spatial scale as well as environmental data on fishery forecasting models for *Illex argentinus* in the southwest Atlantic. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1007–1014 [汪金涛, 高峰, 雷林, 等. 阿根廷滑柔鱼渔场预报模型最适时空尺度和环境因子分析. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 1007–1014]
- WANG J T, GAO F, LEI L, *et al.* Modeling of fishing grounds for *Dosidicus gigas* based on BP neural network in southeast Pacific. *Marine Fisheries*, 2014b, 36(2): 131–137 [汪金涛, 高峰, 雷林, 等. 基于神经网络的东南太平洋茎柔鱼渔场预报模型的建立及解释. *海洋渔业*, 2014b, 36(2): 131–137]
- WANG J, CHEN X, CHEN Y. Projecting distributions of Argentine shortfin squid (*Illex argentinus*) in the southwest Atlantic using a complex integrated model. *Acta Oceanologica Sinica*, 2018a, 37(8): 31–37
- WANG J, CHEN X, STAPLES K W, *et al.* A stock assessment for *Illex argentinus* in southwest Atlantic using an environmentally dependent surplus production model. *Acta Oceanologica Sinica*, 2018b, 37(2): 94–101
- WANG J, JIANG Y, ZHANG J, *et al.* Catch per unit effort (CPUE) standardization of Argentine shortfin squid (*Illex argentinus*) in the southwest Atlantic Ocean using a habitat-based model. *International Journal of Remote Sensing*, 2020, 41(24): 9309–9327
- WANG Y G, CHEN X J. The resources and biology of economic oceanic squid in the world. Beijing: Ocean Press, 2005, 189–190 [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, 189–190]
- WU Y M, YANG S L, SHEN J H, *et al.* Fishing grounds characteristics of *Illex argentinus* in southwest Atlantic. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(6): 1445–1451 [伍玉梅, 杨胜龙, 沈建华, 等. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼作业渔场特征. *应用生态学报*, 2009, 20(6): 1445–1451]
- YANG Y W, CHEN G. Artificial neural network forecasting method in monitoring technique by spectrometric oil analysis. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(8): 1339–1343 [杨虞微, 陈果. 光谱油样分析监测技术中的神经网络预测方法. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(8): 1339–1343]
- YUE D D, WANG L M, FAN W, *et al.* *Illex argentinus* fishery resources management in Argentina and its enlightenment for China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(6): 124–131 [岳冬冬, 王鲁民, 樊伟, 等. 阿根廷滑柔鱼渔业资源管理及对我国的启示. *中国农业科技导报*, 2014, 16(6): 124–131]
- ZHANG W, ZHANG J. A discussion about relationship between the distribution of production of *Illex argentinus* and marine environmental factors in the southwest Atlantic Ocean.

Journal of Shanghai Ocean University, 2008, 17(4): 471–475 [张炜, 张健. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔场与主要海洋环境因子关系探讨. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 471–475]

ZHENG L L, WU Y M, FAN W, *et al.* The distribution of

chlorophyll-*a* and its relationship with the *Illex argentinus* fishing ground of southwest Atlantic Ocean. Transactions of Oceanology and Limnology, 2011(1): 63–70 [郑丽丽, 伍玉梅, 樊伟, 等. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼渔场叶绿素 *a* 分布及其与渔场的关系. 海洋湖沼通报, 2011(1): 63–70]

(编辑 冯小花)

## CPUE Standardization of *Illex argentinus* Based on BP Neural Network

ZHANG Xiancheng<sup>1</sup>, WANG Jintao<sup>1,2①</sup>, CHEN Xinjun<sup>1,2</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries; Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education; Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

**Abstract** *Illex argentinus* is an important economic cephalopod worldwide, as well as an important fishing target for China's mainland and Taiwan Province. Catch per unit effort (CPUE) is a widely used index to express stock abundance in fisheries. However, CPUE is susceptible to many factors; therefore, it must be standardized. In this research, the statistical data of squid fishing production and the corresponding environmental data from January to April, 2012 to 2017 in mainland China were selected, and the BP neural network method was adopted to establish a model to standardize CPUE. The model uses month, longitude (Lon), latitude (Lat), sea surface temperature (SST), potential temperature of the -95 m layer (PT95), chlorophyll-*a* (Chl-*a*), and sea surface salinity (SSS) as input factors. There were 12 hidden layers, from 4 to 15, and the output layer was CPUE.  $R^2$ , mean squared error (MSE), and average relative variance (ARV) were used as the evaluation criteria of the model. The results showed that a 7-18-1 structure was the optimal model, and the input layer factors in order from high to low weights were SST, SSS, month, PT95, Lon, Lat, and Chl-*a*. The temporal and spatial distribution predictions for the same sea area indicated that although the BP neural network model could not accurately predict the specific values of CPUE, it could predict the temporal and spatial variations of CPUE, which could be used for the CPUE standardization of *I. argentinus*.

**Key words** *Illex argentinus*; BP neural network; CPUE standardization; Environmental factors

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



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201227001

http://www.yykxjz.cn/

程冉, 侯鑫, 王欢, 张沛东, 康斌, 李文涛. 红纤维虾形草移植植株存活、生长和生理对不同水动力条件的响应. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 21–31

CHENG R, HOU X, WANG H, ZHANG P D, KANG B, LI W T. Survival, growth, and physiological responses of surfgrass transplants to different hydrodynamic regimes. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 21–31

# 红纤维虾形草移植植株存活、生长和生理对不同水动力条件的响应\*

程冉 侯鑫 王欢 张沛东 康斌 李文涛<sup>①</sup>

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003)

**摘要** 红纤维虾形草(*Phyllospadix iwatensis*)属鳗草科、虾形草属,与大多数分布于软底质(如泥沙)的海草不同,红纤维虾形草主要在岩石底质上生长,且通常生长在风浪流较强的环境中。为了探究通过移植的方式修复衰退虾形草床的可行性,于2019年4月—2020年8月在山东荣成马山里海域高、中、低3个不同水动力条件的区域进行红纤维虾形草移植实验,并对移植植株的存活率、形态、生长和生理状况进行监测。结果显示,移植16个月后,高、中、低3种水动力条件下移植植株的存活率均分别为63.7%、61.0%和60.0%,但差异不显著;植株大小(株高、叶宽、根状茎直径等)、光合色素含量(叶绿素a、总叶绿素和类胡萝卜素)、可溶性糖和淀粉含量均在高水动力条件下获得最高值,且随时间变化显著。研究表明,3种水动力条件下,移植的虾形草都具有较高的存活率,但高水动力条件更适于虾形草的生长,证实了在马山里海域通过本研究方法进行虾形草移植以修复衰退的虾形草床具有可行性。

**关键词** 红纤维虾形草;水动力条件;存活;生长

**中图分类号** Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0021-11

海草是所有生长于海洋环境中的被子植物的统称,广泛分布于太平洋、印度洋和大西洋沿岸的浅海水域;而海草床是海洋三大典型自然生态系统之一,具有重要的生态功能(吴亚林等,2018;张沛东等,2020;Nordlund *et al.*, 2018)。然而,海草床属于脆弱的生态系统,容易受外界环境变化的影响而发生退化。近年来,由于自然因素(气候变化、自然灾害等)和人类活动(水体污染、渔业捕捞和养殖、旅游开发等)的影响,全球大部分海草床不断衰退(Short *et al.*, 1996; Seddon, 2004),并对海洋生物多样性产生重要

的影响(刘金立等,2021)。为修复业已衰退的海草床,世界各地的生态学家研发了多种可促进海草床恢复的方法和技术,主要包括成体植株移植和种子播种2种方式,其中,尤以鳗草(*Zostera marina*)床修复的研究和实践最为广泛(van Katwijk *et al.*, 2000)。

虾形草属于鳗草科(*Zosteraceae*)、虾形草属(*Phyllospadix*),全球共分布有5种(黄小平等,2018),主要有红纤维虾形草(*Phyllospadix iwatensis*)、黑纤维虾形草(*P. japonicus*)、托利虾形草(*P. torreyi*)、齿叶虾形草(*P. serrulatus*)和斯考勒虾形草(*P. scouleri*),其中,

\* 中央高校基本科研业务费专项(201964002; 201822021)资助 [This work was supported by Fundamental Research Funds for the Central Universities (201964002; 201822021)]. 程冉, E-mail: cr17854224408@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 李文涛, 副教授, E-mail: liwentao@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-12-27, 收修改稿日期: 2021-01-21



红纤维虾形草和黑纤维虾形草为亚洲的特有种, 主要生长在朝鲜半岛、日本沿岸和中国北部沿海地区 (Duarte, 2002)。我国山东荣成沿岸曾经有大量的虾形草草床存在。同其他海草一样, 虾形草也处在衰退之中。与大多数海草生长于泥沙质海底不同, 虾形草主要在岩石基底上生长 (曹政飞等, 2015), 且往往分布在风浪流较大的海域。由于虾形草雌雄异株, 且具有明显的偏雌现象, 种子产量很少, 因此, 难以采用播种方式对衰退的虾形草草床进行修复; 而传统的海草植株移植的方法也主要适用于生长于泥沙质海底的鳗草等种类, 对岩石底质上生长的虾形草并不适合 (Reed *et al*, 1998)。Park 等 (2010) 为了将移植植株固定在海底, 将虾形草植株绑缚在海底水泥构件表面突出的铁钉上, 取得了一定效果。

山东荣成马山里海域的红纤维虾形草主要生长在潮间带的潮池和潮下带。该海域位于山东半岛东端, 风浪流较强, 且海底地形复杂多样, 有大量的海底凸起和凹陷, 导致海底水动力情况复杂。de Jonge 等 (2000) 在荷兰瓦登海进行鳗草移植项目设计时, 将流速当作选址的重要指标之一, 速度过大的水域不适宜移植。为探究在该海域进行虾形草移植的可行性, 本研究根据海底地形特征设计了一种便于固定虾形草植株的构件进行了移植实验。在潮下带选取了 3 个不同水动力条件的区域, 研究了不同水动力条件下移植的红纤维虾形草存活、形态、生长和生理指标,

以期为在不同水动力条件下, 通过进行虾形草移植为修复衰退的虾形草草床提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点

实验于 2019 年 4 月—2020 年 8 月在山东荣成市马山里海域 (37°19.3'N, 122°35.3'E) 进行 (图 1)。马山里海域属于我国黄海海域, 是山东半岛沿海诸海域中风速最大的海域之一, 年均风速为 6.7 m/s, 其中, 1 月平均风速最大, 可达 8.2 m/s (王永红等, 2000), 且为开敞海域, 部分潮下带和潮间带的潮池有红纤维虾形草分布。

本移植实验在马山里自然海域的潮下带进行, 分别选取了高、中、低 3 个不同水动力条件的岩礁底质区域作为实验点 (水深约为 0.4 m), 并采用石膏球法 (Fulton *et al*, 2005; 杨晓龙等, 2018) 测出这 3 个实验点的水动力条件 (高 13.6、中 7.4、低 2.5; 数字越高表示波浪和/或水流越强) (图 2)。

### 1.2 水温和光照

实验区域的水温和光照采用 HOBO 数据采集器 (Onset Computer Corp., Bourne, MA, 美国) 监测。这些数据中的温度转换成日均水温 (°C), 在实验区使用 LI-250 数据采集器和 LI-193SA 球形光量子传

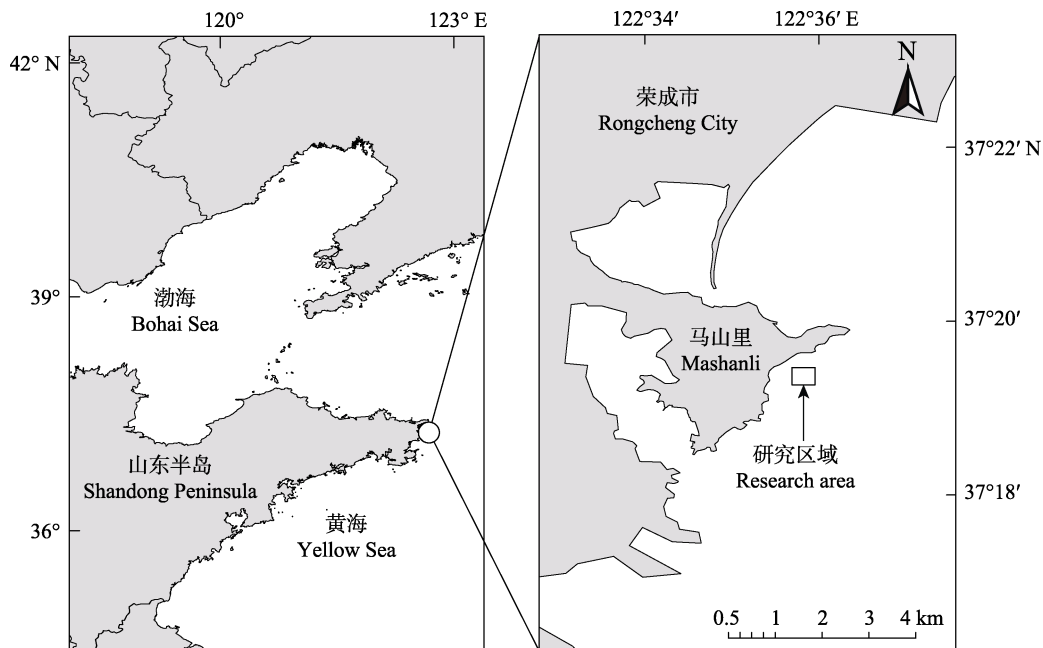


图 1 马山里海域研究区位置示意图

Fig.1 Sketch map of the research area in Mashanli, Shandong, China



图2 石膏球水中暴露实验前后对比

Fig.2 Gypsum spheres before and after the exposure experiment

a: 实验前; b、c、d 分别对应实验后低、中、高水动力条件

a: Before the experiment; b, c and d: After the experiment at low, middle and high hydrodynamic regimes, respectively

感器(LI-Co 公司, 美国)同步测定水下光照, 拟合光照强度(Ix)和光合光子通量密度(photon flux density, PFD, mol photons/m<sup>2</sup>·s)之间的关系, 将 HOBO 光照和温度数据采集器采集到的光照强度数据转换为 PFD, 并计算出日 PFD (mol photons/m<sup>2</sup>·d)。

### 1.3 移植

移植在 2019 年 4 月进行。移植所用红纤维虾形草均来自潮下带草床区的岩石底质, 选取完整、生长良好且株高相近的成体植株, 其叶片数均为 3~5 片, 为便于绑缚植株, 并使所有植株在移植时处于同一状况, 根全部去除, 根茎均保留 1.5 cm 的长度。移植方法: 使用棉线将植株捆绑于网孔直径为 2 cm 的塑料网片上, 再将塑料网片通过绑扎带固定于水泥板 (25×25 cm) 上作为一个移植单元置于锚定框架 (40×40 cm) 中, 投放到移植海域海底(图 3)。每个移植单元移植虾形草 200 株, 在高、中、低 3 个不同水动力条件的区域各放置 6 个移植单元, 其中, 3 个用于监测移植存活率, 另外 3 个用于形态、生长和生理指标的测量。

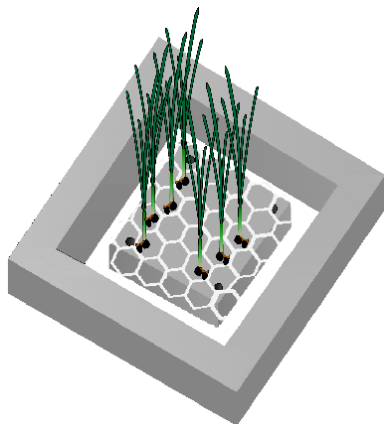


图3 虾形草水下移植构件

Fig.3 Underwater component assembly for transplanting *P. iwatensis*

### 1.4 样品采集和测定

每隔 2 个月取样(因新冠疫情, 移植后共采样 6 次, 即 2019 年 6、8、10、12 月和 2020 年 6、8 月)。取样时, 移植单元上留存的植株数量与该移植单元上的初始植株数量(200)的比值作为该移植单元的存活率。每个水动力条件组的 3 个移植单元存活率的平均值作为该水动力条件下的存活率。每次采样时, 每个水动力条件组随机采集 30 株虾形草(包括地上和地下组织), 其中, 15 株用于形态和生长指标的测量, 另外 15 株用于生理指标的测定。

形态指标主要包括株高、叶宽、单株叶面积、根状茎直径、根数目和最大根长。叶片光合色素含量的测定采用萃取法(Dunton *et al*, 1994): 取每株虾形草第 2 片新叶, 先用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)提取, 然后, 使用分光光度计法进行比对测定。以 DMF 为空白, 分别于 665、652、649 和 470 nm 处测定吸光值。采用蒽酮法(Lewis *et al*, 2007)测定虾形草叶和根状茎中的可溶性糖和淀粉含量。

### 1.5 数据分析

运用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析, 实验数据均使用双因素方差分析(two-way ANOVA), 使用 Duncan 法分析不同水动力条件下红纤维虾形草存活率、形态及各生理指标的组间差异。使用 Origin 2018、ArcGIS10.2 软件进行绘图。实验数据采用平均值±标准误差(mean±SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 水温和光照

实验期间(2019 年 4 月—2020 年 8 月), 马山里海域表层水温和光照均呈现明显的季节变化, 最低温度(-1.04℃)出现在 2019 年 12 月, 最高温度(28.58℃)出现

在2019年8月。光照度最高值(28.13 mol photons/m<sup>2</sup>·d)出现在2020年3月,最低值(1.02 mol photons/m<sup>2</sup>·d)出现在2019年9月初。

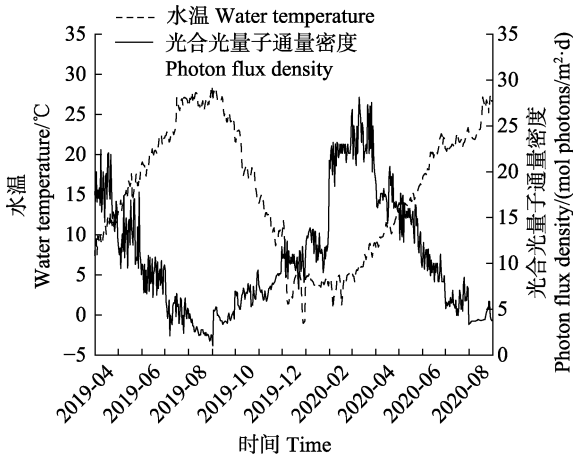


图4 山东半岛荣成马山里海域表层水温 and 光合光子通量密度随时间的变化

Fig.4 Temporal variations in the temperature and photon flux density in the water column at the study site in Mashanli, Shandong, China

## 2.2 虾形草移植植株的存活率

移植后红纤维虾形草植株的存活率呈逐渐下降的趋势。高水动力条件下,红纤维虾形草植株的存活率在实验初期显著低于其他2个水动力条件组( $P < 0.05$ ),而在2020年8月时为最高,此时高、中、低3个水动力条件下移植植株的存活率分别为63.7%、61.0%和60.0%。

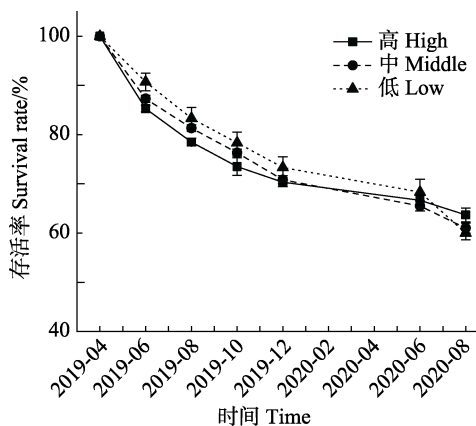


图5 不同水动力条件下红纤维虾形草移植植株的存活率  
Fig.5 Survival rate of surfgrass *P. iwatensis* transplants under different hydrodynamic regimes

## 2.3 移植植株的形态和生长

**2.3.1 株高** 高水动力和中水动力条件组的株高变化趋势相似,高水动力条件组中的植株在移植后前

4个月的株高低于其他处理组,但在移植后的4~16个月内均高于其他处理组(图6a)。高水动力条件组株高的最高值[(65.20±1.89) cm]出现在2020年8月,且显著高于其他月份。其他2个处理组的最高值均在2019年8月;3个处理组的株高最低值[(31.94±1.59) cm]出现在2019年12月时的低水动力条件组。株高随时间的变化,以及与时间和水动力条件之间的交互作用显著( $P < 0.001$ ,表1)。

**2.3.2 叶宽** 3个水动力条件下,叶宽在移植后呈相似的变化趋势。高水动力条件组的叶宽在移植后均显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ;图6b),其最大值[(2.93±0.09) mm]出现在2019年8月。3个水动力条件组的最低值[高水动力组:(2.47±0.04) mm;中水动力组:(2.17±0.03) mm;低水动力组:(1.91±0.04) mm]均出现在2019年6月。叶宽在不同水动力条件下差异显著( $P < 0.001$ ),且其随时间变化及与时间和处理组之间的交互作用显著( $P = 0.026$ ,表1)。

**2.3.3 单株叶面积** 3个水动力条件下的单株叶面积在移植后的变化趋势相似。高水动力条件组的叶面积在移植后各个月中均显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ,图6c)。高水动力条件组中,叶面积的最高值[(33.45±1.98) cm<sup>2</sup>]出现在2019年8月;其他2个处理组的最高值[(31.00±1.66) cm<sup>2</sup>]均出现在2019年4月(移植时)。3个处理组的最低值均出现在2019年12月,其中,最低值出现在低水动力条件组[(16.12±0.62) cm<sup>2</sup>]。单株叶面积在不同月份呈现显著的变化( $P < 0.001$ ),且与时间和处理组之间的交互作用显著( $P < 0.001$ ,表1)。

**2.3.4 根状茎直径** 植株移植后,高水动力条件组的根状茎直径均高于其他组,且各组间差异显著( $P < 0.001$ ,图6d)。根状茎直径随时间变化显著( $P < 0.001$ ,表1),且高、中、低3个水动力条件组根状茎直径的最高值均出现在2019年6月,分别为(4.88±0.08)、(4.33±0.07)和(4.04±0.13) mm,而最低值分别为(3.70±0.16) mm(2019年4月)、(3.38±0.11) mm(2019年12月)和(2.71±0.04) mm(2019年12月)。

**2.3.5 最大根长** 不同动力条件下,植株的最大根长差异显著( $P < 0.001$ ),高水动力条件组的根长均显著高于其他处理组( $P < 0.001$ ,图6e)。高、中、低3个水动力条件组根长的最高值均出现在2020年8月,分别为(2.45±0.17)、(1.86±0.07)和(1.57±0.17) cm。其中,中、低水动力条件组的根长的最小值均出现在2019年12月,分别为(1.25±0.08)和(0.99±0.03) cm,而高水动力条件组的最低值出现在移植后的第1次

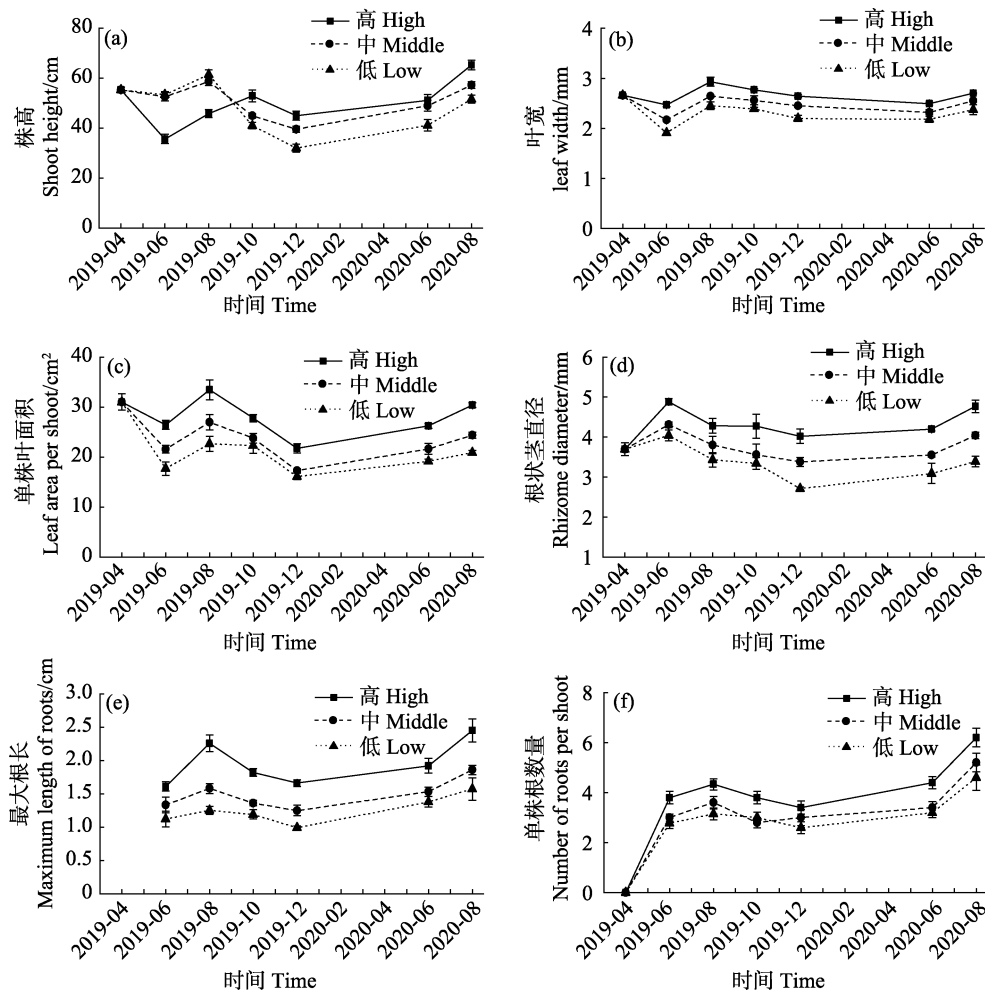


图 6 不同水动力条件下红纤维虾形草的株高(a)、叶宽(b)、单株叶面积(c)、根状茎直径(d)、最大根长(e)、单株根数量(f)  
Fig.6 Shoot height (a), leaf width (b), leaf area per shoot (c), rhizome diameter (d), maximum length of roots (e), and number of roots per shoot (f) of surfgrass transplant under different hydrodynamic regimes

采样时(2019年6月)。

**2.3.6 单株根数量** 3个水动力条件组的植株在移植后,单株根数量的变化呈现相似的趋势,高水动力条件的根数目在各个月均高于其他处理组,且各处理组间差异显著( $P < 0.001$ ,图 6f)。高、中、低3个处理组的最高值均出现在2020年8月,分别为 $6.2 \pm 0.4$ 、 $5.2 \pm 0.4$ 和 $4.6 \pm 0.5$ ,均显著高于其他月份( $P < 0.01$ )。

## 2.4 移植植株生理

**2.4.1 光合色素含量** 移植后,高水动力条件下叶绿素a含量均高于其他处理组,且不同水动力条件组之间存在显著差异( $P < 0.001$ ,图 7a),其中,最高值[( $23.96 \pm 1.01$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ]出现在2019年6月。3个处理组的最低值均出现在2019年12月,低水动力条件组最低[( $7.75 \pm 0.34$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ]。叶绿素a含量在不同月份之间存在显著差异( $P < 0.001$ ),且与不同水动力条件和

月份之间的交互作用显著( $P < 0.001$ ,表 2)。

叶绿素b含量在不同时间均差异显著,且随时间和处理之间交互作用显著( $P < 0.001$ ,表 2)。高水动力条件下,植株的叶绿素b含量在2019年10和12月、2020年6和8月均显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ,图 7b)。高水动力条件下,叶绿素b含量的最高值[( $11.08 \pm 0.27$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ]出现在2020年8月,显著高于其他月份( $P < 0.05$ )。高、中水动力条件下,叶绿素b含量最低值均出现在2019年12月,分别为( $3.63 \pm 0.14$ )和( $3.44 \pm 0.30$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ 。

移植虾形草的类胡萝卜素含量在不同水动力条件之间差异显著( $P < 0.05$ ,图 7c),最高值出现在高水动力条件组的2020年8月[( $5.54 \pm 0.13$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ],显著高于其他月份( $P < 0.05$ )。最低值出现在移植后的第1次采样时的中水动力条件组[( $1.80 \pm 0.09$ )  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ],显著低于各个处理组本月以及其他月份( $P < 0.05$ ,表 2)。

表1 不同水动力条件下红纤维虾形草移植植株形态参数时间变化的双因素方差分析  
Tab.1 Two-way ANOVA results for the morphological parameter of surfgrass *P. iwatensis* transplants at different times and different hydrodynamic regimes

形态学参数 Morphological parameter	变异来源 Variation source	df	<i>F</i>	<i>P</i>
株高 Shoot height	水动力 HR	2	2.157	0.121
	月 Month	5	22.378	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	10.582	<0.001
叶宽 Leaf width	水动力 HR	2	81.256	<0.001
	月 Month	5	42.236	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	2.181	0.026
单株叶面积 Leaf area per shoot	水动力 HR	2	8.210	0.001
	月 Month	5	14.193	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	5.411	<0.001
根状茎直径 Rhizome diameter	水动力 HR	2	52.052	<0.001
	月 Month	5	12.958	12.958
	水动力×月 HR×Month	10	0.490	0.893
单株根数量 Number of roots per shoot	水动力 HR	2	17.885	<0.001
	月 Month	5	15.430	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	0.333	0.97
最大根长 Maximum length of roots	水动力 HR	2	50.036	<0.001
	月 Month	5	39.188	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	17.975	<0.001

注：“HR”表示水动力，下表同

Note: “HR” represents “hydrodynamic regime”, the same as below

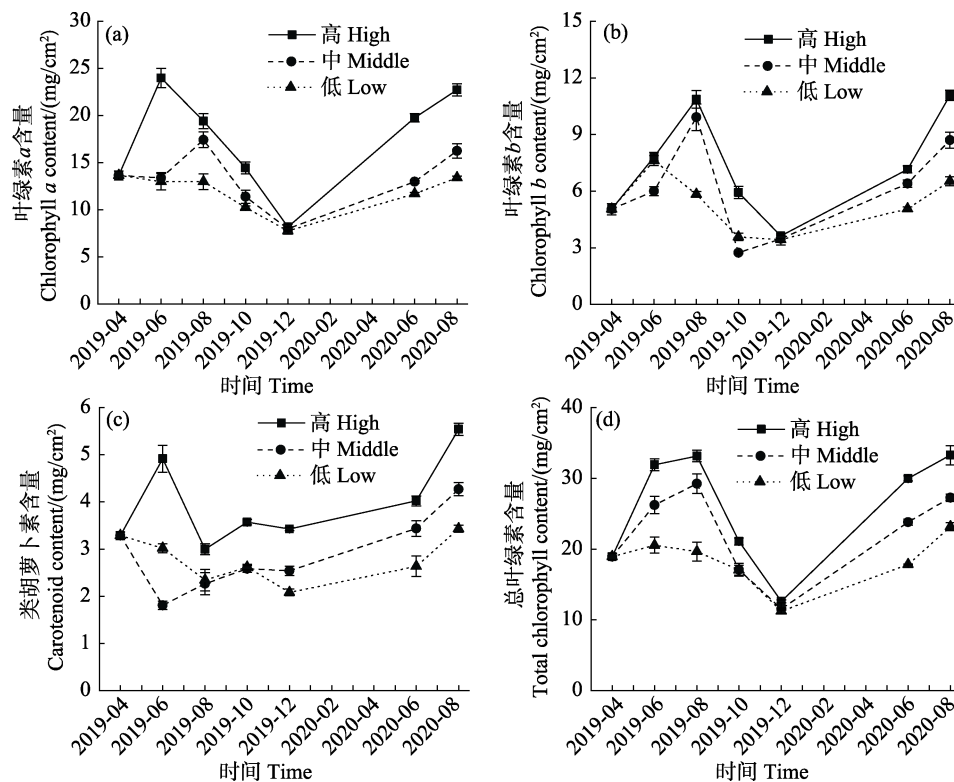


图7 不同水动力条件下红纤维虾形草的叶绿素 a (a)、叶绿素 b (b)、类胡萝卜素(c)、总叶绿素(d)含量

Fig.7 Contents of chlorophyll a (a), chlorophyll b (b), carotenoids (c) and total chlorophyll (d) of surfgrass *P. iwatensis* transplants under different hydrodynamic regimes



表 2 不同水动力条件下红纤维虾形草移植植株生理学指标时间变化的双因素方差分析  
Tab.2 Two-way ANOVA results for the physiological parameter of surfgrass *P. iwatensis* transplants at different times and different hydrodynamic regimes

生理学指标 Physiological parameter	变异来源 Variation source	df	F	P
叶绿素 a 含量 Chlorophyll a content	水动力 HR	2	223.144	<0.001
	月 Month	5	119.422	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	17.092	<0.001
叶绿素 b 含量 Chlorophyll b content	水动力 HR	2	145.038	<0.001
	月 Month	5	220.288	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	21.684	<0.001
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	水动力 HR	2	193.576	<0.001
	月 Month	5	74.857	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	16.024	<0.001
总叶绿素含量 Total Chlorophyll content	水动力 HR	2	123.678	<0.001
	月 Month	5	213.207	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	8.311	<0.001
地上可溶性糖含量 Aboveground soluble sugar content	水动力 HR	2	130.098	<0.001
	月 Month	5	128.040	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	6.970	<0.001
地下可溶性糖含量 Belowground soluble sugar content	水动力 HR	2	185.898	<0.001
	月 Month	5	376.815	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	16.159	<0.001
地上淀粉含量 Aboveground starch content	水动力 HR	2	38.598	<0.001
	月 Month	5	244.234	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	12.181	<0.001
地下淀粉含量 Belowground starch content	水动力 HR	2	147.217	<0.001
	月 Month	5	134.601	<0.001
	水动力×月 HR×Month	10	37.201	<0.001

总叶绿素含量在不同水动力条件之间差异显著 ( $P<0.001$ , 图 7d), 移植后, 高、中水动力条件均在 2019 年 8 月达到最高值, 分别为(33.16±0.80)和(29.25±1.38) mg/cm<sup>2</sup>, 而低水动力条件组的最高值[(23.84±0.57) mg/cm<sup>2</sup>]出现在 2020 年 8 月。3 个水动力条件下的最低值相近, 且均在 2019 年 12 月, 均显著低于其他月份 ( $P<0.05$ ), 其中, 最低值[(11.22±0.22) mg/cm<sup>2</sup>]出现在低水动力条件组。

**2.4.2 可溶性糖和淀粉含量** 不同水动力条件下的可溶性糖含量(地上和地下)相比均差异显著, 且随时间变化显著, 同时, 处理组和月份之间的交互作用也差异显著 ( $P<0.001$ , 表 2)。地上组织的可溶性糖含量在 45.35~184.25 mg/g 之间, 地下组织的可溶性糖含量为 27.30~229.19 mg/g (图 8a 和 8b)。高水动力条件下的地上和地下可溶性糖含量均高于其他处理组 ( $P<0.05$ ), 其最高值均出现在 2019 年 8 月, 且显著高于其他月份 ( $P<0.01$ ); 地上和地下组织可溶性糖含量

最低值均在低水动力条件组, 显著低于其他月份 ( $P<0.01$ )。

植株淀粉含量(地上和地下组织)在不同水动力条件间均差异显著, 随时间变化以及不同水动力条件和月份之间的交互作用差异显著 ( $P<0.001$ , 图 8c 和 8d, 表 2)。其中, 地上组织淀粉含量为 77.18~270.91 mg/g, 地下组织的淀粉含量为 102.48~350.12 mg/g。地上和地下组织的淀粉含量的最高值均在高水动力条件组, 且最高值均出现在 2019 年 10 月。最低值均出现在低水动力条件组的 2019 年 8 月, 且显著低于其他月份 ( $P<0.05$ )。

## 2.5 不同水动力条件与虾形草移植植株各指标的关系

水动力条件与红纤维虾形草各项监测指标的 PCA 排序图(图 9)显示, 第 1 排序轴和第 2 排序轴累计解释量达 75.6%。14 个指标中, 除地上和地下组织的淀粉含量、存活率和叶宽外, 其他指标在第 1 轴附



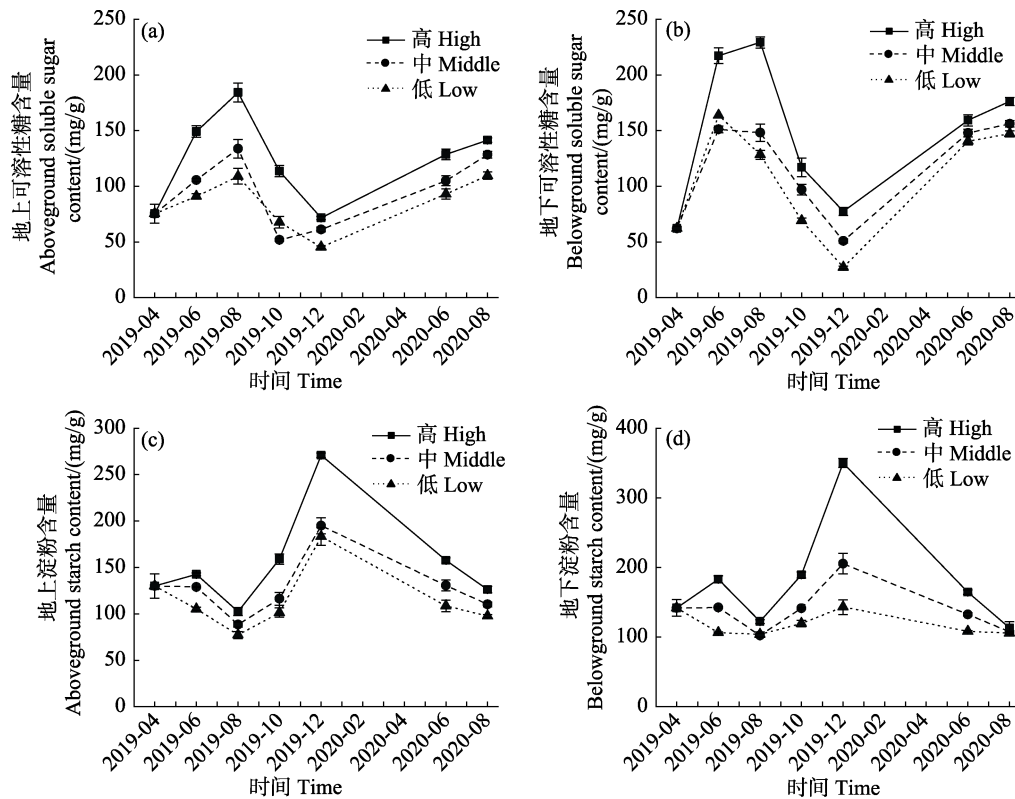


图8 不同水动力条件下移植红纤维虾形草的可溶性糖和淀粉含量

Fig.8 Contents of soluble sugar and starch in surfgrass *P. iwatensis* transplants under different hydrodynamic regimes

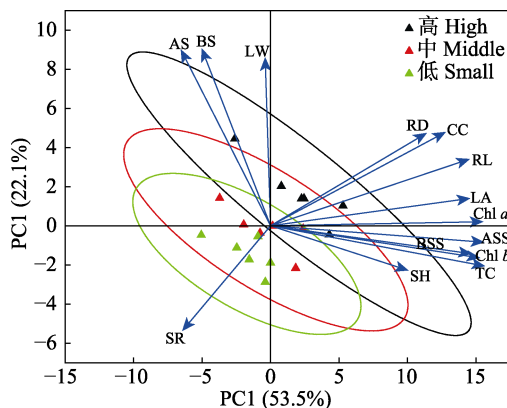


图9 不同水动力条件与红纤维虾形草各项监测指标的PCA排序图

Fig.9 Ordination diagram of PCA of the measurements for the surfgrass *P. iwatensis* under different hydrodynamic regimes

SR: 存活率; SH: 株高; LW: 叶宽; LA: 单株叶面积;  
RD: 根状茎直径; RL: 根长; Chl a: 叶绿素 a 含量;  
Chl b: 叶绿素 b 含量; CC: 类胡萝卜素含量; TC: 总叶  
绿素含量; ASS: 地上可溶性糖含量; BSS: 地下可溶性糖  
含量; AS: 地上淀粉含量; BS: 地下淀粉含量  
SR: Survival rate; SH: Shoot height; LW: Leaf width;  
LA: Leaf area; RD: Rhizome diameter; RL: Root length;  
Chl a: Chlorophyll a content; Chl b: Chlorophyll b content;  
CC: Carotenoid content; TC: Total chlorophyll;  
ASS: Aboveground soluble sugar; BSS: Belowground  
soluble sugar; AS: Aboveground starch content;  
BS: Belowground starch content

近聚成一簇, 呈较强的相关性, 且相关性随矢量夹角的增大而降低; 各形态学指标之间、各光合色素之间夹角较小, 相互呈现明显的正相关关系; 可溶性糖和淀粉含量之间夹角较大, 呈较弱的相关关系。

将 14 个指标的射线延长, 3 个处理组均垂直投射到射线上, 根据投影点到射线实心箭头处相对距离为标准进行排序。结果发现, 在高水动力条件下, 植株的存活率、形态和生理指标均明显高于其他 2 个水动力条件组, 为虾形草生长最适宜的水动力条件。

### 3 讨论

#### 3.1 水动力条件对虾形草存活和生长的影响

研究表明, 水流是影响水生植物形态和生长的重要环境因素之一(Peralta *et al*, 2006; Villazan *et al*, 2016)。在进行鳗草移植时, 最大的挑战是如何将海草固定在海底, 而水流冲击导致移植植株流失是移植失败最重要的原因之一(Bouma *et al*, 2005)。水流还会改变海草床沉积物的组成, 从而影响底质中有机质的含量(Paling *et al*, 2003), 进而对海草的生长产生影响。然而, 太强的水流会侵蚀海草床的底质, 进而影响海草植株在海底的固着, 严重的会导致草床的损失(Riis *et al*, 2003; 王立志等, 2018)。本研究中, 3 种水

动力条件下移植的虾形草最终均获得 60.0% 及以上的存活率, 说明本研究所采用的移植方法为虾形草植株提供了足够大的固着力, 且足以抵抗这 3 种水动力条件产生的对移植植株的冲击。

研究表明, 水流扰动也可促进海底沉积物中营养盐的释放, 为海草的生长提供必要的养分, 促进其生长(Fonseca *et al.*, 1987); 水流还可以减小水体中营养物质在海草叶表面扩散的边界层, 从而为海草提供充足的营养(Koch, 1999)。水流还增加海草接受阳光照射的区域, 促进海草的光合作用, 最终影响海草场的生产力(Paling *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2007)。Koch 等(2007)研究了不同流速下泰来草幼苗的生长情况, 结果显示, 中等流速条件下植株的生物量和叶面积最大。Jordan(2008)研究表明, 随着水流流速的增加, 鳗草根长会逐渐增加, 叶宽逐渐下降, 显示了鳗草的生长对水流环境的一种适应机制。Schanz 等(2003)研究发现, 随水流流速增加, 诺氏鳗草(*Zostera noltii*)株高、叶长和植株密度显著变小。Cooper 等(1988)研究了虾形草对岩石底质和水流环境生境的适应性, 结果显示, 与鳗草相比, 虾形草表现出与其特定生境相关的解剖学特征, 这些特征包括更发达的皮下纤维和根毛以及更粗大的根茎。本研究中, 在高水动力条件下, 虾形草的株高、叶鞘长、单株叶面积等的观测值均较高, 与 Schanz 等(2003)对诺氏鳗草的研究结果相反, 这可能与 2 种海草对高水动力环境的适应能力的差异有关; 高水动力条件组植株的根状茎直径和根长均高于其他 2 个低水动力条件组, 这与 de Los Santos 等(2010)研究发现的较强水流会促进诺氏鳗草根茎生长的结果相似。

### 3.2 水动力条件对虾形草生理的影响

尽管关于海草对水中光照、温度、营养盐和 CO<sub>2</sub> 等环境因素的生理适应性的研究较多, 但海草对水流的响应机制研究很少。Inoue 等(2020)在水流对海草光合作用影响的研究中发现, 水流会引起海草植株倒伏从而产生自遮阴, 进一步影响叶的光合作用。Dennison 等(1985、1986)研究发现, 鳗草对光照降低的适应策略之一是通过提高光利用率, 而其特征就是叶绿素含量的提高。本研究中, 高水动力条件组的叶绿素 *a*、叶绿素 *b*、类胡萝卜素含量和叶绿素总含量均高于其他水动力条件组, 这可能是虾形草对较大的水流导致其植株倒伏而产生的自遮阴的一种适应策略。

海草能将其叶光合作用产物—非结构性碳水化合物(如葡萄糖、蔗糖和淀粉等)储存起来, 而这些碳

水化合物在其叶和根茎中的含量将随着光照、水温等环境因子而变化(Burke *et al.*, 1996)。Mass 等(2010)研究发现, 水流会减小江蓠(*Gracilaria cornea*)藻体表面扩散边界层厚度, 有利于该藻体表面的 O<sub>2</sub> 向水体的扩散, 促进 CO<sub>2</sub> 向藻体表面的扩散, 从而提高光合作用效率。本研究中, 移植植株的可溶性糖含量和地上组织淀粉含量都在实验结束时在高水动力条件处于最高值, 可能得益于该条件下叶表面边界层厚度更小, 有利于 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的流动, 再加上具有更高的光合色素含量, 从而提高了虾形草碳水化合物的合成和存储, 而其机理有待进一步研究。

## 4 结论

本研究中, 选取了马山里海域高、中、低 3 个水动力条件移植红纤维虾形草, 并对移植植株的存活率、形态、生长和生理指标进行了为期 16 个月的监测。结果显示, 3 种水动力条件下, 移植植株在移植 16 个月后存活率均达到 60% 以上, 但差异不显著; 移植植株的其他观测指标之间存在显著差异, 且在不同月份之间存在显著变化, 其中, 以在高水动力条件下的各指标观测值最高。本研究表明, 马山里海域的这 3 种水动力条件均适宜用本研究采用的方法移植虾形草, 且以高水动力条件为最佳。

## 参 考 文 献

- BOUMA T J, DE VRIES M B, LOW E, *et al.* Trade-offs related to ecosystem engineering: A case study on stiffness of emerging macrophytes. *Ecology*, 2005, 86(8): 2187–2199
- BURKE M K, DENNISON W C, MOORE K A. Non-structural carbohydrate reserves of eelgrass *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 137 (1/2/3): 195–201
- CAO Z F, ZHANG W, ZHAO H. Morphology and anatomy of *Phyllospadix iwatensis* makino and their adaptation to marine environment. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(6): 1326–1332 [曹政飞, 张伟, 赵宏. 红纤维虾海藻(*Phyllospadix iwatensis*)形态结构特征及其对海洋环境的适应性. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1326–1332]
- COOPER L W, MCROY C P. Anatomical adaptations to rocky substrates and surf exposure by the seagrass genus *Phyllospadix*. *Aquatic Botany*, 1988, 32(4): 365–381
- DE JONGE V N, DE JONG D J, VAN KATWIJK M M. Policy plans and management measures to restore eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Dutch Wadden Sea. *Helgoland Marine Research*, 2000, 54(2/3): 151–158
- DE LOS SANTOS C B, BRUN F G, BOUMA T J, *et al.* Acclimation of seagrass *Zostera noltii* to co-occurring

- hydrodynamic and light stresses. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 398(6): 127–135
- DENNISON W C, ALBERTE R S. Photoadaptation and growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) transplants along a depth gradient. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1986, 98(3): 265–282
- DENNISON W C, ALBERTE R S. Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). *Marine Ecology Progress Series*, 1985, 25(1): 51–61
- DUARTE C M. The future of seagrass meadows. *Environmental Conservation*, 2002, 29(2): 192–206
- DUNTON K H, TOMASKO D A. *In situ* photosynthesis in the seagrass *Halodule wrightii* in a hypersaline subtropical lagoon. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 107(3): 281–293
- FONSECA M S, KENWORTHY W J. Effects of current on photosynthesis and distribution of seagrasses. *Aquatic Botany*, 1987, 27(1): 59–78
- FULTON C J, BELLWOOD D R. Wave-induced water motion and the functional implications for coral reef fish assemblages. *Limnology and Oceanography*, 2005, 50(1): 255–264
- HUANG X P, JIANG Z J, ZHANG J P, *et al.* The Chinese nomenclature of the global seagrasses. *Acta Oceanologica Sinica*, 2018, 40(4): 127–133 [黄小平, 江志坚, 张景平等. 全球海草的中文命名. *海洋学报*, 2018, 40(4): 127–133]
- INOUE Y, TERADA R, BELLEZA D F C, *et al.* Effect of water velocity on the physiology of a collapsing *Sargassum siliquastrum* canopy under a controlled environment. *Phycological Research*, 2020, 68(4): 313–322
- JORDAN T L. Acclimation of two marine macrophytes (*Saccharina latissima* and *Zostera marina*) to water flow. Master's Thesis of University of Maryland, 2008
- KOCH E W. Preliminary evidence on the interdependent effect of currents and porewater geochemistry on *Thalassia testudinum* Banks ex König seedlings. *Aquatic Botany*, 1999, 63(2): 95–102
- KOCH M S, SCHOPMEYER S, KYHN-HANSEN C, *et al.* Synergistic effects of high temperature and sulfide on tropical seagrass. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 341(1): 91–101
- LEWIS M A, DANTIN D D, CHANCY C A, *et al.* Florida seagrass habitat evaluation: A comparative survey for chemical quality. *Environmental Pollution*, 2007, 146 (1): 206–218
- LIU J L, CHEN X J. Research progress and hotspots of marine biodiversity: Based on bibliometrics and knowledge mapping analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 201–213 [刘金立, 陈新军. 海洋生物多样性研究进展及其热点分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 201–213]
- MASS T, GENIN A, SHAVIT U, *et al.* Flow enhances photosynthesis in marine benthic autotrophs by increasing the efflux of oxygen from the organism to the water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2527–2531
- NORDLUND L M, JACKSON E L, NAKAOKA M, *et al.* Seagrass ecosystem services – What's next? *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 134: 145–151
- PALING E I, VAN KEULEN M, WHEELER K D, *et al.* Influence of spacing on mechanically transplanted seagrass survival in a high wave energy regime. *Restoration Ecology*, 2003, 11(1): 56–61
- PARK J I, LEE K S. Development of transplantation method for the restoration of surfgrass, *Phyllospadix japonicus*, in an exposed rocky shore using an artificial underwater structure. *Ecological Engineering*, 2010, 36(4): 450–456
- PERALTA G, BRUN G, PEREZ-LLORENS J L, *et al.* Direct effects of current velocity on the growth, morphometry and architecture of seagrasses: A case study on *Zostera noltii*. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 327: 135–142
- REED D C, HOLBROOK S J, SOLOMON E, *et al.* Studies on germination and root development in the surfgrass *Phyllospadix torreyi*: Implications for habitat restoration. *Aquatic Botany*, 1998, 62(2): 71–80
- RIIS T, BIGGS B J F. Hydrologic and hydraulic control of macrophyte establishment and performance in streams. *Limnology and Oceanography*, 2003, 48(4): 1488–1497
- SCHANZ A, ASMUS H. Impact of hydrodynamics on development and morphology of intertidal seagrasses in the Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 261(8): 123–134
- SEDDON S. Going with the flow: Facilitating seagrass rehabilitation. *Ecological Management and Restoration*, 2004, 5(3): 167–176
- SHORT F T, WYLLIE-ECHEVERRIA S. Natural and human-induced disturbance of seagrasses. *Environmental Conservation*, 1996, 23(1): 17–27
- VAN KATWIJK M M, HERMUS D C R. Effects of water dynamics on *Zostera marina*: Transplantation experiments in the intertidal Dutch Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 208: 107–118
- VILLAZÁN B, BRUN G F, GONZÁLEZ-ORTIZ V, *et al.* Flow velocity and light level drive non-linear response of seagrass *Zostera noltii* to ammonium enrichment. *Marine Ecology Progress Series*, 2016, 545: 109–121
- WANG L Z, DONG B, SONG H L. Growth indexes and their difference of *Hydrilla verticillata* under change of flow velocities of simulated water flow. *Wetland Science*, 2018, 16(2): 138–143 [王立志, 董彬, 宋红丽. 模拟水流流速变化下黑藻生长指标及其差异. *湿地科学*, 2018, 16(2): 138–143]

- WANG Y H, ZHUANG Z Y, LI X L. The calculation of along shore silt discharge rates and evolution development of sands pint in the Rongcheng Bay, Shandong Peninsula. *Marine Geology and Quaternary Geology*, 2000, 20(4): 31–35 [王永红, 庄振业, 李学伦. 山东荣成湾沿岸输沙率及沙嘴的演化动态. *海洋地质与第四纪地质*, 2000, 20(4): 31–35]
- WU Y L, GAO Y P, LÜ X N, *et al.* Ecological contribution of *Ruditapes philippinarum* in the seagrass meadow of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 126–133 [吴亚林, 高亚平, 吕旭宁, 等. 桑沟湾楮岛大叶藻床区域菲律宾蛤仔的生态贡献. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 126–133]
- YANG X L, LÜ H B, HU C Y, *et al.* Spatial-temporal variations of benthic macroalgae and their responses to variations in the environment in the artificial reef zones of Laoshan Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 642–653 [杨晓龙, 吕洪斌, 胡成业, 等. 崂山湾人工礁区大型底栖海藻时空格局及对环境变化的响应. *中国水产科学*, 2018, 25(3): 642–653]
- ZHANG P D, ZHANG Y H, ZHANG H Y, *et al.* Research advances in shoot propagation theory and planting technique of seagrasses. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 181–189 [张沛东, 张彦浩, 张宏瑜, 等. 海草植株扩繁理论及其定植效应的研究进展. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 181–189]

(编辑 马璀璨)

## Survival, Growth, and Physiological Responses of Surfgrass Transplants to Different Hydrodynamic Regimes

CHENG Ran, HOU Xin, WANG Huan, ZHANG Peidong, KANG Bin, LI Wentao<sup>①</sup>

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

**Abstract** Surfgrass *Phyllospadix iwatensis* belongs to the family Zosteraceae. Similar to most seagrass species, surfgrass beds has declined in the past decades. Unlike most of the seagrasses that colonize soft substrates (e.g., sand or mud), surfgrass grows predominantly on rocky substrates and can survive in high-energy environments. Therefore, the widely used transplanting methods for seagrasses growing in sandy or muddy sediments cannot be used in surfgrass transplantation. To explore the feasibility of restoring degraded surfgrass beds through transplantation, a transplanting unit was designed specifically for surfgrass, and a transplanting experiment was carried out from April 2019 to August 2020 at three sites with different hydrodynamic regimes (high, middle, and low levels) in the coastal area of Mashanli in Rongcheng, Shandong Province. After transplantation, transplant survival and morphological and physiological characteristics were examined bimonthly. The results showed that at 16 months after transplantation, the survival rates of the surfgrass transplants were 63.7%, 61.0%, and 60.0% under the high, middle, and low hydrodynamic regimes, respectively, but these differences were not significant. The plant size (shoot height, leaf width, rhizome diameter, etc.), photosynthetic pigment content (chlorophyll *a*, total chlorophyll and carotenoids), and soluble sugar and starch content were all highest under high hydrodynamic regimes, and significant temporal variations were observed in these measurements. The results suggest that a higher survival rate can be achieved in all the three hydrodynamic regimes by using the transplanting method, and the area of the high hydrodynamic regime is more suitable for the growth of surfgrass transplants. The results of this experiment confirmed the feasibility of restoring degraded surfgrass beds at any of the three hydrodynamic regimes in the Mashanli area using the transplanting system and methods applied in this study.

**Key words** Surfgrass *Phyllospadix iwatensis*; Hydrodynamic regimes; Survival; Growth

① Corresponding author: LI Wentao, E-mail: liwentao@ouc.edu.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201229001

http://www.yykxjz.cn/

乔玲, 常志强, 李健, 任成喆. 基于形态学和高通量测序的海水池塘生态养殖系统中浮游植物多样性比较. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 32–43  
QIAO L, CHANG Z Q, LI J, REN C Z. Comparison of phytoplankton community diversity in the ecological aquaculture system of a marine pond using morphological analysis and high-throughput sequencing. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 32–43

# 基于形态学和高通量测序的海水池塘生态 养殖系统中浮游植物多样性比较\*



乔玲<sup>1</sup> 常志强<sup>2</sup> 李健<sup>2①</sup> 任成喆<sup>3</sup>

1. 浙江省海洋水产研究所 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室 浙江 舟山 316021;
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. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 浙江 舟山 316022)

**摘要** 利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术,对 2018 年 12 月海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落组成及多样性进行研究,结果显示,2 种方法共鉴定浮游植物 8 个门,绿藻门(Chlorophyta)和隐藻门(Cryptophyta)为主要优势类群。共鉴定浮游植物 39 个属,仅有 5 个属,包括裸藻属(*Eutreptiella*)、颤藻属(*Oscillatoria*)、拟菱形藻属(*Pseudonitzschia*)、塔胞藻属(*Pyramimonas*)和全沟藻属(*Teleaulax*)为 2 种方法的共有鉴定结果。一些微微型( $\leq 2 \mu\text{m}$ )和较小的微型浮游植物( $>2 \mu\text{m}$  且  $\leq 10 \mu\text{m}$ )仅在高通量测序结果中发现,其中,微微型浮游植物占总浮游植物序列丰度的 25.24%,较小的微型浮游植物占 60.42%。形态学方法调查的浮游植物多样性指数低于高通量测序方法。因此,利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术,更能全面、准确地了解养殖生态系统中浮游植物群落结构及多样性。

**关键词** 生态养殖; 浮游植物; 多样性; 形态学分析; 高通量测序

**中图分类号** S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0032-12

海水池塘养殖历来是我国沿海水产养殖的主要方式,主要以养殖虾、蟹等甲壳类为主。2019 年全国海水池塘养殖面积为 376 091  $\text{hm}^2$ , 约占海水养殖总面积的 18%左右,海水池塘养殖产量为 250.35 万 t, 约占总产量的 12%以上(中国渔业统计年鉴, 2020)。传统池塘养殖易受气候条件、环境变化和病害等因素的影响。近年来,传统海水池塘养殖面临底质老化和

水域环境恶化等突出问题,导致养殖容纳量下降,多种病害频繁暴发。与此同时,池塘养殖尾水排放对周边水域生态环境造成的压力日益凸显,严重威胁产业的稳定和可持续发展(王武, 2009)。随着国家对生态环境的重视程度越来越高,未来的水产养殖要着眼于可持续发展,在提高产量的同时要保证质量,又要注意环境保护,研究和开发“高效、生态、安全”的健康

\* 国家重点研发计划课题(2018YFD0900702-4)、国家自然科学基金资助项目(31873039)、浙江省海洋水产研究所博士启动基金项目(2020B01)和浙江海洋大学博士启动基金项目(11034150220004)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900702-4), National Natural Science Foundation of China (31873039), Start-up Foundation for Doctors of Zhejiang Marine Fisheries Research Institute (2020B01), and Start-up Foundation for Doctors of Zhejiang Ocean University (11034150220004)]. 乔玲, E-mail: qiaoling1990123@126.com

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

收稿日期: 2020-12-29, 收修改稿日期: 2021-02-02

养殖技术和模式已成为国内外渔业生产的重要发展方向。

海水池塘生态养殖模式是一种新兴的养殖理念(马雪健等, 2016), 通过基础食物网的建立, 利用不同营养级生物的生活习性, 使系统中投饵性养殖单元(如鱼、虾类)产生的残饵、粪便、营养盐等有机或无机物质成为其他类型养殖单元(如滤食性贝类)的食物或营养物质来源, 将系统内多余的营养物质转化到养殖生物体内, 达到系统内营养物质的高效循环利用, 在减轻养殖对环境压力的同时, 提高养殖种类的多样性和经济效益(Chopin *et al.*, 2008; Troell *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2020)。该养殖模式已经在世界多个国家, 如中国、加拿大、智利、南非、挪威、以色列等广泛实践, 并取得了诸多积极效果。

浮游植物是养殖生态系统的重要组成部分, 不仅可以通过光合作用利用环境中的氮、磷等营养物质, 起到调控水质的作用(Harrison *et al.*, 2005), 还可以作为养殖生物的直接或间接饵料(Pulz *et al.*, 2004)。研究发现, 以绿藻和硅藻为优势种的养殖池水质相对稳定, 养殖生物生长较好, 而以蓝藻为优势种的养殖池中, 养殖生物生长缓慢且易发生病害(苏永金等, 1994)。绿藻和硅藻不仅对养殖水体有重要的调节作用, 而且含有丰富的蛋白质、碳水化合物、维生素等重要营养成分, 可满足养殖生物的营养需求(张继红等, 2016); 而蓝藻, 如在养殖后期占优势的颤藻(*Oscillatoria*)、微囊藻(*Microcystis*), 在富营养化水体中能迅速生长繁殖, 释放大量的羟胺、硫化物等物质, 致使水体散发腥臭味, 有些藻可分泌毒素, 危害养殖生物健康生长(Paerl *et al.*, 1995)。目前, 针对原位监测水体中浮游植物的研究更多集中在利用传统镜检鉴定方法(Soares *et al.*, 2011; 常孟阳等, 2019; 潘玉龙等, 2019)。镜检鉴定方法主要基于细胞形态对浮游植物进行鉴定分类, 不仅费时耗力, 且容易遗漏个体较小或丰度较低的物种(Manoylov, 2014), 不能全面、准确地评价水生生态系统中浮游植物群落结构及多样性。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 高通量测序技术被广泛应用于浮游植物群落结构和多样性研究(Penna *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018)。与形态学方法相比, 高通量测序技术省时省力、灵敏度高、检出限低(Reuter *et al.*, 2015), 可检测到丰度低、个体小的物种, 甚至可能会发现新物种(de Vargas *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2018)。但高通量测序不能对浮游植物进行绝对定量, 且可能会高估某些物种的相对丰度, 因此, 仅利用高通量测序评价浮游植物群落结构也是不准确的(Quince *et al.*, 2009)。

本研究利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术调查养殖末期虾-蟹-鱼混养池塘和贝养殖池中浮游植物群落组成和多样性, 比较分析 2 种检测方法获得的结果, 探讨基于形态学和高通量测序检获的浮游植物群落组成和多样性的异同, 为更全面、准确研究浮游植物群落结构及多样性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

样品于 2018 年 12 月采自山东省日照开航水产有限公司。该海水池塘生态养殖系统由虾-蟹-鱼混养池塘和贝养殖池组成, 混养池塘中混养品种分别为中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*), 贝养殖池中养殖品种为文蛤(*Meretrix meretrix*)。用 YSI 手持式多参数水质分析仪(YSI Incorporated, 美国)现场测定水温、盐度、溶解氧和 pH; 取 1 L 水样, 加入 5 mL 鲁格试剂固定后用于浮游植物形态学鉴定与计数; 取 100 mL 水样经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 滤膜用于高通量测序分析浮游植物群落组成, 滤液用于氨氮( $\text{NH}_4^+$ )、硝态氮( $\text{NO}_3^-$ )、亚硝态氮( $\text{NO}_2^-$ )、磷酸盐(DIP)、硅酸盐(DSi)、总溶解氮(DTN)和总溶解磷(DTP)浓度的测定。

### 1.2 水质参数测定

养殖水体中  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、DIP 和 DSi 浓度采用 QuAAtro 营养盐自动分析仪(Seal Analytical Ltd., 德国)测定; 先用碱性过硫酸盐消化, 用营养盐自动分析仪测定 DTN 和 DTP 浓度; 溶解无机氮(DIN)浓度为  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  浓度之和; 溶解有机氮(DON)和溶解有机磷(DOP)浓度分别为 DTN 与 DIN 和 DTP 与 DIP 浓度之差。

### 1.3 浮游植物形态学分析

采集 1 L 未过滤水样, 加 5 mL 鲁格试剂固定, 样品带回实验室后, 浓缩至 50 mL, 然后用光学显微镜进行物种鉴定和计数。

### 1.4 浮游植物高通量测序和生物信息分析

采用土壤 DNA 提取试剂盒(MP Biomedicals, 美国)提取样品总 DNA。用 23S rDNA 引物 p23SrV\_f1 (5'-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA-3')和 p23SrV\_r1 (5'-TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG-3') (Sherwood *et al.*, 2007)对样品 DNA 进行 PCR 扩增, 反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用 PCR 产物纯化试剂盒(Axygen Biosciences, 美国)纯化上述所得的 PCR

产物,利用 QuantiFluor™-ST (Promega, 美国)进行定量检测,纯化后的 PCR 产物送美吉测序公司采用 Illumina MiSeq 平台进行 PE300 测序。本研究测序得到的 23S rDNA 基因核酸序列已上传至美国国立生物技术信息中心(NCBI)高通量测序数据库 Sequence Read Archive (SRA), 登录号为 SRP185765。

下机后的数据用软件 QIIME (V1.70)处理。使用 Trimmomatic 软件对原始数据进行质量控制,并用 FLASH 软件进行拼接,使用 UPARSE 软件(V7.1 <http://drive5.com/uparse/>)以 99%的相似度对序列进行 OTU 聚类,并用 UCHIME 软件去除嵌合体,利用 BLAST 在 NCBI 数据库对每条序列进行物种分类注释。保留所有注释到真核浮游藻类和蓝藻的序列,用于后续浮游植物群落组成分析。

### 1.5 浮游植物群落分析

浮游植物在门水平和属水平上的相对丰度以该类别的细胞密度或序列数占总细胞密度或总序列数

的比例来表征;浮游植物群落结构多样性则是用香农-威纳多样性指数来衡量。本研究中,浮游植物按粒径大小分为微微型浮游植物( $\leq 2 \mu\text{m}$ )、较小的微型浮游植物( $> 2 \mu\text{m}$  且  $\leq 10 \mu\text{m}$ )、较大的微型浮游植物( $> 10 \mu\text{m}$  且  $\leq 20 \mu\text{m}$ )和小型浮游植物( $> 20 \mu\text{m}$  且  $< 200 \mu\text{m}$ )。

## 2 结果

### 2.1 水质分析

海水池塘生态养殖系统的水质参数见表 1。该海水池塘生态养殖系统中的平均水温、盐度、pH 分别为 4.87℃、26.01 g/L 和 9.03; 虾-蟹-鱼混养池塘中的溶解氧浓度高于贝养殖池,分别为 10.29 mg/L 和 9.08 mg/L。混养池塘中的  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  浓度均低于贝养殖池,而 DON 浓度则是混养池塘中的高;混养池塘和贝养殖池中的 DIP 浓度均为 0.02 mg/L, DOP 浓度分别为 0.02 mg/L 和 0.03 mg/L; 混养池塘中 DSi 浓度低于贝养殖池,分别为 0.55 mg/L 和 0.95 mg/L。

表 1 海水池塘生态养殖系统中的水质参数

Tab.1 Quality parameters of water in the ecological aquaculture system in marine pond

池塘 Pond	温度 t/°C	盐度 S	溶解氧 DO /(mg/L)	pH	$\text{NH}_4^+$ /(mg/L)	$\text{NO}_3^-$ /(mg/L)	$\text{NO}_2^-$ /(mg/L)	DIN /(mg/L)	DON /(mg/L)	DIP /(mg/L)	DOP /(mg/L)	DSi /(mg/L)
混养 Polyculture	5.53	26.04	10.29	9.08	0.06	0.06	0.001	0.12	0.46	0.02	0.02	0.55
贝养 Bivalves	4.20	25.98	9.08	8.98	0.07	0.20	0.008	0.28	0.39	0.02	0.03	0.95
平均 Mean	4.87	26.01	9.69	9.03	0.07	0.13	0.004	0.20	0.43	0.02	0.03	0.75

### 2.2 高通量测序结果分析

对虾-蟹-鱼混养池塘和贝养殖池中浮游生物的 23S rDNA 进行 Illumina 高通量测序,分别获得 71 097 和 70 324 条原始序列,通过质量控制分别得到 64 298 和 60 599 条高质量序列,平均序列长度为 388 bp,在 99%相似性水平上划分 OTU,共得到 283 个 OTU (表 2)。利用 BLAST 在 NCBI 数据库对每个 OTU 的代表序列进行物种分类注释,注释到真核生物和细菌的序列数分别占总序列数的 54%和 43%。在门水平

上,变形菌门(Proteobacteria)和隐藻门(Cryptophyta)的相对丰度最高,分别为 38.33%和 33.33%,其次为绿藻门(Chlorophyta, 11.12%)、硅藻门(Bacillariophyta, 7.99%)和疣微菌门(Verrucomicrobia, 2.85%),其余门的相对丰度均低于 1% (图 1)。保留所有注释到真核浮游藻类和蓝藻的序列,共得到 72 个 OTU、66 300 条序列,混养池塘和贝养殖池中 OTU 数分别为 51 和 37,序列数分别为 41 247 和 25 053,混养池塘高于贝养殖池(表 2)。

表 2 不同池塘样品中序列数和 OTU 数

Tab.2 Number of sequences and OTUs from different ponds

池塘 Pond	原始序列数 Original sequences	质控后序列数 Sequences after quality control	总 OTU 数 Total OTUs	浮游植物序列数 Sequences of phytoplankton	浮游植物 OTU 数 OTUs of phytoplankton
混养 Polyculture	71 097	64 298	162	41 247	51
贝养 Bivalves	70 324	60 599	196	25 053	37
总计 Total	141 421	124 897	283	66 300	72

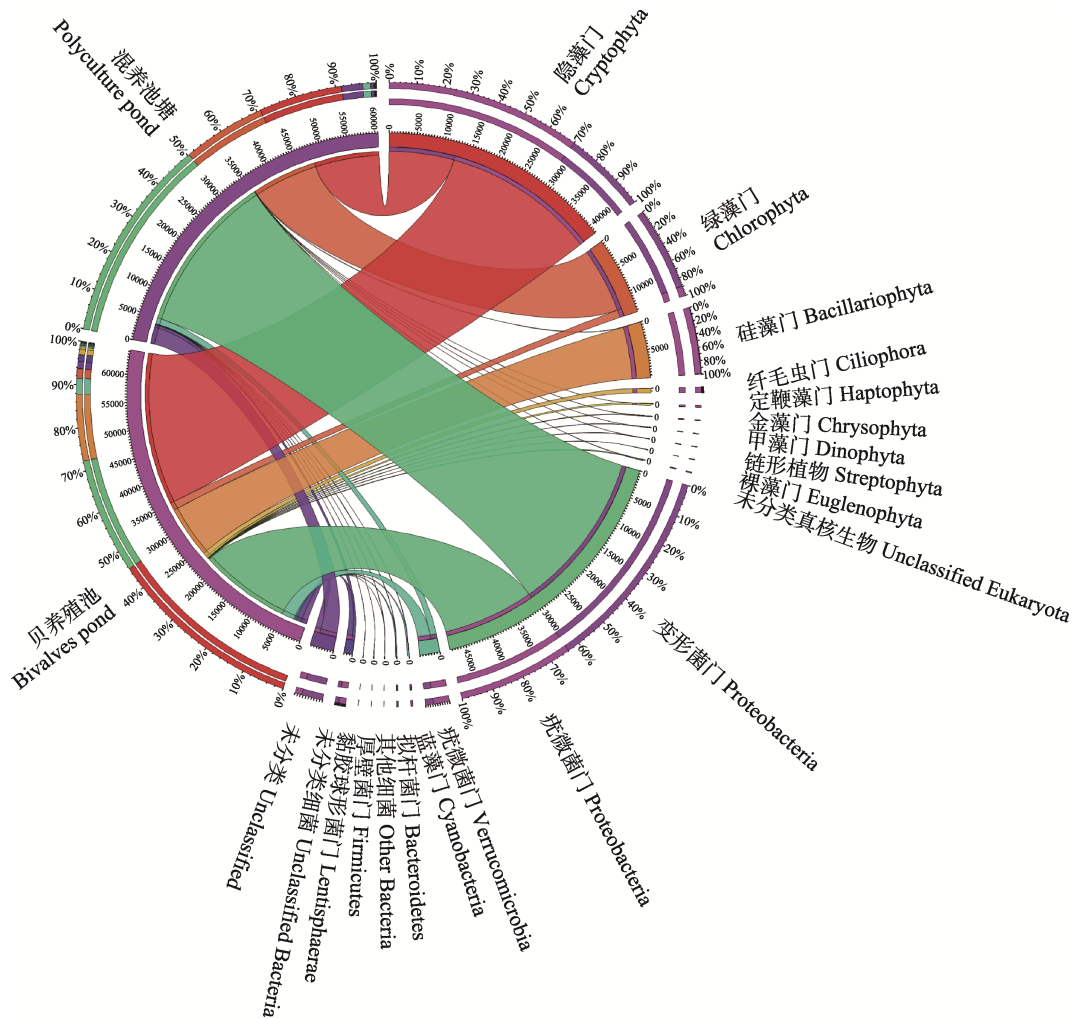


图 1 海水池塘生态养殖系统中真核生物和细菌组成

Fig.1 Composition of eukaryotes and bacteria in the ecological aquaculture system in marine pond

### 2.3 浮游植物多样性分析

利用形态学方法和高通量测序技术分析虾-蟹-鱼混养池和贝养殖池中浮游植物多样性发现,混养池塘中浮游植物多样性指数低于贝养殖池,且形态学方法调查的浮游植物多样性指数低于高通量测序方法(图 2)。

### 2.4 浮游植物群落结构

门水平上,利用形态学鉴定方法共鉴定浮游植物 6 个门,分别为隐藻门、绿藻门、硅藻门、蓝藻门(Cyanophyta)、甲藻门(Dinophyta)和裸藻门(Euglenophyta),其中,绿藻门平均相对丰度最高,达 90%以上。虾-蟹-鱼混养池和贝养殖池中绿藻门的细胞密度分别为  $1.03 \times 10^7$  cells/L 和  $3.51 \times 10^5$  cells/L,分别占总细胞密度的 99.85%和 91.05%。利用高通量测序技术共鉴定浮游植物 8 个门,除形态学方法鉴定出的 6 个门,还包括定鞭藻门(Haptophyta)和金藻门(Chrysophyta),8 个门中,隐藻门的平均相对丰度最高,

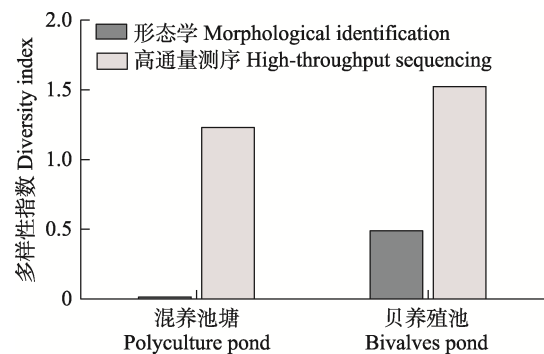


图 2 海水池塘生态养殖系统中浮游植物多样性

Fig.2 Phytoplankton diversity in the ecological aquaculture system in marine pond

为 60.11%,其次为绿藻门(26.64%)和硅藻门(12.20%)。混养池中,隐藻门的相对丰度最高(70.57%),其次为硅藻门(24.10%)和绿藻门(3.59%);贝养殖池中,绿藻门和隐藻门的相对丰度较高,分别为 49.68%和 49.64%(图 3)。





图 3 海水池塘生态养殖系统中浮游植物在门水平和属水平上的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of phytoplankton at the phylum and genus levels in the ecological aquaculture system in marine pond

属水平上,利用形态学鉴定方法共鉴定浮游植物 14 个属,其中,塔胞藻属的平均相对丰度最高,虾-蟹-鱼混养池塘和贝养殖池中的相对丰度分别为 99.85%和 91.05%。利用高通量测序技术共鉴定浮游植物 30 个属,其中,全沟藻属(*Teleaulax*)的平均相对丰度最高(58.31%),其次为微球藻属(*Ostreococcus*) (17.62%)、辐环藻属(*Actinocyclus*) (7.87%)、微胞藻属(*Micromonas*) (7.25%)、海链藻属(*Thalassiosira*) (3.40%)、蛋白藻属(*Proteomonas*) (1.78%)和 *Pseudoscurfieldia* (1.62%),其余属的相对密度均低于 1%。混养池塘中全沟藻属的相对丰度最高

(68.81%),其次为辐环藻属(15.69%)和海链藻属(6.79%);贝养殖池中,全沟藻属的相对丰度最高,为 47.81%,其次为微球藻属(35.23%)和微胞藻属(14.35%) (图 3)。

种水平上,利用形态学鉴定方法共鉴定浮游植物 16 种(表 3),混养池塘中塔胞藻的细胞密度最高,为  $1.03 \times 10^7$  cells/L,其次是裸甲藻,达  $8.00 \times 10^3$  cells/L;贝养殖池中也是塔胞藻细胞密度最高,细胞密度为  $3.51 \times 10^5$  cells/L,其次是尖尾蓝隐藻和菱形藻,细胞密度分别为  $9.00 \times 10^3$  cells/L 和  $8.00 \times 10^3$  cells/L。对比发现,混养池中浮游植物种数低于贝养殖池。

表 3 形态学鉴定方法揭示的浮游植物及其细胞密度  
Tab.3 Phytoplankton cell density revealed by morphological analysis

门 Phylum	种 Species	细胞密度 Cell density/(cells/L)	
		混养 Polyculture	贝养 Bivalves
硅藻门 Bacillariophyta	新月细柱藻 <i>Cylindrotheca closterium</i>	0	$5.50 \times 10^3$
	舟形藻 <i>Navicula</i> sp.	0	$1.50 \times 10^3$
	菱形藻 <i>Nitzschia</i> sp.	$2.00 \times 10^3$	$8.00 \times 10^3$
	尖刺拟菱形藻 <i>Pseudonitzschia pungens</i>	0	$1.00 \times 10^3$
	斜纹藻 <i>Pleurosigma</i> sp.	0	$5.00 \times 10^2$
	双眉藻 <i>Amphora</i> sp.	0	$1.00 \times 10^3$
	丹麦细柱藻 <i>Leptocylindrus danicus</i>	$1.00 \times 10^3$	$1.50 \times 10^3$
	端尖斜纹藻 <i>Pleurosigma acutum</i>	$1.00 \times 10^3$	0
甲藻门 Dinophyta	裸甲藻 <i>Gymnodinium</i> spp.	$5.50 \times 10^3$	$5.00 \times 10^2$
	简单裸甲藻 <i>Gymnodinium simplex</i>	$2.50 \times 10^3$	0
蓝藻门 Cyanophyta	颤藻 <i>Oscillatoria</i> sp.	0	$1.50 \times 10^3$
绿藻门 Chlorophyta	塔胞藻 <i>Pyramimonas</i> sp.	$1.03 \times 10^7$	$3.51 \times 10^5$
隐藻门 Cryptophyta	尖尾蓝隐藻 <i>Chroomonas acuta</i>	0	$9.00 \times 10^3$
	隐藻 <i>Cryptomonas</i> sp.	0	$1.00 \times 10^3$
	全沟藻 <i>Teleaulax</i> sp.	$2.50 \times 10^3$	$5.00 \times 10^2$
裸藻门 Euglenophyta	异双鞭裸藻 <i>Eutreptiella</i> sp.	$5.00 \times 10^2$	$3.00 \times 10^3$
总计 Total		$1.03 \times 10^7$	$3.86 \times 10^5$

### 3 讨论

池塘养殖是我国传统的养殖模式,在我国水产养殖发展中占据举足轻重的地位。近年来,传统海水池塘养殖面临着底质老化和水域环境恶化等突出问题,导致养殖容纳量下降,多种病害频繁暴发,养殖尾水的排出还可能加剧周边区域的水体富营养化,严重制约着海水池塘养殖产业的可持续发展(王武, 2009)。随着国家对生态环境的重视程度越来越高,海水池塘生态养殖模式因环境友好、生态高效的特点得到了迅速发展(马雪健等, 2016)。浮游植物是养殖生态系统中

的重要组成部分,一些浮游植物,如硅藻和绿藻,营养价值高且无毒害作用,对养殖是有益的(Roy *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2016);一些浮游植物,如蓝藻和甲藻,营养价值低且可能会产生毒素,不利于养殖生物的生长(Sinden *et al.*, 2016; Pérez-Morales *et al.*, 2017)。因此,了解浮游植物群落,对如何构建经济、安全、有效的生态养殖模式有重要的科学依据和现实意义。

本研究中,利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术研究了海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落结构,共鉴定浮游植物 8 个门,形态学鉴定结果中,绿藻门的平均相对丰度最高,达 90%以上,而高通量

测序结果中,绿藻门和隐藻门的相对丰度较高;8个门中有2个门(定鞭藻门和金藻门)仅在高通量测序结果中出现,镜检并未检测到(图3)。属水平上,2种方法共鉴定浮游植物39个属,仅有5个属是2种方法鉴定结果中共有的,包括裸藻属(*Eutreptiella*)、颤藻属(*Oscillatoria*)、拟菱形藻属(*Pseudonitzschia*)、塔胞藻属(*Pyramimonas*)和全沟藻属(*Teleaulax*)(图3)。此外,形态学方法调查的浮游植物多样性指数低于高通量测序方法(图2)。

形态学鉴定结果和高通量测序结果产生差异的原因包括以下几个方面。首先,形态学鉴定方法主要基于细胞形态对浮游植物进行鉴定分类,对一些形态相似、细胞较小或丰度较低的类群,该方法难以识别和鉴定(Manoylov, 2014)。而高通量测序技术检测速度快、检出限低,可以极大地扩展对水生生态系统中浮游植物多样性的认识(Reuter *et al.*, 2015)。本研究中,利用高通量测序检测到一些微微型和较小的微型浮游植物,但在显微镜鉴定结果中并未出现(表4),其中,微微型浮游植物占总浮游植物序列丰度的25.24%,较小的微型浮游植物占总浮游植物序列丰度的60.42%。其次,高通量测序不能对物种进行绝对定量,利用物种的相对丰度对物种进行定量分析可能会高估其丰度,一方面,浮游植物基因组的rDNA序列包含大量重复序列(Schippers *et al.*, 2006),基因拷贝数的变化可能会影响物种的相对丰度(Reeder *et al.*, 2010);另一方面,通过高通量测序还可以检测到某些类群的休眠细胞、死亡细胞或分子碎片,从而高估其相对丰度。第三,23S rDNA的数据库不完整,分类信息并不能覆盖所有物种,通过核苷酸搜索发现,该数据库中缺少双眉藻属(*Amphora*)等的23S rDNA序列,因此,需要进一步完善23S rDNA参考数据库,提高其物种分类信息的覆盖率。综上所述,利用传统的形态学鉴定方法结合分子生物学技术更能全面地揭示养殖系统中浮游植物群落组成和多样性。

利用形态学鉴定方法调查海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落组成及多样性发现,塔胞藻为绝对优势种,其在虾-蟹-鱼混养池和贝养殖池中的细胞密度分别为 $1.03 \times 10^7$  cells/L和 $3.51 \times 10^5$  cells/L,分别占总细胞密度的99.85%和91.05%(图3)。塔胞藻属于绿藻门,易培养,温度耐受性好,且细胞内含有丰富的蛋白质、多糖和不饱和脂肪酸等营养物质(张福绥等, 1983; 缪锦来等, 2005),被广泛应用于双壳类的养殖及养虾前期培样中(张福绥等, 1984; 王廷贵, 2011)。研究表明,塔胞藻对贻贝(*Mytilus edulis*)幼虫、

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)幼虫和栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)幼虫的饲养效果比常用的褐指藻、扁藻及小球藻等的效果要好(张福绥等, 1983)。本研究中,贝养殖池中塔胞藻的细胞密度比虾-蟹-鱼混养池中低了2个数量级,可能与文蛤对塔胞藻摄食有关。此外,塔胞藻对海水中的苯、苯酚、二甲苯等有机物及敌敌畏、氧化乐果、辛硫磷等常见农药具有较强的吸附作用,对有机物和农药造成的污染有一定的净化作用,且藻细胞密度达到 $1.0 \times 10^4$  cells/mL时,净化效果最显著(张建民等, 2006、2007)。塔胞藻还含有抗植物病原菌成分,抑菌效果非常明显(江红霞等, 2008、2009)。

利用高通量测序技术调查海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落组成及多样性发现,双尖全沟藻(*Teleaulax amphioxeia*)的平均相对丰度最高,为52.30%(表4)。双尖全沟藻属于隐藻门,广泛分布于许多国家的沿海地区(Yoo *et al.*, 2017)。研究发现,双尖全沟藻可以以完整细胞形式在红色中缢虫(*Mesodinium rubrum*)(赤潮种)体内进行内共生,红色中缢虫一方面帮助隐藻从环境中吸收营养物质供隐藻细胞增殖所用,另一方面又从隐藻的光合产物中获益,而鳍藻(*Dinophysis*)又通过摄食红色中缢虫而获得隐藻的叶绿体(Kim *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2016)。因此,双尖全沟藻在海洋食物网中占有重要地位。微球藻属和微胞藻属是通过高通量测序检测到的2种微微型绿藻,分别占总浮游植物序列丰度的17.62%和7.25%(图3)。研究发现,它们广泛分布在世界各地的沿海地区(Foulon *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010; Kiliyas *et al.*, 2014; Rashid *et al.*, 2018),微球藻属甚至会形成短暂的藻华(O'Kelly *et al.*, 2003),但在以往对黄海海域的浮游植物调查中并未发现该藻(黄备等, 2018)。这可能是因为微球藻属和微胞藻属的细胞均 $< 3 \mu\text{m}$ ,利用光学显微镜难以辨别。因此,仅利用形态学鉴定方法并不能全面、准确地评价水生生态系统中浮游植物群落结构及多样性。

水产养殖的关键环境问题之一是营养物质的积累,这会导致水质恶化和有害藻的繁殖(Huang *et al.*, 2016)。研究表明,海水池塘生态养殖模式不仅比传统的单种养殖具有更高的营养物质利用效率,而且可以提高水产养殖的产量(Li *et al.*, 2019),但池塘养殖的经济效益和生态影响很大程度上取决于养殖品种的组成(Jena *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2007)。本研究中,虾-蟹-鱼混养池塘中的混养品种为中国对虾、三疣梭子蟹和罗非鱼,贝养殖池中养殖品种为文蛤。罗非鱼是一种滤食杂食性鱼类,其选择性摄食对浮游植

表 4 高通量测序技术揭示的微型浮游植物和较小的微型浮游植物  
 Tab.4 List of described picophytoplankton and small nanophytoplankton species revealed by high-throughput sequencing

门 Phylum	属 Genus	相似物种 Similar species	NCBI 序列号(相似度) NCBI No. (Similarity)	相对丰度 Relative abundance/%	细胞大小 Cell size /μm	参考文献 Reference
微型浮游植物(最小细胞 ≤ 2 μm)	Picophytoplankton (smallest cell ≤ 2 μm)					
绿藻门 Chlorophyta	微胞藻属 <i>Micromonas</i>	细小微胞藻 <i>M. pusilla</i>	FN563097.1 (100.00%)	7.25	1.0~3.0	Vaulot <i>et al.</i> , 2010
	微球藻属 <i>Ostreococcus</i>	绿色鞭毛藻 <i>O. lucimarinus</i>	MT117949.1 (98.19%)	17.62	1.0	Subirana <i>et al.</i> , 2013
蓝藻门 Cyanophyta	蓝菌属 <i>Cyanobium</i>	双色藻 <i>Cyanobium</i> sp.	LT578417.1 (97.94%)	0.01	0.8~1.4	Rippka <i>et al.</i> , 2015
	聚球藻属 <i>Synechococcus</i>	聚球藻 <i>Synechococcus</i> sp.	CP039373.1 (100.00%)	0.34	0.6~2.1	Herdman <i>et al.</i> , 2001
金藻门 Chrysophyta	微球藻属 <i>Nannochloropsis</i>	眼点拟微球藻 <i>N. oculata</i>	KJ410684.1 (99.74%)	0.02	2~4	Droop, 1955
较小微型浮游植物(最小细胞 ≤ 10 μm)	Small nanoplankton (smallest cell ≤ 10 μm)					
硅藻门 Bacillariophyta	小环藻属 <i>Cyclotella</i>	小环藻 <i>Cyclotella</i> sp.	KJ958481.1 (98.97%)	0.14	3.5~67	Tomas, 1997
	海链藻属 <i>Thalassiosira</i>	大洋海链藻 <i>T. oceanica</i>	GU323224.1 (99.48%)	0.10	3~12	Tomas, 1997
	海链藻属 <i>Thalassiosira</i>	假微型海链藻 <i>T. pseudonana</i>	EF067921.1 (98.97%)	3.30	2.3~5.5	Vaulot <i>et al.</i> , 2010
	骨条藻属 <i>Skeletonema</i>	拟中肋骨条藻 <i>S. pseudocostatum</i>	MK372941.1 (100.00%)	0.30	2~4	Medlin <i>et al.</i> , 2010
	井字藻属 <i>Eunotogramma</i>	井字藻 <i>Eunotogramma</i> sp.	MG755797.1 (98.20%)	0.17	(6~50)×(2~6.4)	Amspoker, 2016
绿藻门 Chlorophyta	<i>Pseudosourfieldia</i>	<i>P. marina</i>	L42852.1 (99.74%)	1.62	3.2~5	Moesstrup <i>et al.</i> , 1988
	肾藻属 <i>Nephroselmis</i>	肾藻 <i>N. olivacea</i>	FN563086.1 (88.72%)	0.01	(7~13)×(6~10)	Moesstrup <i>et al.</i> , 1979
	塔胞藻属 <i>Pyramimonas</i>	<i>P. disomata</i>	FN563101.1 (98.46%)	0.13	(6.6~9.9)×(4.4~6.6)	Sym <i>et al.</i> , 1995
甲藻门 Dinophyta	小球藻属 <i>Chlorella</i>	索罗金小球藻 <i>C. sorokiniana</i>	KM241869.1 (74.89%)	0.004	2.1~5.6	Qiao <i>et al.</i> , 2009
	卡尔藻属 <i>Karlodinium</i>	剧毒卡尔藻 <i>K. veneficum</i>	JN039300.1 (98.96%)	0.05	(9~18)×(7~14)	Bergholtz <i>et al.</i> , 2010
金藻门 Chrysophyta	棕鞭藻属 <i>Ochromonas</i>	丹麦棕鞭藻 <i>O. danica</i>	KM590767.1 (86.63%)	0.01	(8~15)×(5~12)	Slankis <i>et al.</i> , 2008
	伪柄钟藻属 <i>Pseudopedinella</i>	弹性假柄钟藻 <i>P. elastica</i>	NC_044408.1 (99.74%)	0.11	8	Heimann <i>et al.</i> , 1989
隐藻门 Cryptophyta	全沟藻属 <i>Teleaulax</i>	双尖全沟藻 <i>T. amphioxeia</i>	KP899713.1 (100.00%)	52.30	5.6	Yoo <i>et al.</i> , 2017
	半片藻属 <i>Hemiselmis</i>	半片藻 <i>Hemiselmis</i> sp.	KP142649.1 (99.73%)	0.02	4~8.5	Tomas, 1997
	蛋白藻属 <i>Proteomonas</i>	沟状蛋白藻 <i>P. sulcata</i>	MG646438.1 (99.23%)	1.78	6~15	Tomas, 1997
定鞭藻门 Haptophyta	金色藻属 <i>Chrysochromulina</i>	小金色藻 <i>C. parva</i>	MG520331.1 (98.71%)	0.38	(3~7.5)×(3~7.5)×(2~4)	魏印心, 1996

物的丰度及组成有很大影响(Menezes *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011)。研究表明, 罗非鱼的摄食选择性随体重的增加而略有变化(Abdel-Tawwab, 2011), 罗非鱼在整个生长过程中均可摄食蓝藻和裸藻类, 体重较大的鱼对绿藻和硅藻的选择性较弱, 这个可能是混养池塘中绿藻和硅藻相对丰度较高的原因之一(图 3)。贝类的生长对温度和饵料的变化具有很强的适应性, 是池塘生态养殖模式中的常见物种(Troell *et al.*, 2009)。滤食性贝类具有很发达的滤水系统, 可以通过生物过滤作用摄食水体中的微藻及颗粒有机物, 从而对浮游植物丰度产生影响。本研究中, 贝养殖池中浮游植物总密度为  $3.86 \times 10^5$  cells/L(表 3), 比混养池低 2 个数量级, 这可能与贝类摄食有关。研究表明, 贝类对浮游植物的摄食也具有选择性, 从而影响浮游植物群落结构(Newell, 2004)。本研究中, 贝养殖池中微微型浮游植物如微球藻属和微胞藻属的序列丰度较高, 占总浮游植物序列丰度的 35.23% 和 14.25% (图 3)。研究发现, 与个体较小的微微型浮游植物( $< 2 \mu\text{m}$ )相比, 微型浮游植物( $2 \sim 20 \mu\text{m}$ )更容易被摄食(Newell, 2004), 从而有利于微微型浮游植物的生长繁殖(Newell *et al.*, 2009)。除了细胞大小, 取食的选择性还取决于浮游植物的游动能力(Zhuang *et al.*, 2004)。全沟藻有鞭毛, 可以自由移动(Laza-Martínez *et al.*, 2012), 从而不易被摄食, 这可能是其相对丰度较高的原因之一。

综上所述, 利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术研究海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落组成及多样性, 2 种方法共鉴定浮游植物 8 个门, 绿藻门和隐藻门为主要优势类群; 共鉴定浮游植物 39 个属, 仅有 5 个属是 2 种方法鉴定结果中共有的, 包括裸藻属、颤藻属、拟菱形藻属、塔胞藻属和全沟藻属; 一些微微型( $\leq 2 \mu\text{m}$ )和较小的微型浮游植物( $> 2 \mu\text{m}$ 且 $\leq 10 \mu\text{m}$ )仅在高通量测序结果中发现, 其中, 微型浮游植物占总浮游植物序列丰度的 25.24%, 较小的微型浮游植物占总浮游植物序列丰度的 60.42%; 形态学方法调查的浮游植物多样性指数低于高通量测序方法。因此, 利用形态学鉴定方法结合高通量测序技术, 更能全面、准确地了解养殖生态系统中浮游植物群落结构及多样性。本研究仅对该养殖系统进行了一次取样调查, 未对海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落动态进行描述。因此, 有必要进行连续监测调查, 以探索海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落的演替规律, 并阐明该演替的主要驱动因素。本研究结果为后续利用形态学结合分子手段进行海水池塘生态养殖系统中浮游植物群落演替规律及其关键驱动因素的研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- ABDEL-TAWWAB M. Natural food selectivity changes with weights of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), reared in fertilized earthen ponds. *Journal of Applied Aquaculture*, 2011, 23(1): 58–66
- AMSPOKER M C. *Eunotogramma litorale* sp. nov. a marine epipsammic diatom from Southern California, USA. *Diatom Research*, 2016, 31(4): 1–7
- BERGHOLTZ T, DAUGBJERG N, MOESTRUP Ø, *et al.* On the identity of *Karlodinium veneficum* and description of *Karlodinium armiger* sp. nov. (Dinophyceae), based on light and electron microscopy, nuclear-encoded LSU rDNA, and pigment composition. *Journal of Phycology*, 2010, 42(1): 170–193
- BRITO LO, DOS SANTOS I G S, DE ABREU JL. Effect of the addition of Bacillariophyta (*Navicula* spp.) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) on water quality and growth of the *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in a biofloc system. *Aquaculture Research*, 2016, 47(12): 3990–3997
- CHANG M Y, LI C L, DONG J, *et al.* Dynamic changes of phytoplankton composition during cyanobacteria blooms in aquaculture ponds. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 36–45 [常孟阳, 李晨露, 董静, 等. 蓝藻水华暴发期间养殖池塘浮游藻类动态变化. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 36–45]
- CHANG Z Q, NEORI A, HE Y Y, *et al.* Development and current state of seawater shrimp farming, with an emphasis on integrated multi-trophic pond aquaculture farms, in China: A review. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2544–2558
- CHOPIN T, ROBINSON S M C, TROELL M, *et al.* Multitrophic integration for sustainable marine aquaculture. *Encyclopedia of Ecology*, 2008, 2463–2475
- DE VARGAS C, AUDIC S, HENRY N, *et al.* Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 2015, 348(17): 1261605
- DROOP M R. Some new supra-littoral Protista. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1955, 34(2): 233–245
- Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Extension Station, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook*. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2020 [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, 2020]
- FOULON E, NOT F, JALABERT F, *et al.* Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: Evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environmental Microbiology*, 2010, 10(9): 2433–2443
- HARRISON W G, PERRY T, LI W K W. Ecosystem indicators of water quality Part I. Plankton biomass, primary production and nutrient demand. In Anderson R (Ed.),



- Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture. Berlin Heidelberg: Springer, 2005, 59–82
- HEIMANN K, BENTING J, TIMMERMANN S, *et al.* The flagellar developmental cycle in algae: Two types of flagellar development in uniflagellate algae. *Protoplasma*, 1989, 153(1/2): 14–23
- HERDMAN M, CASTENHOLZ R W, WATERBURY J B, *et al.* Form-genus XIII. *Synechococcus*. In: Boone DR, Castenholz RW (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer-Verlag, New York, 2001, 508–512
- HUANG B, WEI N, TANG J L, *et al.* Changes of phytoplankton community structure and diversity in the south Yellow Sea during 2007–2017. *Environmental Monitoring in China*, 2018, 34(6): 137–148 [黄备, 魏娜, 唐静亮, 等. 南黄海 2007–2017 年浮游植物群落结构及多样性变化. *中国环境监测*, 2018, 34(6): 137–148]
- HUANG S, WU M, ZANG C, *et al.* Dynamics of algae growth and nutrients in experimental enclosures culturing bighead carp and common carp: Phosphorus dynamics. *International Journal of Sediment Research*, 2016, 31(2): 173–180
- JENA JK, AYYAPPAN S, ARAVINDAKSHAN P K, *et al.* Evaluation of production performance in carp polyculture with different stocking densities and species combinations. *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18(3): 165–171
- JIANG H X, LEI H J, XUAN W J. Studies on antimicrobial activities against three plant pathogen by using eleven microalgae extracts. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 38(10): 4167–4169 [江红霞, 雷红娟, 轩文娟. 11 种微藻提取物对 3 种植物病原菌抗菌活性的研究. *安徽农业科学*, 2008, 38(10): 4167–4169]
- JIANG H X, ZHOU X Y, LEI M Y, *et al.* Antimicrobial activities and chemical compositions of liposoluble compounds in *Pyramidomonas delicatula*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2009(8): 88–91 [江红霞, 周晓杨, 雷梦云, 等. 娇柔塔胞藻脂溶性化合物抗植物病原菌活性及成分分析. *河南农业科学*, 2009(8): 88–91]
- KILIAS E S, NÖTHIG E M, WOLF C, *et al.* Picoeukaryote plankton composition off West Spitsbergen at the entrance to the Arctic Ocean. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, 61(6): 569–579
- KIM J I, YOON H S, YI G, *et al.* The plastid genome of the cryptomonad *Teleaulax amphioxeia*. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129284
- LAZA-MARTÍNEZ A, ARLUZZA J, MIGUEL I, *et al.* Morphological and molecular characterization of *Teleaulax gracilis* sp. nov. and *T. minuta* sp. nov. (Cryptophyceae). *Phycologia*, 2012, 36(1): 37–52
- LI Y, QIN J, ZHENG X, *et al.* Production performance of largemouth bass *Micropterus salmoides* and water quality variation in monoculture, polyculture and integrated culture. *Aquaculture Research*, 2019, 50(2): 423–430
- MA X J, LIU D H, HU G B, *et al.* Development of integrated multi trophic aquaculture mode and its application on management. *Ocean Development and Management*, 2016, 33(4): 74–78 [马雪健, 刘大海, 胡国斌, 等. 多营养层次综合养殖模式的发展及其管理应用研究. *海洋开发与与管理*, 2016, 33(4): 74–78]
- MANOYLOV K M. Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): Species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology*, 2014, 50(3): 409–424
- MEDLIN L K, ELWOOD H J, STICKEL S, *et al.* Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): Evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. *Journal of Phycology*, 2010, 27(4): 514–524
- MENEZES R F, ATTAYDE J L, VASCONCELOS F R. Effects of omnivorous filter-feeding fish and nutrient enrichment on the plankton community and water transparency of a tropical reservoir. *Freshwater Biology*, 2010, 55(4): 767–779
- MIAO J L, WANG B, KAN G F, *et al.* The influence of environment factors on lipid content and fatty acid composition in two species of Antarctic green microalga. *Marine Sciences*, 2005, 29(1): 4–11 [缪锦来, 王波, 阚光锋, 等. 环境因子对 2 种南极绿藻脂肪含量和脂肪酸组成的影响. *海洋科学*, 2005, 29(1): 4–11]
- MOESTRUP Ø, ETTL H. A light and electron microscopical study of *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). *Opera Botanica*, 1979, 49: 1–40
- MOESTRUP Ø, THRONDSSEN J. Light and electron microscopical studies on *Pseudoscourfieldia marina*, a primitive scaly green flagellate (Prasinophyceae) with posterior flagella. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 66(7): 1415–1434
- NEWELL R I E, TETTELBACH S T, GOBLER C J, *et al.* Relationships between reproduction in suspension-feeding hard clams *Mercenaria mercenaria* and phytoplankton community structure. *Marine Ecology Progress*, 2009, 387(12): 179–196
- NEWELL R I E. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: A review. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(1): 51–62
- O'KELLY C J, SIERACKI M E, THIER E C *et al.* A transient bloom of *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae) in west Neck Bay, Long Island, New York. *Journal of Phycology*, 2003, 39(5): 850–854
- OLIVEIRA M C, REPETTI S I, IHA C, *et al.* High-throughput sequencing for algal systematics. *European Journal of Phycology*, 2018, 53(3): 1–17
- PAERL H W, TUCKER C S. Ecology of blue-chlorophyta in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1995, 26(2): 109–131
- PAN Y L, LIU X, SHA J J, *et al.* Influence of environmental factors on phytoplankton community structure and its relationship with coastal aquaculture in the waters adjacent to Rongcheng. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 26–33 [潘玉龙, 刘潇, 沙婧婧, 等. 荣成近岸养殖海域浮游植物群落结构及与环境因子的关系. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 26–33]
- PENNA A, CASABIANCA S, GUERRA A F, *et al.* Analysis of phytoplankton assemblage structure in the Mediterranean Sea based on high-throughput sequencing of partial 18S rRNA sequences. *Marine Genomics*, 2017, 36: 49–55
- PÉREZ-MORALES A, BAND-SCHMIDT C J, MARTÍNEZ-DÍAZ S F. Mortality on zoea stage of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* caused by *Cochlodinium polykrikoides*

- (Dinophyceae) and *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). *Marine Biology*, 2017, 164(3): 57
- PULZ O, GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(6): 635–648
- QIAO H, WANG G, ZHANG X. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *Journal of Phycology*, 2009, 45(5): 1153–1162
- QIU D, HUANG L, LIN S. Cryptophyte farming by symbiotic ciliate host detected in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2016, 113(43): 12208–12213
- QUINCE C, LANZÉN A, CURTIS T P, *et al.* Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*, 2009, 6(9): 639–641
- RAHMAN M M, VERDEGEM M C. Multi-species fishpond and nutrients balance. In: van der Zijpp A J, Verreth J A J, Tri L Q, *et al.* (eds.) *Fishponds in farming systems*. Wageningen Academic Publishers, Netherlands, 2007, 79–88
- RASHID J, KOBIYAMA A, REZA M S, *et al.* Seasonal changes in the communities of photosynthetic picoeukaryotes in Ofunato Bay as revealed by shotgun metagenomic sequencing. *Gene*, 2018, 665: 127–132
- REEDER J, KNIGHT R. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nature Methods*, 2010, 7(9): 668–669
- REUTER J, SPACEK D V, SNYDER M. High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*, 2015, 58(4): 586–597
- RIPPKA R, CASTENHOLZ R W, HERDMAN M. Form-Cyanobium. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015
- RODRÍGUEZ F, DERELLE E, GUILLOU L, *et al.* Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environmental Microbiology*, 2010, 7(6): 853–859
- ROY S S, PAL R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 2015, 68(1): 1–8
- SCHIPPERS A, NERETIN L N. Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1251–1260
- SHERWOOD AR, PRESTING G G. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 2010, 43(3): 605–608
- SINDEN A, SINANG S C. Cyanobacteria in aquaculture systems: Linking the occurrence, abundance and toxicity with rising temperatures. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2016, 13(12): 1–8
- SLANKIS T, GIBBS S P. The fine structure of mitosis and cell division in the Chrysophycean alga *Ochromonas danica*. *Journal of Phycology*, 2008, 8(3): 243–256
- SOARES M C S, LÚCIA M L, VIDAL L O, *et al.* Light microscopy in aquatic ecology: Methods for plankton communities studies. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 689: 215–227
- SU Y J, CAI X Y, WANG J, *et al.* A preliminary study on water quality affected by algae in shrimp ponds. *Journal of Fisheries Research*, 1994(4): 36–39 [苏永金, 蔡心一, 王军, 等. 藻类影响虾池若干水质因子初探. *渔业研究*, 1994(4): 36–39]
- SUBIRANA L, PÉQUIN B, MICHELY S, *et al.* Morphology, genome plasticity, and phylogeny in the genus *Ostreococcus* reveal a cryptic species, *O. mediterraneus* sp. nov. (Mamiellales, Mamiellophyceae). *Protist*, 2013, 164(5): 643–659
- SUN W, DONG S, JIE Z, *et al.* The impact of net-isolated polyculture of tilapia (*Oreochromis niloticus*) on plankton community in saline-alkaline pond of shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture International*, 2011, 19(4): 779–788
- SYM S D, PIENAAR R N. Taxonomy of *Pyramimonas obovata* and other observations on the subgenus *Vestigifera* of *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycological Research*, 1995, 43(1): 17–32
- TOMAS C R. *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, New York, 1997
- TROELL M, JOYCE A, CHOPIN T, *et al.* Ecological engineering in aquaculture-potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 2009, 297(1): 1–9
- VAULOT D, EIKREM W, VIPREY M, *et al.* The diversity of small eukaryotic phytoplankton ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(5): 795–820
- WANG T G. Overwintering cultivation technique of bay scallop. *Hebei Fisheries*, 2011(12): 42–43 [王廷贵. 海湾扇贝种贝越冬培育技术. *河北渔业*, 2011(12): 42–43]
- WANG W. Current situation and development trend of aquaculture industry in China. *Fishery Guide to be Rich*, 2009, 271(7): 12–18 [王武. 我国水产养殖业的现状与发展趋势. *渔业致富指南*, 2009, 271(7): 12–18]
- WEI Y X. *Chrysochromulina parva* lackey (Prymnesiophyceae): New record in China and its seasonal fluctuation in Lake Donghu, Wuhan. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(4): 317–321 [魏印心. 中国新记录: 小金色藻在武汉东湖的季节消长. *水生生物学报*, 1996, 20(4): 317–321]
- YOO Y, SEONG K A, JEONG H J, *et al.* Mixotrophy in the marine red-tide cryptophyte *Teleaulax amphioxieia* and ingestion and grazing impact of cryptophytes on natural populations of bacteria in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 2017, 68: 105–117
- ZHANG F S, HE Y C, MA J H, *et al.* The introduction of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay), into China, its spat-rearing and experimental cultivation. *Marine Sciences*, 1984, 8(5): 38–45 [张福绥, 何义朝, 马江虎, 等. 虾夷扇贝的引种、育苗及试养. *海洋科学*, 1984, 8(5): 38–45]
- ZHANG F S, LI S Y. Discovery of *Pyramimonas* sp. in China seas and its application in feeding bivalve larvae. *Marine Sciences*, 1983, 7(6): 49–50 [张福绥, 李淑英. 塔胞藻在中国海的发现与应用. *海洋科学*, 1983, 7(6): 49–50]
- ZHANG J M, HAN X D, JIA H F. The study of decontamination of microalgae to organic compound in the ocean. *Journal of Linyi Teachers' College*, 2006, 28(3): 79–82 [张建民, 韩晓弟, 贾宏福. 海洋微藻对海水中有机物的净化作用研究. *临沂师范学院学报*, 2006, 28(3): 79–82]

- ZHANG J M, HAN X D, WANG X W, *et al.* The study of decontamination of microalgae to pesticide in the ocean. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2007, 22(3): 462–465 [张建民, 韩晓弟, 王相伟, 等. 塔胞藻对海水中农药的响应及净化作用初步研究. *云南农业大学学报*, 2007, 22(3): 462–465]
- ZHANG J H, REN D D, JIANG Y S, *et al.* Microalgae in aquaculture: A review to nutritional value and rotifers enrichment. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(20): 371–376 [张继红, 任丹丹, 姜玉声, 等. 微藻营养价值及其在水产生物营养强化中的应用. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 371–376]
- ZHUANG S H, WANG Z Q. Influence of size, habitat and food concentration on the feeding ecology of the bivalve, *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Aquaculture*, 2004, 241(1/2/3/4): 689–699

(编辑 冯小花)

## Comparison of Phytoplankton Community Diversity in the Ecological Aquaculture System of a Marine Pond Using Morphological Analysis and High-Throughput Sequencing

QIAO Ling<sup>1</sup>, CHANG Zhiqiang<sup>2</sup>, LI Jian<sup>2①</sup>, REN Chengzhe<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Technology Research for Fishery Resource of Zhejiang Province, Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan, Zhejiang 316012, China;

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

3. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China)

**Abstract** With increasing concern over the negative environmental impact of mariculture, ecological aquaculture based on multi-trophic systems has received extensive attention in recent years. Phytoplankton are important components of aquaculture ecosystems. They are useful in maintaining water quality by uptake of nutrients during photosynthesis and serve as a direct or indirect food source for cultured organisms. Some phytoplankton, such as diatoms and green algae, are conducive to the growth of shrimp, crab, shellfish, and fish, whereas others (such as cyanophytes and dinoflagellates) may be toxic to aquatic organisms in aquaculture systems. In the present study, a combination of traditional morphological analysis and high-throughput sequencing was used to comprehensively assess phytoplankton community composition and diversity in the ecological aquaculture system of a marine pond in December 2018. Eight phyla were detected using two methods, Chlorophyta and Cryptophyta being the most frequently recorded. Notably, the phyla Haptophyta and Chrysophyta were only found via high-throughput sequencing. Additionally, a total of 39 genera were detected using two methods, but only five genera, *Eutreptiella*, *Oscillatoria*, *Pseudonitzschia*, *Pyramimonas*, and *Teleaulax* were shared in both methods. Some picophytoplankton ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) and small nanophytoplankton ( $> 2 \mu\text{m}$  and  $\leq 10 \mu\text{m}$ ) were detected via high-throughput sequencing, but were not observed via morphological analysis. Picophytoplankton represented 25.24% of the total phytoplankton sequence abundance, and small nanophytoplankton accounted for 60.42%. Phytoplankton diversity revealed upon morphological analysis was lower than that revealed via high-throughput sequencing. Therefore, the combination of traditional morphological analysis and high-throughput sequencing will be useful for obtaining a comprehensive understanding of phytoplankton community composition and diversity in aquatic ecosystems. This study serves as a foundation for the characterization of phytoplankton community dynamics in the ecological aquaculture systems of marine ponds for future research.

**Key words** Ecological aquaculture; Phytoplankton community; Diversity; Morphological analysis; High-throughput sequencing

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201207004

http://www.yykxjz.cn/

李新丹, 肖新平, 周卫国, 罗江, 周杨浩, 荣义峰, 祁洪芳, 史建全, 杜浩. 青海湖裸鲤的游泳能力及鱼梯通过效果. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 44–52

LI X D, XIAO X P, ZHOU W G, LUO J, ZHOU Y H, RONG Y F, QI H F, SHI J Q, DU H. Swimming capacity of *Gymnocypris przewalskii* and the efficiency of fish passing the fish ladder. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 44–52

## 青海湖裸鲤的游泳能力及鱼梯通过效果\*



李新丹<sup>1,2</sup> 肖新平<sup>2</sup> 周卫国<sup>3</sup> 罗江<sup>2</sup> 周杨浩<sup>2,4</sup>  
荣义峰<sup>1,2</sup> 祁洪芳<sup>3</sup> 史建全<sup>3</sup> 杜浩<sup>1,2,3,4①</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 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; 3. 青海湖裸鲤繁育与保护重点实验室  
青海 西宁 810016; 4. 华中农业大学 湖北 武汉 430070)

**摘要** 本研究采用递增流速法对青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)野生洄游群体和人工养殖 1 龄、2 龄群体的临界游泳速度进行测试, 采用固定流速法和人工模拟鱼梯对野生群体的克流能力进行评估。结果显示, 野生洄游组的绝对临界游泳速度( $U_{crit}$ ) ( $35.73 \pm 6.56$ ) cm/s 与养殖 1 龄组 ( $31.66 \pm 9.97$ ) cm/s 相比差异不显著( $P > 0.05$ ), 但显著低于养殖 2 龄组 ( $57.77 \pm 10.25$ ) cm/s ( $P < 0.01$ )。比较分析表明, 养殖 1 龄组 ( $3.25 \pm 1.42$ ) BL/s、养殖 2 龄组 ( $2.71 \pm 0.61$ ) BL/s 和野生洄游组 ( $1.71 \pm 0.35$ ) BL/s 的相对临界游泳速度( $U'_{crit}$ )随体长和年龄的增加呈下降趋势( $P < 0.01$ )。野生洄游组雄鱼的  $U'_{crit}$  ( $1.96 \pm 0.27$ ) BL/s 显著高于雌鱼 ( $1.54 \pm 0.31$ ) BL/s ( $P < 0.01$ ), 而养殖 1 龄组和养殖 2 龄组中不同性别间无显著差异( $P > 0.05$ )。青海湖裸鲤野生群体在高流速 100 cm/s 时的持续游泳时间极短 ( $27.67 \pm 5.67$ ) s, 持续游泳时间与水流速度呈显著负相关( $P < 0.01$ )。野生洄游群体在 3 级不同鱼梯的通过率差异显著 ( $P < 0.01$ ), 最低通过率仅为 36%。本研究表明, 青海湖裸鲤作为高海拔、高盐碱环境的典型冷水性鱼类, 其游泳能力相对较弱, 在洄游过程中更容易受到水坝等障碍的影响。本研究结果可为今后鱼梯设计和优化及青海湖裸鲤洄游群体保护提供基础数据。

**关键词** 青海湖裸鲤; 临界游泳速度; 洄游障碍; 鱼梯

**中图分类号** Q145 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0044-09

不同环境和体型的鱼类游泳能力存在显著差异 (Fu *et al.*, 2014)。游泳能力影响着鱼类在水流中位置的保持、食物与配偶的搜索、适宜生境的探寻 (Brett, 1964)。由于鱼类躲避渔具捕捞与其游泳能力关系密切, 20 世纪 60 年代末, 人们开展大量鱼类游泳能力实验应用于捕捞技术。随着我国的水力资源开发, 过

鱼设施的建设需求越来越高, 作为基础设计参数的鱼类游泳能力成为技术讨论的重要内容 (陈凯麒等, 2012)。游泳能力的好坏决定着鱼类能否通过鱼梯。王永猛等 (2020) 采用递增流速法对雅砻江长丝裂腹鱼 (*Schizothorax dolichonema*) 与齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 的游泳能力进行测试, 长丝裂

\* 青海省自然科学基金面上项目 (2018-ZJ-908) 和中央公益性基本科研业务费项目 (2020TD08; 2019 HY-JC01) 共同资助 [This work was supported by Project of Natural Science Foundation of Qinghai Province (2018-ZJ-908), and Basic Scientific Research Funds for the Central Public Welfare (2020TD08; 2019 HY-JC01)]. 李新丹, E-mail: li\_xindan@163.com

① 通讯作者: 杜浩, 研究员, E-mail: duhao@yfi.ac.cn

收稿日期: 2020-12-07, 收修改稿日期: 2021-01-15

腹鱼和齐口裂腹鱼的临界游泳速度分别为 $(4.90 \pm 1.73)$  BL/s 和 $(6.88 \pm 2.82)$  BL/s, 突进游泳速度分别为 $(9.77 \pm 1.72)$  BL/s 和 $(11.75 \pm 2.77)$  BL/s (BL 为体长), 二者的感应流速均 $< 0.2$  m/s。鱼类游泳能力研究的各项参数为鱼梯的设计提供了科学依据, 与鱼类游泳能力相适应的鱼梯才能达到良好的过鱼效果。游泳能力的研究对于洄游性鱼类保护具有重要意义。

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)属鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Gyprinidae), 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 裸鲤属(*Gymnocypris*), 是一种内陆耐盐碱性鱼类, 常年栖于青海湖中, 个体性成熟期较晚, 一般 3~4 龄达到性成熟(张信等, 2005; 谢振辉等, 2021), 每年 4~8 月由青海湖向周边入湖河流进行生殖性洄游(O'Bryan *et al.*, 2010)。2004 年, 青海湖裸鲤被《中国物种红色名录》收录并列为濒危物种(汪松等, 2004)。青海湖裸鲤是青海湖中唯一的经济鱼类, 处于青海湖生态系统的核心地位(朱松泉等, 1975)。由于拦河筑坝破坏了青海湖与周边河流的连通性, 造成河流生态环境碎片化, 阻断了青海湖裸鲤产卵亲鱼的洄游通道, 导致青海湖裸鲤产卵场面积萎缩, 严重影响了自然种群资源量的补充和渔业生态环境。鱼梯作为上下游水生生物交流的生态廊道在一定程度上缓解了青海湖裸鲤当前所面临的困境。目前, 尚未有青海湖裸鲤游泳能力相关的研究报道, 对青海湖裸鲤游泳能力进行研究可为过鱼通道的设计提供科学支撑。

本研究以生殖洄游期的野生青海湖裸鲤及人工养殖的 1 龄和 2 龄青海湖裸鲤为研究对象, 先采用递增流速法对其临界游泳速度进行测试, 比较不同规格青海湖裸鲤的游泳能力; 然后, 采用固定流速法和模拟鱼梯来评估野生洄游青海湖裸鲤的克流能力, 从而为过鱼设施的设计和优化及未来青海湖裸鲤的生殖洄游保护提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

实验所用的生殖洄游期野生群体为 2019 年 7 月在距离青海湖河口 3 km 左右的泉吉河捕获, 暂养于青海湖裸鲤增殖放流站(青海省刚察县)。挑选健康无损伤的野生青海湖裸鲤 236 尾为研究对象。实验所用的人工养殖青海湖裸鲤来自青海湖裸鲤救护中心, 其中, 1 龄、2 龄组各 30 尾。实验前将实验鱼置于室内暂养池中, 禁食暂养 2 d 后开始实验。暂养期间, 采用流水养殖, 每天换水量约 50%, 保证溶解氧(DO)

$> 6$  mg/L。实验期间, 水温为 $(11.55 \pm 0.95)^\circ\text{C}$ 。各实验所用实验鱼的具体形态学参数见表 1。

### 1.2 临界游泳速度测试

本研究中, 测试临界游泳速度及游泳耐受时间的沉水半开放式装置参考 Du 等(2014)的研究方法。测试临界游泳速度的装置如图 1。该装置包括: 进水口(1)和出水口(9)进行水位调节, 水泵(3)将水槽中的水泵入测试管道的缓冲区(4), 测试区(6)流速通过变频器(2)调节水泵(3)功率从而间接调节试验管道内水流速度实现, 测试区(6)前后由隔网(5、7)分隔, (8)为隔网。实验装置的缓冲区(4)和测试区直径内径为 21.50 cm 透明聚乙烯圆形管道, 其中, 缓冲区(4)长 80 cm, 测试区(6)长 1 m。

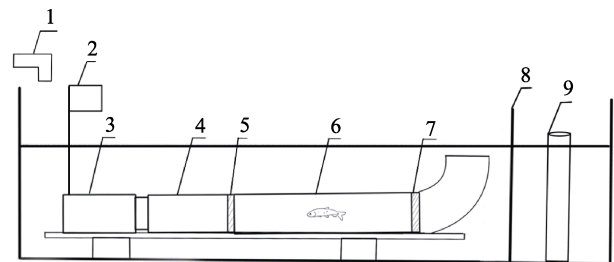


图 1 游泳能力测试装置

Fig.1 Swimming ability testing device

实验前, 多次调节变频器, 记录并测试每个变频器频率对应的流速值, 得到系统的水流流速递增表。

临界游泳速度的测定采用递增流速法(Brett, 1964)。首先, 使实验鱼在 5 cm/s 的水流下适应 1 h, 以消除在转移过程中对其产生的影响, 然后, 每 30 min 速度增加 5 cm/s, 直至实验鱼疲劳不能继续抵抗水流游泳, 实验测试完成。实验鱼疲劳判定依据为实验鱼停靠在下游筛网, 轻拍下游水面 20 s, 鱼体无反应(涂志英等, 2012)。将青海湖裸鲤分为养殖 1 龄、养殖 2 龄和野生洄游组群体, 每组各 30 尾用于临界游泳速度测试。绝对临界游泳速度( $U'_{crit}$  cm/s)的计算:

$$U_{crit} = U_{max} + \frac{t}{\Delta t} \Delta U \quad (1)$$

式中,  $U_{max}$  为实验鱼能够完成持续游泳时间的游泳速度最大值;  $\Delta t$  为每次改变水流速度的时间间隔(20 min);  $t$  为最高水流速度下的实验鱼游泳时间(min);  $\Delta U$  为每次水流速度的变化量(5 cm/s)。

相对临界游泳速度( $U'_{crit}$ , BL/s)的计算:

$$U'_{crit} = \frac{U_{crit}}{BL} \quad (2)$$



表 1 游泳能力测试相关参数  
Tab.1 Test parameters related to swimming ability

游泳耐力测试 Swimming ability test	实验鱼 Experimental fish	样本量 Numbers	全长 Total length/cm	体长 Body length/cm	湿重 Wet weight/g	$U_{crit}/(cm/s)$	$U_{crit}/(BL/s)$
临界游泳速度 Critical swimming speed	养殖 1 龄群体 1-year-old cultured population	30	♂15.30±4.62 <sup>a</sup> ♀12.90±2.28 <sup>a</sup>	♂10.87±4.27 <sup>b</sup> ♀11.33±4.57 <sup>a</sup>	♂29.90±23.8 <sup>a</sup> ♀38.73±39.65 <sup>a</sup>	♂32.10±7.67 <sup>a</sup> ♀30.94±8.50 <sup>a</sup>	♂2.72±1.01 <sup>a</sup> ♀2.39±0.31 <sup>a</sup>
	养殖 2 龄群体 2-year-old cultured population	30	♂23.51±3.23 <sup>b</sup> ♀27.01±2.15 <sup>a</sup>	♂20.68±3.33 <sup>a</sup> ♀23.28±1.81 <sup>a</sup>	♂116.76±51.43 <sup>b</sup> ♀165.08±37.69 <sup>a</sup>	♂57.72±10.98 <sup>a</sup> ♀57.83±9.03 <sup>a</sup>	♂2.86±0.69 <sup>a</sup> ♀2.49±0.36 <sup>a</sup>
	野生洄游群体 Wild migratory population	30	♂22.73±1.87 <sup>b</sup> ♀27.87±1.85 <sup>a</sup>	♂19.40±1.76 <sup>b</sup> ♀22.28±1.82 <sup>a</sup>	♂71.31±17.07 <sup>b</sup> ♀107.98±20.73 <sup>a</sup>	♂37.90±5.96 <sup>a</sup> ♀34.28±6.54 <sup>a</sup>	♂1.96±0.27 <sup>a</sup> ♀1.54±0.31 <sup>b</sup>
游泳耐力 Swimming endurance	野生洄游群体 Wild migratory population	66	23.92±2.53	20.70±2.45	83.77±31.35	—	—
鱼梯通过效果 Effect of the fish ladder passing	野生洄游群体 Wild migratory population	140	23.60±2.37	20.62±2.42	87.96±29.35	—	—

注：表中数据均以平均值±标准差(Mean±SD)表示；实验期间所有实验鱼无重复利用情况。临界游泳速度测试不同群体间的数据采用 Mann-Whitney U 检验进行统计学分析，相同群体组内不同性别间采用独立样本分析。同一列上标字母不同的数据表示差异显著 ( $P<0.05$ )

Note: Data in the table were expressed as Mean±SD. There was no reuse of all the experimental fish during the experiment. Data of critical swimming speed test among different groups were statistically analyzed by Mann-Whitney U test, and independent sample analysis was conducted among different genders in the same group. Data with different superscript letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ )

式中,  $U'_{crit}$  为相对临界游泳速度(BL/s)。本研究所用实验鱼身体的横截面积均小于游泳管横截面积的 10%, 未引发阻挡效应, 故无需校正(Peake, 2004)。

### 1.3 鱼梯通过效果评估

**1.3.1 游泳耐力测试** 耐久游泳速度是指持续游泳时间为 20 s~200 min 的速度值(涂志英等, 2011)。本研究采用固定流速法(Brett, 1964), 对 66 尾野生洄游青海湖裸鲤[体长为(20.70±2.45) cm/s, 体重为(83.77±31.35) g]的游泳耐力进行测试(表 1)。根据临界游泳速度测试结果设定游泳耐力测试的目标流速。在最大临界游泳速度的基础上依次提高 20% (60 cm/s)、60% (80 cm/s)和 100% (100 cm/s)作为实验水流速度(目标流速), 3 种流速分别有 25、21 和 20 尾野生洄游青海湖裸鲤用于实验。为避免转移实验鱼过程给接下来的实验带来干扰, 首先, 使实验鱼在 5 cm/s 流速下适应 30 min, 然后, 将水流速度直接调至设定目标流速后开始计时, 直至实验鱼疲劳, 结束实验记录时间。

**1.3.2 鱼梯通过效果实验** 根据对沙柳河、泉吉河鱼梯进行观察及原位测量结果, 在实验场地铺设 4 级阶梯, 每个阶梯之间的间隔 100 cm, 鱼梯宽度为 30 cm, 每级阶梯高度差 10 cm, 最低阶梯高为 15 cm, 阶梯 3 和阶梯 4 高度一致。阶梯 4 用作水流缓冲区, 阶梯 1~3 为实验区(图 2)。通过蓄水池控制流速, 使阶梯 1、阶梯 2 和阶梯 3 的流速分别为(41.00±0.99)、(55.86±2.39)和(74.57±2.49) cm/s。每组过梯实验选用实验鱼 20 尾, 将实验鱼放入阶梯 1 和隔网中间区域对过梯进行观察, 实时统计并记录各级阶梯实验鱼的通过数量, 鱼梯通过实验以野生洄游青海湖裸鲤为研究对象, 每组实验周期为 3 h, 共进行 7 组。

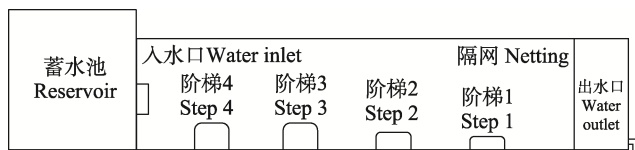


图 2 鱼梯实验场地示意图

Fig.2 Diagram of fish ladder test site

### 1.4 数据处理

实验数据采用 Excel 2019 和 Origin 2018 软件进行处理和绘图。统计分析采用 SPSS 23.0 软件。体长和临界游泳速度之间的关系采用线性方程回归分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据正态分布情况, 符合正态分布的数据进行独立样本检验, 反之则采用 Mann-Whitney U 检验对实验数据进行统计学分析。

统计数据均以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 以  $P<0.05$  作为数据均值差异达到显著性的标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 青海湖裸鲤的临界游泳速度

30 尾人工养殖 1 龄青海湖裸鲤(养殖 1 龄组)的  $U_{crit}$  和  $U'_{crit}$  分别为(31.66±9.97) cm/s 和(3.25±1.42) BL/s; 30 尾人工养殖 2 龄青海湖裸鲤(养殖 2 龄组)的  $U_{crit}$  和  $U'_{crit}$  分别为(57.77±10.25) cm/s 和(2.69±1.36) BL/s; 30 尾生殖洄游期野生青海湖裸鲤(野生洄游组)的  $U_{crit}$  和  $U'_{crit}$  分别为(35.73±6.56) cm/s 和(1.71±0.35) BL/s (表 1)。野生洄游组的  $U_{crit}$  和养殖 1 龄组相比差异不显著( $P=0.058$ ); 野生洄游组( $P<0.01$ )和养殖 1 龄组( $P=0.000$ )的  $U_{crit}$  均显著低于养殖 2 龄组; 野生洄游组的  $U'_{crit}$  显著低于养殖 1 龄组( $P<0.01$ )和养殖 2 龄组( $P<0.01$ ); 养殖 1 龄组和养殖 2 龄组的  $U'_{crit}$  相比差异不显著( $P=0.464$ )(图 3)。

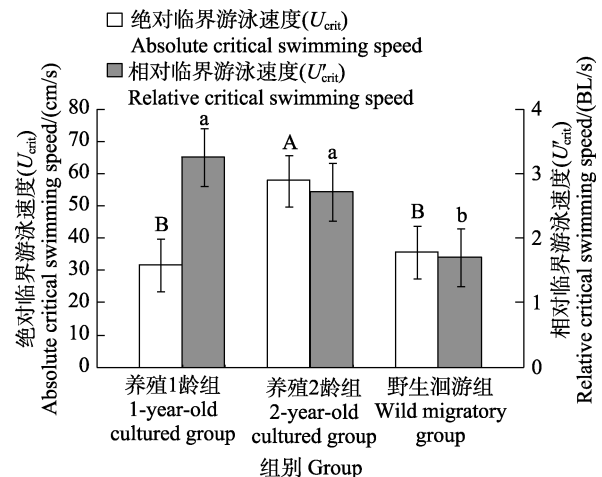


图 3 青海湖裸鲤绝对临界游泳速度( $U_{crit}$ )和相对临界游泳速度( $U'_{crit}$ )

Fig.3 Absolute critical swimming speed and critical swimming speed of *G. przewalskii*

大写字母 AB 和小写字母 ab 分别为绝对临界游泳速度( $U_{crit}$ )和相对临界游泳速度( $U'_{crit}$ )统计差异标注, 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同 AB and ab are the statistical difference marks of absolute critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) and relative critical swimming speed ( $U'_{crit}$ ) respectively, and different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

### 2.2 不同体长和性别组的临界游泳速度

通过对 3 种青海湖裸鲤群体的临界游泳速度分析发现, 青海湖裸鲤的体长随临界游泳速度的增加而增加,  $U_{crit}$  随体长的增加而减少(图 4)。养殖 1 龄组

青海湖裸鲤不同性别的  $U_{crit}$  ( $P=0.814$ ) 和  $U'_{crit}$  ( $P=0.565$ ) 无显著差异; 养殖 2 龄组青海湖裸鲤不同性别的  $U_{crit}$  ( $P=0.978$ ) 和  $U'_{crit}$  ( $P=0.104$ ) 相比差异不显著; 野生洄游组不同性别青海湖裸鲤的  $U_{crit}$  无显著性差异 ( $P=0.053$ ), 雄鱼的  $U'_{crit}$  ( $1.96\pm 0.27$ ) BL/s 显著高于雌鱼 ( $1.54\pm 0.31$ ) BL/s ( $P<0.01$ ) (图 5)。

### 2.3 青海湖裸鲤游泳耐力测试

采用固定流速法对青海湖裸鲤野生洄游群体在不同流速下持续游泳时间测试结果显示, 在 60 cm/s 流速下, 25 尾实验鱼中 36% (9 尾) 持续游泳时间在 1 min 以内, 48% (12 尾) 持续游泳时间在 1~5 min 之间, 16% (4 尾) 持续游泳时间在 5~15 min 之间; 在 80 cm/s 流

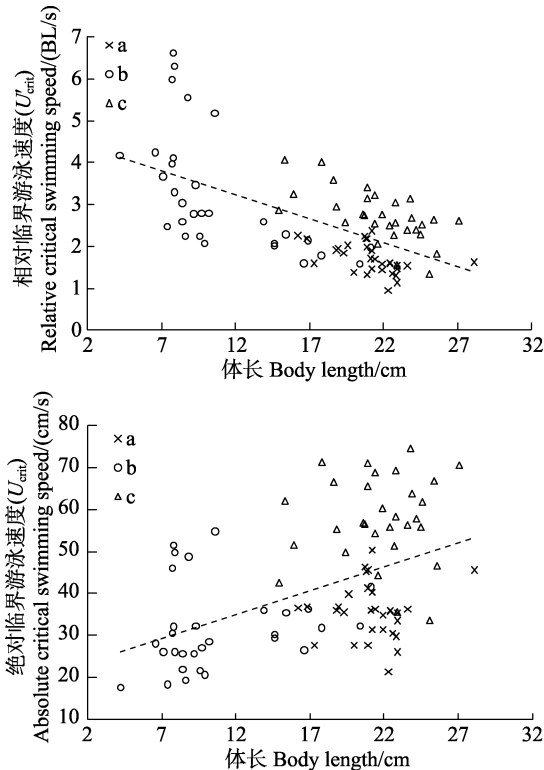


图 4 青海湖裸鲤临界游泳速度与体长的关系  
Fig.4 The relationship between body length and critical swimming speed of *G. przewalskii*

体长与绝对临界游泳速度 ( $U_{crit}$ ) 和相对临界游泳速度 ( $U'_{crit}$ ) 二者的拟合方程分别为 ( $y=1.148x+21.163$ ,  $R^2=0.22$ ,  $P<0.01$ ) 和 ( $y=-0.115x+4.607$ ,  $R^2=0.38$ ,  $P<0.01$ )。

a: 生殖洄游期野生青海湖裸鲤; b: 人工养殖 1 龄青海湖裸鲤; c: 人工养殖 2 龄青海湖裸鲤

The fitting equations of body length and absolute critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) and relative critical swimming speed ( $U'_{crit}$ ) are ( $y=1.148x+21.163$ ,  $R^2=0.22$ ,  $P<0.01$ ), and ( $y=-0.115x+4.607$ ,  $R^2=0.38$ ,  $P<0.01$ ), respectively. a: *G. przewalskii* wild during reproductive migration; b: 1-year-old *G. przewalskii* cultured; c: 2-year-old *G. przewalskii* cultured

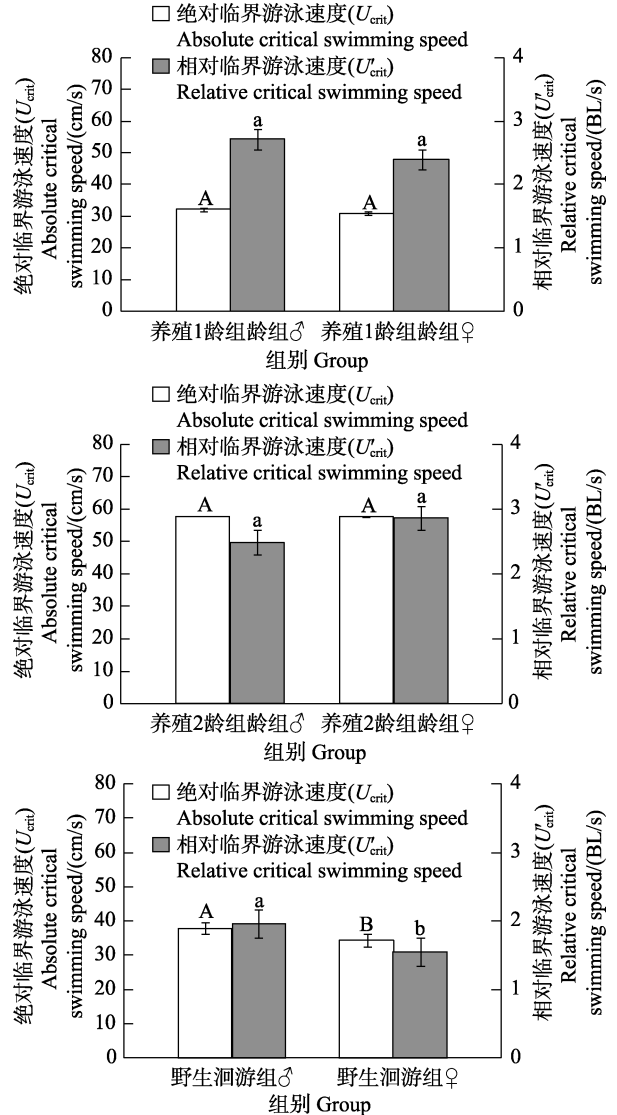


图 5 青海湖裸鲤临界游泳速度与性别的关系  
Fig.5 Relationship between sex and critical swimming speed of *G. przewalskii*

速下, 20 尾实验鱼中 80% (16 尾) 持续游泳时间在 1 min 以内, 15% (3 尾) 持续游泳时间在 1~5 min 之间, 5% (1 尾) 持续游泳时间在 5~15 min 之间; 在 100 cm/s 流速下, 21 尾实验鱼的持续游泳时间均集中分布在 1 min 以内, 持续时间为 ( $27.67\pm 5.67$ ) s (图 6)。不同水流速度下持续游泳时间差异显著, 水流速度与持续游泳时间呈负相关 ( $P<0.01$ ) (图 7)。

### 2.4 鱼梯通过效果评估

对野生青海湖裸鲤鱼梯通过情况统计发现, 3 h 内, 阶梯 1 ( $41.00\pm 0.99$ ) cm/s 实验鱼通过率为 84%, 阶梯 2 ( $55.86\pm 2.39$ ) cm/s 实验鱼的通过率为 60%, 阶梯 3 ( $74.57\pm 2.49$ ) cm/s 实验鱼通过率为 36%。不同阶梯间通过率差异显著, 随着阶梯水流流速的逐渐增

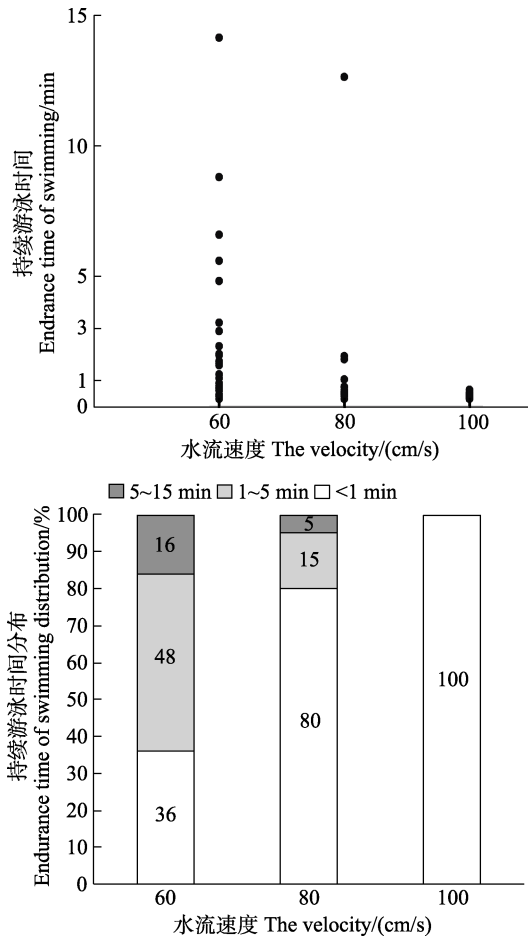


图 6 66 尾实验鱼在不同固定流速下的持续游泳时间  
Fig.6 Endurance time of 66 experimental fish at different fixed velocity

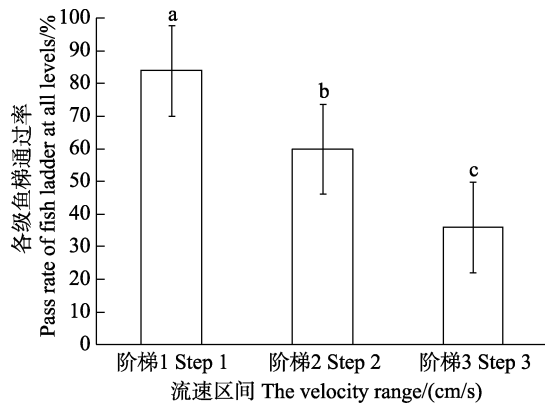


图 7 不同流速区间实验鱼的通过情况  
Fig.7 The passage of experimental fish at different velocity  
大, 实验鱼的通过率显著减小( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 青海湖裸鲤的游泳能力

鱼类游泳能力关系到其洄游、捕食、反捕食及繁

殖等生态习性, 可以为水利水电工程过鱼、拦鱼和诱鱼等设施的设计提供依据(于晓明等, 2017)。临界游泳速度作为鱼梯设计的重要参考因素之一, 最早被国外学者研究并应用于鲑鳟鱼类的保护(Kieffer, 2010)。近年来, 我国学者陆续开展了大量关于鱼类游泳能力相关研究。本研究中, 养殖 1 龄青海湖裸鲤幼鱼的临界游泳速度和鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)幼鱼相比更低。29℃~31℃水温下, 鲢(体长为 7.3~16.8 cm)的临界游泳速度为 52~100 cm/s (李会锋等, 2016); 27℃~29℃水温下, 草鱼(体长为 5.0~15.0 cm)临界游泳速度为 68.0~100.0 cm/s (龚丽等, 2015)。于晓明等(2017)研究表明, 低温能使能量底物的利用及转化效率降低, 进而导致游泳能力下降。青海湖裸鲤是典型的高原冷水性鱼类, 故推测水温可能是导致其游泳能力较弱的重要原因。本研究结果表明, 野生洄游青海湖裸鲤的临界游泳速度相较于短须裂腹鱼(*Schizothorax wangchiachii*)和巨须裂腹鱼(*Schizothorax macropogon*)更低。在 12.1℃~16.1℃水温时短须裂腹鱼[体长为(23.83±2.47) cm]的临界游泳速度为(75.04±7.60) cm/s (3.17±0.42) BL/s (张沙龙等, 2016); 在 10℃水温时巨须裂腹鱼[体长(24.6±2.6) cm]的临界游泳速度为(109.0±7.0) cm/s (4.40±0.16) BL/s (涂志英等, 2012)。鱼类游泳能力与其生物进化过程相适应, 与生活习性有关(石小涛等, 2012)。除了水温之外, 栖息环境也会影响鱼类的游泳能力, 如生活在急流中的鱼类一般具有更高的游泳速度, 而生活在静水中的鱼类游泳速度更低(吴青怡等, 2016)。本研究中, 青海湖裸鲤野生群体常年栖息于高盐碱、高海拔、饵料贫乏的青海湖, 与短须裂腹鱼(金沙江)和巨须裂腹鱼(雅鲁藏布江)栖息环境的差异可能是导致野生青海湖裸鲤游泳能力更低的重要原因(吴青怡等, 2016)。

本研究中, 野生洄游群体年龄均在 3 龄以上, 其游泳能力显著低于养殖 2 龄组, 同时, 养殖 2 龄组游泳能力显著高于养殖 1 龄组。这可能体现的是发育阶段的固有差异(曾令清等, 2018)。因环境不同, 随着青海湖裸鲤年龄的增长其体重和体长增加并无明显规律, 致使年龄增长的同时其游泳能力并不一定得到提升。胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)仔鱼随着日龄的增加其  $U_{crit}$  也表现出先增加后降低的趋势(石小涛等, 2013)。另外, 本实验中, 养殖 1 龄、养殖 2 龄和野生洄游组处于不同的发育阶段, 日常的摄食水平存在差异, 这可能导致不同年龄间表现出游泳能力差异(曾令清等, 2018; 徐革锋等, 2016), 具体原因还有待进

一步验证。

通过不同性别组的临界游泳速度对比分析发现,仅野生洄游期青海湖裸鲤的  $U'_{crit}$  在不同性别间表现出显著差异。本研究中,野生青海湖裸鲤雌鱼的体长、体重显著高于雄鱼,这种雌雄规格差异可能导致了洄游时期青海湖裸鲤雌鱼和雄鱼的  $U'_{crit}$  的差异(Hammer, 1995; Makiguchi *et al.*, 2017)。如洄游时期鲑鱼(*Oncorhynchus gorbuscha*)雄性大于雌性,雄鱼的  $U'_{crit}$  显著高于雌性(Makiguchi *et al.*, 2017)。在洄游过程中,青海湖裸鲤雌鱼性腺逐渐发育成熟,机体能量逐步向性腺进行转移,洄游时青海湖裸鲤性别间  $U'_{crit}$  的差异可能是不同性别间体能消耗能量调度差异的体现(吴朗等, 2013; Makiguchi *et al.*, 2017)。

### 3.2 鱼梯对青海湖裸鲤生殖洄游的影响

水坝等水利工程的修建造成的河流碎片化已成为全球正在面临的一个重大挑战(Belletti *et al.*, 2020)。20世纪70年代,为发展农业,在青海湖的入湖河流修建水坝,阻碍了青海湖裸鲤的生殖洄游。为缓解水利设施对青海湖裸鲤洄游造成的阻碍,2006年首次在青海湖裸鲤洄游产卵的沙柳河修建了过鱼通道,之后经过多次改良才初显过鱼成效(吴晓春等, 2014)。近年来,受水利工程的修建和取水的影响,现有的鱼道设施不能有效发挥作用(郭守财, 2019)。青海湖裸鲤游泳能力参数在今后过鱼设施的修建与改良过程中至关重要。本研究中,青海湖裸鲤游泳耐力实验结果显示,高流速为100 cm/s时,青海湖裸鲤持续游泳时间为(27.67±5.67) s。鱼类在洄游过程中,通过高流速区时往往需要较长时间保持高速游泳,如洄游的红大马哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)在通过弗雷泽河一段通道时,持续3 min游泳速度大于临界游泳速度(Hinch *et al.*, 2000)。鱼梯实验中阶梯3(74.57±2.49) cm/s通过率仅为36%。综上所述,鱼梯流速对青海湖裸鲤的过梯效率影响显著。结合实际测量在沙柳河的过鱼通道处,高流速区流速达100 cm/s,青海湖裸鲤从该水域上溯,虽有一定的过鱼效果,但效果不佳。结合过鱼对象的游泳能力来设计鱼梯流速,才能达到最佳的过鱼效果。建议以青海湖裸鲤为过鱼对象的鱼梯修建和改良过程中,需要考虑青海湖裸鲤的游泳速度和克流能力,适当降低鱼梯流速才能达到更好的过鱼效果。

综上所述,青海湖裸鲤作为高海拔、高盐碱环境具有生殖洄游习性的冷水鱼类,其游泳能力相对较弱,在洄游过程中更容易受到水坝等障碍的影响。本研究目前获得了野生洄游期青海湖裸鲤及人工养殖青海湖裸鲤临界游泳速度及野生洄游期青海湖裸鲤克

流能力基础数据,对过鱼设施的优化、改良、维护水域生态平衡及青海湖裸鲤种群资源的保护具有重要意义。

## 参 考 文 献

- BELLETTI B, DE LEANIZ C G, JONES J, *et al.* More than one million barriers fragment Europe's rivers. *Nature*, 2020, 588(7838): 436–441
- BRETT J R. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1964, 21(5): 1183–1226
- CHEN K Q, CHANG Z N, CAO X H, *et al.* Recent progress in studies of overland flow resistance. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2012, 43(2): 182–188 [陈凯麒, 常仲农, 曹晓红, 等. 我国鱼道的建设现状与展望. *水利学报*, 2012, 43(2): 182–188]
- DU H, WEI Q W, XIE X, *et al.* Improving swimming capacity of juvenile Dabry's sturgeon, (*Acipenser dabryanus* Duméril, 1869) in current-enriched culture tanks. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, 30: 1445–1450
- FU S J, FU C, YAN G J, *et al.* Interspecific variation in hypoxia tolerance, swimming performance and plasticity in cyprinids that prefer different habitats. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(4): 590–597
- GONG L, WU Y H, BAI Y B L F, *et al.* Experimental study on swimming capability and swimming behavior of juvenile grass carp. *Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research*, 2015, 13(3): 211–216 [龚丽, 吴一红, 白音包力皋, 等. 草鱼幼鱼游泳能力及游泳行为试验研究. *中国水利水电科学研究院学报*, 2015, 13(3): 211–216]
- GUO S C. Design of migratory fish passage in Qinghai Lake. *Water Conservancy Technical Supervision*, 2019, 149(3): 216–218 [郭守财. 青海湖洄游鱼道设计. *水利技术监督*, 2019, 149(3): 216–218]
- HAMMER C. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1995, 112(1): 1–20
- HINCH S G, BRATTY J. Effects of swim speed and activity pattern on success of adult sockeye salmon migration through an area of difficult passage. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2000, 129(2): 598–606
- KIEFFER J D. Perspective-exercise in fish: 50+ years and going strong. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 156(2): 163–168
- LI H F, CAI D S, YANG P S. Swimming ability and behavior of different sized silver carp. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(3): 88–92 [李会锋, 蔡德所, 杨培思. 鲢幼鱼游泳能力及游泳行为的试验研究. *水生生态学杂志*, 2016, 37(3): 88–92]
- MAKIGUCHI Y, NII H, NAKAO K, *et al.* Sex differences in metabolic rate and swimming performance in pink salmon



- (*Oncorhynchus gorbuscha*): The effect of male secondary sexual traits. *Ecology of Freshwater Fish*, 2017, 26(2): 322–332
- O'BRYAN D M, XIE Z, WANG Y, *et al.* Phylogeography and conservation genetics of Lake Qinghai scaleless carp *Gymnocypris przewalskii*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(9): 2072–2092
- PEAKE S. An evaluation of the use of critical swimming speed for determination of culvert water velocity criteria for smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2004, 133(6): 1472–1479
- SHI X T, CHEN Q W, LIU D F, *et al.* Critical swimming speed of young Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(1): 133–136 [石小涛, 陈求稳, 刘德富, 等. 胭脂鱼幼鱼的临界游泳速度. *水生生物学报*, 2012, 36(1): 133–136]
- SHI X T, WANG B, WANG X, *et al.* Ontogenetic changes in schooling behaviour during larval and early juvenile stages of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013(5): 705–710 [石小涛, 王博, 王雪等. 胭脂鱼早期发育过程中集群行为的形成. *水产学报*, 2013(5): 705–710]
- TU Z Y, YUAN X, HAN J C, *et al.* Research progress on swimming ability of fish. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2011(S1): 59–65 [涂志英, 袁喜, 韩京成, 等. 鱼类游泳能力研究进展. *长江流域资源与环境*, 2011(S1): 59–65]
- TU Z Y, YUAN X, WANG C F, *et al.* Swimming capability and activity metabolism of subadult *Schizothorax macropogon*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4): 682–688 [涂志英, 袁喜, 王从锋, 等. 亚成体巨须裂腹鱼游泳能力及活动代谢研究. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 682–688]
- WANG S, XIE Y. Red list of Chinese species. Beijing: Higher Education Press, 2004 [汪松, 解焱. 中国物种红色名录. 北京: 高等教育出版社, 2004]
- WANG Y M, LI Z M, TU Z Y, *et al.* Fishway design based on the swimming ability of two *Schizothorax* species in the Yalung River, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(8): 2785–2792 [王永猛, 李志敏, 涂志英, 等. 基于雅砻江两种裂腹鱼游泳能力的鱼道设计. *应用生态学报*, 2020, 31(8): 2785–2792]
- WU L, LIU J S, ZHANG G, *et al.* Chemical compositions and energy densities of female neosalanx taihuensis with ovaries at different developmental stages. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 444–449 [吴朗, 刘家寿, 张国, 等. 太湖新银鱼卵巢发育不同阶段个体生化组成和能量密度研究. *水生生物学报*, 2013, 37(3): 444–449]
- WU Q Y, CAO Z D, FU S J. Flow velocity selection and its relationship to locomotive energetic metabolism in Chinese bream (*Parabramis pekinensis*) and pale chub (*Zacco platypus*). *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(13): 4187–4194 [吴青怡, 曹振东, 付世建. 鳊鱼和宽鳍鱲幼鱼流速选择与运动能量代谢特征的关联. *生态学报*, 2016, 36(13): 4187–4194]
- WU X C, SHI J Q. Construction and management of fish passage on Shaliu River adjacent to Qinghai Lake, based on ecological restoration. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(22): 130–136 [吴晓春, 史建全. 基于生态修复的青海湖沙柳河鱼道建设与维护. *农业工程学报*, 2014, 30(22): 130–136]
- XIE Z H, LÜ H J, FU M, *et al.* A comparative study of reproductive characteristics among different spawning stocks of naked carp *Gymnocypris przewalskii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 84–91 [谢振辉, 吕红健, 付梅, 等. 青海湖裸鲤不同繁殖群体繁殖特性的比较研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 84–91]
- XU G F, MOU Z B, HAN Y, *et al.* Effects of temperature and flow velocity on swimming of juvenile manchurian trout *Brachymystax lenok* (pallas) and the relationship to respiratory metabolism. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 786–792 [徐革锋, 牟振波, 韩英, 等. 温度和流速对细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)幼鱼游泳能力的影响及其与呼吸代谢的关系. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 786–792]
- YU X M, CUI W D, CHEN L, *et al.* Effects of water temperature, salinity, and dissolved oxygen on the swimming ability of Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes* juveniles. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 543–549 [于晓明, 崔闻达, 陈雷, 等. 水温, 盐度和溶氧对红鳍东方鲀幼鱼游泳能力的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 543–549]
- ZENG L Q, FU C, FU S J. Individual variation and phenotypic correlations in swimming performance of juvenile crucian carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(3): 561–570 [曾令清, 付成, 付世建. 鲫幼鱼游泳运动能力的个体变异与表型关联. *水生生物学报*, 2018, 42(3): 561–570]
- ZHANG S L, ZHANG J B, QIAO Y, *et al.* Experimental study on aerobic swimming performance and behavior of *Schizothorax wangchiachii* Fang. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(5): 56–62 [张沙龙, 张家波, 乔晔, 等. 短须裂腹鱼有氧游泳能力及其行为的实验研究. *水生态学杂志*, 2016, 37(5): 56–62]
- ZHANG X, CHEN D Q, YAN L, *et al.* Problem and countermeasure of resource protection in *Gymnocypris przewalskii* in Qianghai Lake. *Freshwater Fisheries*, 2005, 35(4): 57–60 [张信, 陈大庆, 严莉, 等. 青海湖裸鲤资源保护面临的问题与对策. *淡水渔业*, 2005, 35(4): 57–60]
- ZHU S Q, WU Y F. The fish fauna of Qinghai Lake and biology of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler). Beijing: Science Press, 1975, 9–26 [朱松泉, 武云飞. 青海湖地区鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学. 北京: 科学出版社, 1975, 9–26]

## Swimming Capacity of *Gymnocypris przewalskii* and the Efficiency of Fish Passing the Fish Ladder

LI Xindan<sup>1,2</sup>, XIAO Xinping<sup>2</sup>, ZHOU Weiguo<sup>3</sup>, LUO Jiang<sup>2</sup>, ZHOU Yanghao<sup>2,4</sup>,  
RONG Yifeng<sup>1,2</sup>, QI Hongfang<sup>3</sup>, SHI Jianquan<sup>3</sup>, DU Hao<sup>1,2,3,4</sup>①

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

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei 430223; China; 3. Qinghai Naked Carp Rescue Center, Xining, Qinghai 810016, China;

4. Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract** The increasing velocity method was adopted to test critical swimming speed of *Gymnocypris przewalskii* using a wild migratory group and cultured groups of the ages of 1 and 2 years old, and then the fixed velocity method was used to test the swimming endurance of *G. przewalskii*. Finally, we simulated a three-stage fish ladder and calculated and analyzed the efficiency of fish passing the ladder. The results showed that: The absolute critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) of the wild migration group ( $35.73 \pm 6.56$ ) cm/s was significantly lower than that of the 2-year-old cultured group ( $57.77 \pm 10.25$ ) cm/s ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between the wild migration group and the 1-year-old cultured group ( $31.66 \pm 9.97$ ) cm/s ( $P > 0.05$ ). The relative critical swimming speed ( $U'_{crit}$ ) of the 1-year-old cultured group ( $3.25 \pm 1.42$ ) BL/s, the 2-year-old cultured group ( $2.71 \pm 0.61$ ) BL/s and the wild migratory group ( $1.71 \pm 0.35$ ) BL/s significantly decreased with the increase of body length and age ( $P < 0.01$ ). The  $U'_{crit}$  of males in the wild migratory group ( $1.96 \pm 0.27$ ) BL/s was significantly higher than that of the female ( $1.54 \pm 0.31$ ) BL/s ( $P < 0.01$ ), while there were no significant difference between the sexes in the 1-year-old and 2-year-old cultured groups ( $P > 0.05$ ). The duration of swimming in wild *G. przewalskii* was very short at a high flow rate of 100 cm/s ( $27.67 \pm 5.67$ ) s, and there was a significant negative correlation between the duration of swimming and the flow velocity ( $P < 0.01$ ). The passing rate of wild *G. przewalskii* at three levels of the fish ladder was significantly different ( $P < 0.01$ ), and the lowest pass rate was only 36%. This study shows that *G. przewalskii*, a typical cold-water fish in high altitude and high salinity environments, has a relatively weak swimming ability and is likely to be affected by dams and other obstacles during their migration. The results of this study could provide basic data for the design and optimization of fish ladders and the protection of the migratory populations of *G. przewalskii*.

**Key words** *Gymnocypris przewalskii*; Critical swimming speed; Migration obstacles; Fish ladder

① Corresponding author: DU Hao, E-mail: duhao@yfi.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201104001

http://www.yykxjz.cn/

王晓, 廖冬芽, 俞立雄, 高雷, 段辛斌, 陈大庆, 苏云垓, 欧阳珊. 温度梯度对四大家鱼临界游泳速度的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 53–61

WANG X, LIAO D Y, YU L X, GAO L, DUAN X B, CHEN D Q, SU Y G, OUYANG S. Effect of temperature gradient on the critical swimming speed of four major Chinese carps. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 53–61

## 温度梯度对四大家鱼临界游泳速度的影响\*



王 晓<sup>1,2</sup> 廖冬芽<sup>3</sup> 俞立雄<sup>2</sup> 高 雷<sup>2</sup>  
段辛斌<sup>2</sup> 陈大庆<sup>2</sup> 苏云垓<sup>4</sup> 欧阳珊<sup>1①</sup>

(1. 南昌大学生命科学学院 江西 南昌 330031; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所 农业农村部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站 湖北 武汉 430223; 3. 江西省水利规划设计研究院 江西 南昌 330029; 4. 长江四大家鱼监利老江河原种场 湖北 监利 433300)

**摘要** 在水利工程建设中, 鱼道是一项重要的生态补偿措施, 研究鱼类游泳能力可为鱼道等过鱼设施设计提供参考数据。本研究以四大家鱼为研究对象, 分别测定其在不同温度(10℃、15℃、20℃、25℃和 30℃)梯度下的临界游泳速度。结果显示, 在 10℃~30℃温度范围内, 青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)的相对临界游泳速度分别为(3.93±0.24~9.94±1.65) BL/s、(3.50±0.48~10.55±2.07) BL/s、(0.95±0.04~4.68±0.58) BL/s、(2.22±0.18~3.95±0.23) BL/s [BL 为实验鱼的体长(cm)]。在水温为 10℃~20℃范围内, 四大家鱼的绝对临界游泳速度和相对临界游泳速度均随水温升高而增大, 基本表现为在 20℃时达到最大值, 随后趋于稳定, 且 20℃组四大家鱼游泳能力显著高于 15℃组和 10℃组, 20℃组、25℃组和 30℃组四大家鱼临界游泳速度均无显著性差异。此外, 随着温度的升高, 草鱼的游泳能力增加速度高于其他 3 种鱼。相同温度条件下, 草鱼和青鱼的临界游泳速度相近, 均极显著高于鲢和鳙( $P<0.01$ )。当考虑过鱼对象为四大家鱼时, 建议延长鱼道在夏季的开放时间, 将鳙的临界游泳速度作为鱼道设计的主要依据。

**关键词** 水温; 鱼道; 游泳能力; 四大家鱼

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0053-09

水利枢纽的建设改变了河流的天然条件, 直接影响河道的水动力特征, 阻断鱼类的洄游通道(杨宇等, 2006)。在水利枢纽中修建过鱼设施是一项重要的生

态补偿工程, 可以满足鱼类繁殖、索饵及越冬洄游需求。鱼类游泳能力是鱼道流速设计的主要依据, 是决定过鱼设施成败的重要因素之一(陈凯麒等, 2012)。

\* 国家重点研发计划(2018YED0900903; 2018YED0900902)、农业农村部物种资源保护项目(长江中上游重要渔业水域主要经济物种产卵场及洄游通道调查)、江西省水利厅重大课题(201821ZDKT21)和中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD09)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YED0900903; 2018YED0900902), Species Resource Conservation Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Investigation on Spawning Grounds and Migration Routes of Major Economic Species in the Upper and Middle Reaches of the Yangtze River), a Major Project of Jiangxi Provincial Department of Water Resources (201821ZDKT21), and Innovation Team Project of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD09)]. 王 晓, E-mail: 1658429791@qq.com

① 通讯作者: 欧阳珊, 教授, E-mail: ouys1963@qq.com

收稿日期: 2020-11-04, 收修改稿日期: 2020-12-14

鱼类能否顺利上溯取决于鱼道内水动力条件及其自身游泳能力,因此,水力学特性与鱼类行为学结合的研究对恢复河流连通性和保护水生生物具有重要意义。

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙(*Aristichthys nobilis*)合称“四大家鱼”,是我国特有的经济鱼类,也是长江流域鱼道主要针对的过鱼对象(李思发等,1998)。长江是四大家鱼的主要繁殖栖息地,该水系四大家鱼种质性状明显优于其他水系。水利工程建设运行改变长江的天然水文情势,阻断四大家鱼洄游通道,对渔业资源产生明显影响。20世纪60年代,赣江峡江、新干江段“四大家鱼”苗天然产量曾高达 $25 \times 10^8$ 尾,20世纪80年代降至 $13 \times 10^8$ 尾,20世纪末已降至2000万尾左右,2009年通过新干段的“四大家鱼”卵苗径流量仅为600万粒(尾)(刘彬彬等,2009)。为减缓大坝的阻隔影响,应基于鱼类的游泳能力设计鱼道,从而维护水域生态平衡,保护渔业资源。

温度是鱼类生存活动中重要的环境因子,对鱼类游泳运动的生理代谢产生直接影响(施兆鸿等,2016)。临界游泳速度(critical swimming speed,  $U_{crit}$ )是评价鱼类游泳能力的重要指标(Zeng *et al.*, 2009; 王萍等, 2010)。研究发现,不同温度下鱼类临界游泳速度不同,如在 $34^\circ\text{C}$ 下,鳊(*Parabramis pekinensis*)的相对临界游泳速度为 $(8.82 \pm 0.27)$  BL/s [BL为实验鱼的体长(cm)],而在 $10^\circ\text{C}$ 下其相对临界游泳速度为 $(6.01 \pm 0.32)$  BL/s(杨阳等,2013)。研究表明,鱼类游泳运动有一个最佳温度,当水温偏离最佳温度时,鱼类将通过生理功能和游泳行为调节维持自身平衡(Pang *et al.*, 2013),表现为游泳能力减弱,代谢压力增加(袁喜等,2014)。鉴于环境温度对鱼类游泳能力具有较大影响,同时考虑到长江中下游流域水温主要变幅为 $10^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ ,本研究根据长江自然水文变化情况,设计了5个温度( $10^\circ\text{C}$ 、 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$ 和 $30^\circ\text{C}$ )梯度,分别测量青鱼、草鱼、鲢和鳙的临界游泳速度,以期了解不同温度下“四大家鱼”游泳能力的差异,为鱼道流速设计与改进提供游泳能力参数,也为提升“四大家鱼”增殖放流效果提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究于2020年6月—8月在长江四大家鱼湖北监利老江河原种场开展,实验所用青鱼、草鱼、鲢

和鳙取自老江河原种场,共计80尾。实验鱼处于同一发育期,每种实验鱼均选择体长一致的样本,青鱼平均体长为 $(9.73 \pm 0.94)$  cm、草鱼为 $(7.36 \pm 1.00)$  cm、鲢为 $(9.91 \pm 1.72)$  cm以及鳙为 $(15.53 \pm 0.84)$  cm,实验鱼活力正常,外观无伤且鳞片完整。

### 1.2 实验设计

本研究设置5组温度梯度,分别为 $10^\circ\text{C}$ 、 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$ 和 $30^\circ\text{C}$ (其中, $10^\circ\text{C}$ 和 $15^\circ\text{C}$ 为低温状态, $20^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$ 和 $30^\circ\text{C}$ 为常温状态),每个温度组均测定4尾鱼,控制每种鱼在5个温度组间的平均体长一致,探究5个温度梯度下四大家鱼的游泳能力。实验开始前用恒温冷暖机调节5个温度梯度(温度变化 $\pm 1^\circ\text{C}/\text{d}$ ),分别对应5个不同自净化循环控温水箱,在设定温度下暂养7 d,连续充氧24 h,每天换水一次。实验开始时将实验鱼移至游泳能力测定装置密封区域内,控制装置内环境条件(水温、水质等)与暂养水箱相同,让实验鱼在低流速(5 cm/s)适应2 h,整个过程保证溶氧量在7 mg/L以上。

### 1.3 实验装置

鱼类游泳速度测定设备购自丹麦 Loligo system 公司,包括环形实验水槽、水泵、电机、动力输出控制器等,使用溶氧仪(上海维赛仪器公司的 YSI550A)测定溶氧,2 HP 恒温冷暖机( $8^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ )调节水温,流速仪(重庆水文仪器厂 LS45A 型旋杯式)测定不同叶轮转速下环形实验水槽游泳区域内的流速,建立鱼类游泳区域水流速度与叶轮转速之间的关系。环形实验水槽体积为90 L,游泳测试断面尺寸为 $20\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 70\text{ cm}$ (图1)。其工作原理为在密封区域内,

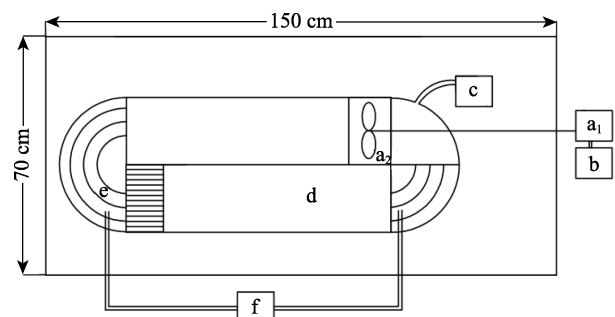


图1 鱼类游泳能力测试水槽

Fig.1 Annular flume for testing fish swimming capability

- $a_1$  和  $a_2$ : 动力部分; b: 动力控制部分; c: 水泵;  
d: 游泳区域; e: 参数检验部位; f: 冷暖机  
 $a_1$  and  $a_2$ : Power part; b: Control part; c: Water pump;  
d: Swimming area; e: Parameter detection area;  
f: Heating and cooling machine

假设游泳速度与水流速度相等,通过调频器控制电机转速使水流速度发生变化,环形槽内多孔整流器使游泳区域各处水流速度为均匀流,采用流速仪对不同叶轮转数下的流速进行测量,最终通过控制叶轮转数得出鱼类游泳速度。整个环形实验水槽采用透明的树脂玻璃,从侧面和顶部均能清晰地观察鱼类游泳行为。

#### 1.4 临界游泳速度的测定

实验中临界游泳速度的测定采用 Brett 流速递增法(1964)。正式实验开始之前,先进行预估实验鱼的绝对临界游泳速度( $U_c$ )。选取1尾健康且无损伤的实验鱼放入水槽,在低流速(5 cm/s)的环境中适应1 h,消除鱼体转移过程中产生的胁迫。之后每2 min增加0.4 BL/s的速度,直至实验鱼疲劳无法游动,此时流速即为  $U_c$ ,从而确定正式实验时绝对临界游泳速度实际值(absolute critical swimming speed,  $U_a$ )的增量  $\Delta U$  (15%  $U_c$ )。

正式实验时,将实验鱼在低流速(5 cm/s)中适应1 h,每隔5 min增加流速0.5 BL/s至60%  $U_c$ ,后每隔15 min增加流速15%  $U_c$ ,直至实验鱼疲劳力竭。判定力竭的方法为实验鱼被水流冲至游泳槽尾且无游动状态,贴在钢丝网超过20 s以上。在实验过程中,利用冷暖机对环形实验水槽进行控温且同步监测溶氧。本研究中,实验鱼体长的最大横截面积不超过游泳水槽横截面积的10%,对鱼类游泳行为无影响,则  $U_{crit}^a$  无需校正(Jain, 2003)。临界游泳速度( $U_{crit}$ )计算公式如下:

$$U_{crit}^a = U_{max} + (t/T)\Delta U,$$

$$U_{crit}^r = U_{crit}^a / BL$$

式中,  $U_{crit}^a$  为绝对临界游泳速度,  $U_{max}$  为鱼类在设定时间段的最大游泳速度(cm/s),  $t$  为未完成设定时间的持续游泳时间( $t < 15$  min),  $T$  为设定时间(15 min),  $\Delta U$  是设定时间内速度增量(15%  $U_c$ ),  $U_{crit}^r$  是相对临界游泳速度, BL 为实验鱼的体长(cm)。

#### 1.5 数据分析

实验数据使用 Excel 2019 进行常规计算,采用 SPSS 21.0 进行数据分析比较。对全部相对临界游泳速度的观察值进行双因素协方差分析(two-way ANCOVA)。不同温度条件下的绝对临界游泳速度和相对临界游泳速度比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),利用 Duncan 法进行多重比较及显著性检验,显著性概率临界值为0.05。统计数值用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度梯度下四大家鱼的临界游泳速度比较

不同温度下“四大家鱼”临界游泳速度不同(表1)。水温为10℃时,青鱼相对临界游泳速度 [ $U_r$  为(3.93±0.24) BL/s] 最高,草鱼 [ $U_r$  为(3.50±0.48) BL/s]、鳊 [ $U_r$  为(2.22±0.18) BL/s] 次之,鲢最低 [ $U_r$  为(0.95±0.04) BL/s]; 水温为15℃时,草鱼相对临界游泳速度 [ $U_r$  为(7.38±0.08) BL/s] 最高,青鱼 [ $U_r$  为(6.73±0.25) BL/s]、鳊 [ $U_r$  为(3.03±0.47) BL/s] 次之,鲢 [ $U_r$  为(2.19±0.28) BL/s]

表1 不同温度下“四大家鱼”的临界游泳速度

Tab.1 The critical swimming speed of four major Chinese carps under different temperature

温度 Temperature		青鱼 <i>M. piceus</i>	草鱼 <i>C. idellus</i>	鳊 <i>H. molitrix</i>	鲢 <i>A. nobilis</i>
10℃	重复数 Repeat	4	4	4	4
	体长 Length/cm	9.95±0.85	6.83±0.72	11.95±0.07	15.27±0.31
	体重 Weight/g	17.48±3.46	6.61±2.43	29.16±1.01	63.18±0.86
	绝对临界游泳速度 $U_a$ Absolute critical swimming speed/(cm/s)	39.08±2.49 <sup>a</sup>	23.91±4.95 <sup>c</sup>	11.4±0.62 <sup>d</sup>	33.95±3.08 <sup>b</sup>
	相对临界游泳速度 $U_r$ Relative critical swimming speed/(BL/s)	3.93±0.24 <sup>a</sup>	3.50±0.48 <sup>b</sup>	0.95±0.04 <sup>d</sup>	2.22±0.18 <sup>c</sup>
	15℃	重复数 Repeat	4	4	4
体长 Length/cm		10.03±0.64	6.05±0.72	11.53±0.31	15.50±1.22
体重 Weight/g		18.97±2.55	4.66±1.41	27.37±2.40	68.56±15.51
绝对临界游泳速度 $U$ Absolute critical swimming speed/(cm/s)		67.50±2.09 <sup>a</sup>	44.64±5.47 <sup>b</sup>	25.29±3.44 <sup>c</sup>	47.01±8.43 <sup>b</sup>
相对临界游泳速度 $U_r$ Relative critical swimming speed/(BL/s)		6.73±0.25 <sup>b</sup>	7.38±0.08 <sup>a</sup>	2.19±0.28 <sup>d</sup>	3.03±0.47 <sup>c</sup>



续表

温度 Temperature		青鱼 <i>M. piceus</i>	草鱼 <i>C. idellus</i>	鲢 <i>H. molitrix</i>	鳊 <i>A. nobilis</i>
20℃	重复数 Repeat	4	4	4	4
	体长 Length/cm	9.93±0.96	8.08±0.38	8.30±0.90	15.03±0.76
	体重 Weight/g	19.45±4.12	10.05±1.87	10.18±2.49	59.89±12.22
	绝对临界游泳速度 $U_a$ Absolute critical swimming speed/(cm/s)	85.13±6.79 <sup>a</sup>	79.66±23.11 <sup>a</sup>	42.83±0.95 <sup>b</sup>	59.31±3.13 <sup>b</sup>
	相对临界游泳速度 $U_r$ Relative critical swimming speed/(BL/s)	8.57±0.95 <sup>a</sup>	9.86±2.91 <sup>a</sup>	5.16±0.63 <sup>b</sup>	3.95±0.23 <sup>b</sup>
	25℃	重复数 Repeat	4	4	4
体长 Length/cm		9.73±0.88	8.30±0.59	8.83±1.15	15.95±0.85
体重 Weight/g		15.65±5.17	10.52±2.17	12.77±4.28	71.58±10.96
绝对临界游泳速度 $U_a$ Absolute critical swimming speed/(cm/s)		79.98±1.11 <sup>a</sup>	75.44±5.99 <sup>a</sup>	49.10±13.96 <sup>b</sup>	63.72±2.74 <sup>a</sup>
相对临界游泳速度 $U_r$ Relative critical swimming speed/(BL/s)		8.22±0.78 <sup>a</sup>	9.09±0.93 <sup>a</sup>	5.56±1.15 <sup>b</sup>	3.99±0.20 <sup>c</sup>
30℃		重复数 Repeat	4	4	4
	体长 Length/cm	9.03±1.37	7.55±0.48	8.90±0.68	15.90±0.89
	体重 Weight/g	14.00±5.24	7.87±1.67	9.90±0.89	68.32±13.95
	绝对临界游泳速度 $U_a$ Absolute critical swimming speed/(cm/s)	89.78±14.92 <sup>a</sup>	79.69±12.19 <sup>a</sup>	41.54±7.63 <sup>b</sup>	75.67±4.05 <sup>a</sup>
	相对临界游泳速度 $U_r$ Relative critical swimming speed/(BL/s)	9.94±1.65 <sup>a</sup>	10.55±2.07 <sup>a</sup>	4.68±0.58 <sup>b</sup>	4.76±0.16 <sup>b</sup>

注：同一行中标有不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Values with the different letters in the same line are significantly different ( $P<0.05$ )

最低；常温条件下(20℃、25℃和30℃)，4种鱼的相对临界游泳速度均以草鱼[ $U_r$ 为(9.83±0.73) BL/s]最高，青鱼[ $U_r$ 为(8.91±0.91) BL/s]、鲢[ $U_r$ 为(5.13±0.48) BL/s]次之，鳊[ $U_r$ 为(4.23±0.46) BL/s]最低。根据表1中不同温度梯度下临界游泳速度变化可知，草鱼的临界游泳速度随温度升高增加最快。

## 2.2 温度与种类对“四大家鱼”相对临界游泳速度的影响

以“四大家鱼”的体长作为协变量，温度和种类为固定变量，对实验得到的所有相对临界游泳速度进行双因素协方差分析。结果显示，体长对四大家鱼的相对临界游泳速度无显著影响( $P>0.05$ )，温度与种类及二者的交互作用均会对四大家鱼的相对临界游泳速度有显著影响( $P<0.05$ )(表2)。

## 2.3 “四大家鱼”临界游泳速度的变化

水温在10℃~20℃范围内，“四大家鱼”的绝对临界游泳速度和相对临界游泳速度均随水温升高而

增大。当水温达到20℃后，“四大家鱼”的绝对临界游泳速度和相对临界游泳速度基本趋于稳定，可以看出，水温在20℃时，“四大家鱼”的游泳能力已达到其最好水平。总体上，低温条件下(10℃和15℃)“四大家鱼”的临界游泳速度均极显著低于常温条件下(20℃、25℃和30℃)( $P<0.01$ )(图2)。

表2 温度与种类对“四大家鱼”相对临界游泳速度影响的双因素协方差分析

Tab.2 Two-way ANOVA analysis of the influence of temperature and species on the relative critical swimming speed of the four major Chinese carps

因子 Factors	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
体长 Body length	1	2.293	2.262	0.138
种类 Species	3	55.019	54.280	0
温度 Temperature	4	53.794	53.071	0
种类×温度 Species×temperature	12	3.565	3.517	0.001

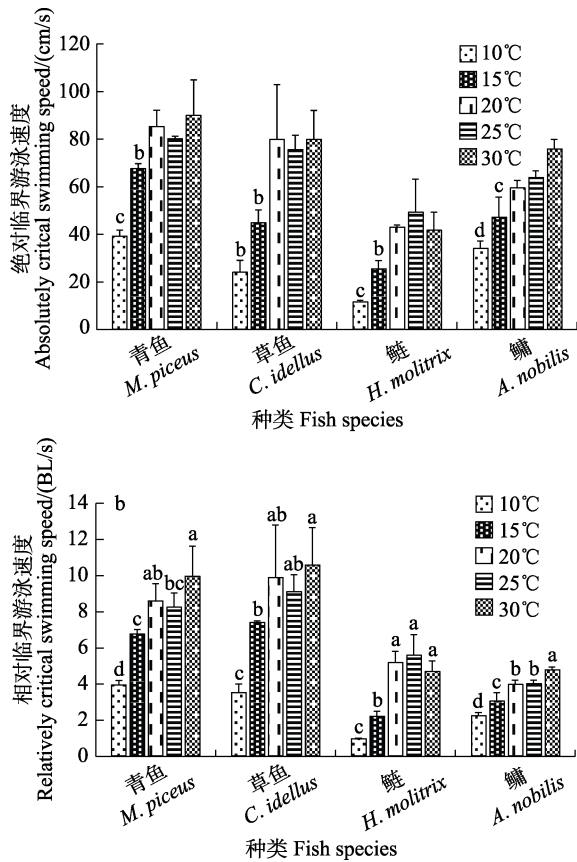


图2 “四大家鱼”在不同温度梯度下临界游泳速度的比较

Fig. 2 Comparison of the critical swimming speed of the four major home fishes under different temperature gradients

- a: “四大家鱼”在不同温度梯度下绝对临界游泳速度( $U_a$ )比较; b: “四大家鱼”在不同温度梯度下相对临界游泳速度( $U_r$ )比较; 不同小写字母 a、b、c 和 d 为数据间差异显著( $P < 0.05$ )。黑线代表标准差
- a: The absolute critical swimming speed ( $U_a$ ) of four major home fishes under different temperature gradients;  
 b: The relative critical swimming speed ( $U_r$ ) of four major home fishes under different temperature gradients;  
 Different lowercase letters a, b, c, and d show significant difference between the data ( $P < 0.05$ ).  
 Black bars refer to standard deviations

### 3 讨论

#### 3.1 温度对鱼类临界游泳速度的影响

温度会直接或间接引起鱼类生理特性和功能的变化, 从而对鱼类的游泳能力产生影响(蒋清等, 2016)。大量研究表明, 鱼类的临界游泳速度与温度呈“线性”(Jain, 2003)或“钟形”(Kokita *et al.*, 2002)的变化关系。“线性”是指随温度的上升, 临界游泳速度不断增大, “钟形”是指达到最适温度前临界游泳速度随水温的升高而增大, 在处于最适温度范围内呈现平台期, 超

过鱼类最适温度范围随温度升高而减小, 本研究中, 温度与临界游泳速度的关系属于后者。鱼类作为变温动物, 在适温条件下, 其代谢水平随温度的升高而增强(刘玲等, 2018)。Randall 等(1991)研究表明, “四大家鱼”为温水性鱼类, 其生长适宜温度为  $20^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ , 在常温条件下鱼类的临界游泳速度显著高于低温(Guderley, 2004)。本研究与上述的研究结论一致, 在低温时“四大家鱼”的临界游泳速度较低, 随着温度的升高其临界游泳速度显著增加。其可能原因是鱼类有氧运动受肌肉收缩力影响, 适温环境有助于提高鱼体肌细胞线粒体功能, 包括线粒体数量的增加、内嵴构造的改变、酶活性和细胞膜流动性的增加等(Randall *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1995)及提升腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、磷酸肌酸(PCr)和葡萄糖(Glc)等物质代谢底物浓度水平, 增强氧化磷酸化效率, 从而提高鱼类游泳能力(Kieffer, 2000; Pang *et al.*, 2011)。温度对鱼类游泳能力影响还同水的物理特性(黏度和密度)有关, 随着温度升高, 水的黏稠度逐渐变小, 故体型相同的鱼类在常温水体运动的阻力小于低温水体(闫冠杰, 2012)。

#### 3.2 “四大家鱼”的临界游泳速度

不同水温条件下, 青鱼、草鱼、鲢和鳙的游泳能力不同(涂志英, 2012)。本研究中, 低温条件下( $10^{\circ}\text{C}$  和  $15^{\circ}\text{C}$ ), 4 种鱼的相对临界游泳速度均以草鱼 [ $U_r$  为  $(5.43 \pm 1.97)$  BL/s] 最高, 青鱼 [ $U_r$  为  $(5.34 \pm 1.42)$  BL/s]、鳙 [ $U_r$  为  $(2.616 \pm 0.52)$  BL/s] 次之, 鲢 [ $U_r$  为  $(1.571 \pm 0.65)$  BL/s] 最低; 常温条件下( $20^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$  和  $30^{\circ}\text{C}$ ), 4 种鱼的相对临界游泳速度均以草鱼 [ $U_r$  为  $(9.83 \pm 0.73)$  BL/s] 最高, 青鱼 [ $U_r$  为  $(8.91 \pm 0.91)$  BL/s]、鲢 [ $U_r$  为  $(5.13 \pm 0.48)$  BL/s] 次之, 鳙 [ $U_r$  为  $(4.23 \pm 0.46)$  BL/s] 最低。

鱼类形态特征在一定程度上决定了该种类的游泳能力(付翔等, 2020; 何大仁等, 1998; Fu *et al.*, 2014)。本研究中, 青鱼和草鱼的鱼体呈圆筒形, 鲢和鳙体侧扁, 结果显示, 青鱼和草鱼的临界游泳速度高于鲢和鳙。相关研究表明, 长江流域的圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*)、异鳔鳅鲃 (*Xenophysogobio boulengeri*) 等圆筒形鱼类的临界游泳速度都普遍高于胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*)、鳊等侧扁形鱼类(表 3)。因此, 相比侧扁形的鲢、鳙, 圆筒形的青鱼和草鱼在游泳运动中受到的阻力更小, 游泳速度快, 有助于灵活的躲避敌害。另外, 鱼类在游泳运动中自身产生的生理反应也会造成鱼类种间游泳能力产生差异(Via *et al.*, 1989; Milligan *et al.*, 1987)。关于青鱼、

表3 长江流域几种不同体形鱼类的临界游泳速度比较  
Tab.3 Comparison of critical swimming speeds of fishes with different body types in Yangtze River

体形 Body type	种名 Fish name	温度 Temperature/°C	体长 Body length/cm	$U_{crit}^a$ /(cm/s)	$U_{crit}^r$ /(BL/s)	来源 Source
圆筒形	圆口铜鱼 <i>C. guichenoti</i>	25	14.7~19.3	—	7.37	涂志英, 2012
	异鳔鳅 <i>X. boulengeri</i>	18.9~24.3	6.6~11.0	65.8~85.5	8.4~10.7	丁少波等, 2020
	光倒刺鲃 <i>Spinibarbus hollandi</i>	22±1	11.35±5.05	112.55±25.36	10.45±2.39	汪玲珑等, 2016
	青鱼 <i>M. piceus</i>	20±1	9.93±0.96	85.13±6.79	8.57±0.95	本研究 This study
	草鱼 <i>C. idellus</i>	20±1	8.08±0.38	79.66±23.11	9.86±2.91	本研究 This study
侧扁形	胭脂鱼 <i>M. asiaticus</i>	18.9~24.3	9.7~23.8	70.3~95.1	4.0~5.4	丁少波等, 2020
	鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	28±1	28.88±1.55	65.92±3.88	2.29±0.14	段辛斌等, 2015
	鳊 <i>P. pekinensis</i>	18	6.92±0.12	—	7.79±0.23	杨阳等, 2013
	鲢 <i>H. molitrix</i>	20±1	8.30±0.90	42.83±0.95	5.16±0.63	本研究 This study
	鳙 <i>A. nobilis</i>	—	15.03±0.76	59.31±3.13	3.95±0.23	本研究 This study

草鱼、鲢和鳙血液生化指标和肌肉功能等生理参数对游泳能力的影响还有待进一步研究。

### 3.3 鱼类游泳行为与鱼道设计

体长因子和环境温度对鱼类的游泳行为具有较大影响(李会锋, 2016)。一般而言, 鱼类的绝对临界游泳速度随着体长增大而增加, 相对临界游泳速度随着体长增大而减小, 例如, 鲫(*Carassius auratus auratus*) (段辛斌等, 2015)、拟大比目鱼(Stobutzki, 1998)、条纹鲈(*Morone saxatilis*) (Peterson *et al*, 2001)等临界游泳速度都符合这种规律。在水温未达到最适宜鱼类游泳条件时, 鱼类的临界游泳速度也随着温度增加而增大(杨阳等, 2013)。本研究也表明, 在水温未达到 20°C 时, 四大家鱼游泳能力均随水温的升高而增强。

鱼类临界游泳速度是鱼道设计参考的重要指标, 能为鱼道池室的长度、最大流速及休息间距的设计提供参考。鱼道内水流速度控制在相应鱼类的临界游泳速度以下, 可确保鱼类长时间持续游泳运动而不会出现过度疲劳(石小涛等, 2011; 刘慧杰等, 2016)。在鱼道设计过程中, 针对不同的过鱼对象需设计不同的流速下限值, 通常以游泳能力最弱的物种作为极限流速的参考依据(李志敏等, 2018)。因此, 过鱼对象为“四大家鱼”时, 因夏季是其洄游的高峰期, 同时池室水流速度可调节范围大, 建议延长鱼道在夏季的开放时间, 同时将鳙的临界游泳速度作为鱼道设计的主要依据。

## 4 结论

水温是影响鱼类生理条件和游泳能力的重要生态因子。适宜的温度可以提高鱼类生理适应性, 从而影响鱼类游泳能力。本研究在低温条件下(10°C 和 15°C)“四大家鱼”的临界游泳速度与常温条件下(20°C、25°C 和 30°C)的临界游泳速度相比, 均存在极显著性差异( $P < 0.01$ ), 水温在 20°C 时, “四大家鱼”的游泳能力已达到其最好水平。通过比较“四大家鱼”的临界游泳速度, 青鱼和草鱼的游泳能力较强, 鲢和鳙的游泳能力相对较弱。当考虑过鱼对象为“四大家鱼”时, 建议延长鱼道在夏季的开放时间, 将鳙的临界游泳速度作为鱼道设计的主要依据。

## 参 考 文 献

- CHEN K Q, CHANG Z N, CAO X H, *et al*. Status and prospection of fish pass construction in China. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2012, 43(2): 182-188 [陈凯麒, 常仲农, 曹晓红, 等. 我国鱼道的建设现状与展望. *水利学报*, 2012, 43(2): 182-188]
- VIA J D, HUBER M, WIESER W, *et al*. Temperature-related responses of intermediary metabolism to forced exercise and recovery in juvenile *Rutilus rutilus* (Cyprinidae: Teleostei). *Physiological Zoology*, 1989, 62: 964-976
- DING S B, SHI J Y, HUANG B, *et al*. Swimming capability of six typical fish species from the lower Dadu River. *Journal of Hydroecology*, 2020, 41(1): 46-52 [丁少波, 施家月, 黄滨, 等. 大渡河下游典型鱼类的游泳能力测试. *水生态学*

- 杂志, 2020, 41(1): 46–52]
- DUAN X B, YU L X, LUO H W, *et al.* Critical swimming speed comparison of four species of fish at two acclimation temperature. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(4): 529–536 [段辛斌, 俞立雄, 罗宏伟, 等. 两种温度条件下四种鱼类临界游泳速度的比较. *动物学杂志*, 2015, 50(4): 529–536]
- FU S J, FU C, YAN G J, *et al.* Interspecific variation in hypoxia tolerance, swimming performance and plasticity in cyprinids that prefer different habitats. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217: 590–597
- FU X, FU C, FU S J. Comparison of swimming ability among five freshwater fish species. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(5): 1629–1635 [付翔, 付成, 付世建. 五种淡水鱼类幼鱼游泳能力的比较. *生态学杂志*, 2020, 39(5): 1629–1635]
- GUDERLEY H. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: Impact of temperature and energetic status. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139(3): 371–382
- HE D R, CAI H C. Fish ethology. Xiamen: Xiamen University Press, 1998, 216–222 [何大仁, 蔡厚才. 鱼类行为学. 厦门: 厦门大学出版社, 1998, 216–222]
- JAIN K E. Influence of seasonal temperature on the repeat swimming performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(20): 3569–3579
- JIANG Q, HUANG Y P, YUAN X, *et al.* Effects of fatigue and temperature on the swimming performance and metabolic rate of juvenile silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(6): 89–94 [蒋清, 黄应平, 袁喜, 等. 不同温度下重复疲劳运动对鲢幼鱼游泳能力及代谢率的影响. *水生态学杂志*, 2016, 37(6): 89–94]
- JOHNSON T P, BENNETT A F. The thermal acclimation of burst swimming escape performance in fish: An integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. *Journal of Experimental Biology*, 1995, 198: 2165–2175
- KIEFFER J D. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2000, 126(2): 161–179
- KOKITA T, MIZOTA T. Male secondary sexual traits are hydrodynamic devices for enhancing swimming performance in a monogamous filefish *Paramonacanthus japonicus*. *Journal of Ethology*, 2002, 20(1): 35–42
- LI H F. Swimming ability of carp and the application in the design of the fish way. Master's Thesis of Guangxi University, 2016, 15–26 [李会锋. 鲤科鱼游泳能力及其在鱼道设计中的应用. 广西大学硕士研究生学位论文, 2016, 15–26]
- LI S F, LU G Q, BERNATCHEZ L. Diversity of mitochondrial and in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(1): 82–93 [李思发, 吕国庆, L. 贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. *动物学报*, 1998, 44(1): 82–93]
- LI Z M, CHEN M X, JIN Z J, *et al.* Swimming ability of *Schizothorax irregularis* Ddy in Yarkand River. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(6): 1897–1902 [李志敏, 陈明曦, 金志军, 等. 叶尔羌河厚唇裂腹鱼的游泳能力. *生态学杂志*, 2018, 37(6): 1897–1902]
- LIU B B, WU Z Q, HU M L, *et al.* Spawning sites of four major Chinese carps in the middle reaches of Ganjiang River. *Jiangxi Science*, 2009, 27(5): 662–666 [刘彬彬, 吴志强, 胡茂林, 等. 赣江中游四大家鱼产卵场现状初步调查. *江西科学*, 2009, 27(5): 662–666]
- LIU H J, WANG C F, ZHU L K, *et al.* Comparative study of critical swimming speeds for juvenile silver and bighead carp. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(4): 63–69 [刘慧杰, 王从锋, 朱良康, 等. 鲢鳙幼鱼临界游泳速度的比较研究. *水生态学杂志*, 2016, 37(4): 63–69]
- LIU L, CHEN C, LI Y L, *et al.* Effects of short-term temperature stress on antioxidant and digestive enzymes of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 78–87 [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期温度胁迫对驼背鲈(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 78–87]
- MILLIGAN C L, WOOD C M. Muscle and liver intracellular acid-base and metabolite status after strenuous activity in the inactive, benthic starryflounder *Platichthys stellatus*. *Physiological Zoology*, 1987, 60: 54–68
- PANG X, CAO Z D, FU S J. The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 159: 253–260
- PANG X, YUAN X Z, CAO Z D, *et al.* The effects of temperature and exercise training on swimming performance in juvenile Qingbo (*Spinibarbus sinensis*). *Journal of Comparative Physiology, Part B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 2013, 183(1): 99–108
- PETERSON R H, HARMON P. Swimming ability of pre-feeding striped bass larvae. *Aquaculture International*, 2001, 9(5): 361–366
- RANDALL D J, BRAUNER C J. Effects of environmental factors on exercise in fish. *Journal of Experimental Biology*,

- 1991, 160(1): 113–126
- SHI X T, CHEN Q W, HUANG Y P, *et al.* Review on the methods to quantify fish's ability to cross velocity barriers in fish passage. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(22): 6967–6972 [石小涛, 陈求稳, 黄应平, 等. 鱼类通过鱼道内水流速度障碍能力的评估方法. *生态学报*, 2011, 31(22): 6967–6972]
- SHI Z H, XIE M M, PENG S M, *et al.* Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30–37 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲴(*Pampus argenteus*) 幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30–37]
- STOBUTZKI I C. Interspecific variation in sustained swimming ability of late pelagic stage reef fish from two families (Pomacentridae and Chaetodontidae). *Coral Reefs*, 1998, 17(2): 111–119
- TU Z Y. Research of swimming performance of several typical fish in the Yalong River. Master's Thesis of Wuhan University, 2012, 47–53 [涂志英. 雅砻江流域典型鱼类游泳特性研究. 武汉大学硕士研究生学位论文, 2012, 47–53]
- WANG L L, WANG C F, KOU F L, *et al.* Study of critical swimming speed of four species of fish from Beipanjiang River. *Journal of China Three Gorges University (Natural Sciences)*, 2016(38): 15–19 [汪玲珑, 王从锋, 寇方露, 等. 北盘江四种鱼类临界游泳速度研究. *三峡大学学报(自然科学版)*, 2016(38): 15–19]
- WANG P, GUI F K, WU C W. Research progress on measurements of fish swimming ability. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(5): 1137–1146 [王萍, 桂福坤, 吴常文. 鱼类游泳速度分类方法的探讨. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 1137–1146]
- YAN G J. Interspecific comparison in morphology and swimming performance within Cyprinidae. Master's Thesis of Chongqing Normal University, 2012, 19–23 [闫冠杰. 鲤科鱼类形态及游泳能力的种间比较. 重庆师范大学硕士研究生学位论文, 2012, 19–23]
- YANG Y, CAO Z D, FU S J. Effects of water temperature on the critical swimming speed and metabolic scope of juvenile *Parabramis pekinensis*. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(5): 1260–1264 [杨阳, 曹振东, 付世建. 温度对鳊幼鱼临界游泳速度和代谢范围的影响. *生态学杂志*, 2013, 32(5): 1260–1264]
- YANG Y, YAN Z M, CHEN J S. Studies on the ecological function of fish pathways. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(3): 65–67 [杨宇, 严忠民, 陈金生. 鱼道的生态廊道功能研究. *水利渔业*, 2006, 26(3): 65–67]
- YUAN X, LI L P, TU Z Y, *et al.* The effect of temperature on fatigue induced changes in physiology and swimming ability of juvenile *Aristichthys nobilis* (bighead carp). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 505–509 [袁喜, 李丽萍, 涂志英, 等. 温度对鳊幼鱼疲劳引起的生理变化和游泳能力的影响研究. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 505–509]
- ZENG L Q, CAO Z D, FU S J, *et al.* Effect of temperature on swimming performance in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2009, 153: 125–130

(编辑 陈 辉)



## Effect of Temperature Gradient on the Critical Swimming Speed of Four Major Chinese Carps

WANG Xiao<sup>1,2</sup>, LIAO Dongya<sup>3</sup>, YU Lixiong<sup>2</sup>, GAO Lei<sup>2</sup>,  
DUAN Xinbin<sup>2</sup>, CHEN Daqing<sup>2</sup>, SU Yungai<sup>4</sup>, OUYANG Shan<sup>1①</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China; 2. Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of the Upper-Middle Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei 430223, China; 3. Jiangxi Provincial Design & Research Institute of Water Conservancy & Hydropower, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 4. National Original Breeding Farm (NOBF) located in Jianli, Jianli, Hubei 433300, China)

**Abstract** Fishways are important ecological compensation measures that come with the construction of waterpower dams. Investigation of their swimming capability will provide the basis required for the design of fishery passage facilities. In this study, we used four major Chinese carp species to measure critical swimming speeds under five temperature gradients (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, and 30°C). The results showed that the relative critical swimming speeds of *Mylopharyngodon piceus*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Hypophthalmichthys molitrix*, and *Aristichthys nobilis* were (3.93±0.24)~(9.94±1.65) BL/s, (3.50±0.48)~(10.55±2.07) BL/s, (0.95±0.04)~(4.68±0.58) BL/s, and (2.22±0.18)~(3.95±0.23) BL/s, respectively, across 10°C~30°C. The absolute critical swimming speed and relative critical swimming speed of the four major Chinese carp species increased with the increase in water temperature at 10°C to 20°C. The absolute critical swimming speed and relative critical swimming speed reached a maximum at 20°C, and then tended to stabilize. The swimming capability at 20°C was significantly higher than that at 15°C and 10°C, but was not significantly different from that at 25°C and 30°C. In addition, the critical swimming speeds of *C. idellus* increased faster than that of the other three species of the four major Chinese carp, as the temperature increased. At the same temperature, the critical swimming speeds of *C. idellus* and *M. piceus* were similar, and significantly higher than those of *H. molitrix* and *A. nobilis* ( $P<0.01$ ). Based on the results of this study, we suggest that the opening time of the fishway should be extended in the summer in the year, and the critical swimming speed of *A. nobilis* should be taken as the main basis during fishway designing.

**Key words** Water temperature; Fishway; Swimming ability; Four major Chinese carps

① Corresponding author: OUYANG Shan, E-mail: ouys1963@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201013001

http://www.yykxjz.cn/

亢世华, 金显仕, 王俊. 中国产细纹狮子鱼的骨学和肌肉学研究. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 62–79

KANG S H, JIN X S, WANG J. Osteological and myological characteristics of *Liparis tanakae* from Chinese coasts. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 62–79

# 中国产细纹狮子鱼的骨学和肌肉学研究\*

亢世华<sup>1</sup> 金显仕<sup>1,2</sup> 王俊<sup>1,3①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室  
山东省渔业资源与生态环境重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;  
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 山东 青岛 266237)

**摘要** 本研究解剖了中国产细纹狮子鱼(*Liparis tanakae*)标本, 并详细描述了该物种的骨骼系统、骨骼肌系统及相关神经, 包括围眶骨、脑颅、颌骨、悬器和鳃盖骨、舌弓、鳃弓、肩带、腰带、中轴骨架和奇鳍支鳍骨、尾部骨架的 10 个部分骨骼, 以及颊肌、脑颅与悬器-鳃盖骨间肌肉、头部腹面肌肉、鳃弓肌肉、胸鳍肌肉、腹鳍肌肉、奇鳍相关肌肉、尾鳍肌肉的 8 个部分骨骼肌。阐明了骨学和肌肉学名词术语的更新和同物异名等情况, 并对舌弓展肌和鳃弓背面牵缩肌等部分进行中文命名。讲解了腹鳍吸盘的特殊构造及其运动机制, 以及颊肌的分化和功能。

**关键词** 骨学; 肌肉学; 细纹狮子鱼; 形态学; 鱼类解剖学

**中图分类号** Q954.54 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0062-18

细纹狮子鱼(*Liparis tanakae*)隶属于辐鳍鱼纲(Osteichthyes)、鲉形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼亚目(Cottoidei)、狮子鱼科(Liparidae)、狮子鱼属(*Liparis*), 是冷温性底层海洋鱼类, 分布于太平洋西北部, 在中国分布于渤海、黄海和东海(Nakabo, 2002; 金鑫波, 2006)。20 世纪 80 年代起, 细纹狮子鱼成为黄海鱼类群落的优势种(Jin *et al.*, 1996), 在生态系统中占据非常重要的地位(张波等, 2011)。国内外对细纹狮子鱼的研究主要围绕渔业资源与生态方面进行(单秀娟等, 2014; Myoung *et al.*, 2016), 而以骨骼和肌肉为主的解剖学研究却少之又少, 仅在狮子鱼科比较骨学研究中略有提及(Kido, 1988; Chernova, 2008)。

对鱼类骨骼肌肉进行精准描述, 能为系统发育、进化、形态功能学、动物医学等研究奠定基础。但国内对鱼类骨骼和肌肉的研究并不充足, 近些年只有几

篇涉及局部骨骼(如脑颅、咽颅、胸鳍等)的论文发表(如陈咏霞等, 2014; 杨太有等, 2014)。书籍教材中的解剖学知识也十分有限, 有些术语和翻译未及时更新, 内容不够清晰详实。本研究对黄海产细纹狮子鱼标本进行解剖, 详细描述细纹狮子鱼的骨骼、肌肉及相关神经的形态、位置和构造, 并将相关解剖学的中英文术语名词进行了简要叙述。

## 1 材料与方法

实验解剖采用中国水产科学研究院黄海水产研究所馆藏的细纹狮子鱼标本: YSFIRII-000287 (TL 185.5 mm, 35°N, 123°E)和 YSFIRII-000475 (TL 200.4 mm, 33°N, 124°E)。标本为 2018 年 10 月搭载该所“北斗”号科学调查船, 于黄海中南部海域采用拖网捕获的。标本经过福尔马林溶液固定和酒精保存液浸泡, 进行了形

\* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费(2020TD19)资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institute Basal Research Fund, CAFS (2020TD19)]. 亢世华, E-mail: kangsh@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2020-10-13, 收修改稿日期: 2020-12-19

态学检查和测量, 确保物种鉴定的准确性。先用阿利新蓝和茜素红对整个标本进行软骨和硬骨染色, 再在体式显微镜下解剖、观察并记录特征, 绘制成骨学和肌肉学图片, 并描述其形态构造, 阐述相关结构功能。

中文版骨学(Osteology)术语主要参照孟庆闻等(1994)和水柏年等(2019), 肌肉学(Myology)术语参照秉志等(1958)和孟庆闻等(1994)。现行英文版骨学术语主要参照 Kido (1988)和 Kawai (2017), 肌肉学术语主要参照 Winterbottom(1974)和 Endo 等(2017)。旧版英文术语主要参照 Tominaga (1968)和秉志等(1958)。神经解剖学(Neuroanatomy)术语主要参照秉志等(1959)和 Freihofner (1978)。

## 2 结果

### 2.1 骨学

**2.1.1 围眶骨(circumorbital bones)(图 1)** 鱼头部每侧有 4 块眶下骨(infraorbital, IO, 曾用英文名 suborbital 和 infraspheoid), 前 3 块位于眼的下方, 第 4 块位于眼的后方。它们构成的管状结构内通眶下管(infraorbital canal), 管道下方开口为上颌部黏液孔。

第 1 眶下骨(又名泪骨 lachrymal)前内侧关节面与腭骨前端、上颌骨头部后侧相接触, 内侧有一个关节面与侧筛骨的侧上关节头相接触。第 2 眶下骨紧密连接第 1 和第 3 眶下骨。第 3 眶下骨前部为管状, 后部为细长棒状, 称为眶下骨架(suborbital stay, SS), 横跨鱼的颊部, 末端接触前鳃盖骨中后部。第 4 眶下骨为长管状, 体积最小, 游离于其他骨头。

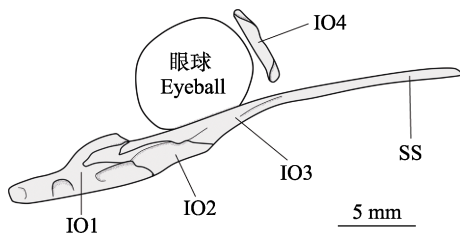


图 1 围眶骨外侧图

Fig.1 Lateral view of circumorbital bones

IO 1~4: 第 1~4 眶下骨; SS: 眶下骨架

IO 1~4: First to fourth infraorbitals; SS: Suborbital stay

**2.1.2 脑颅(neurocranium)(图 2)** 脑颅区骨骼包括左右成对的侧筛骨、额骨、顶骨、蝶耳骨、翼蝶骨、前耳骨、翼耳骨、上耳骨、后耳骨和侧枕骨, 以及不成对的前犁骨、中筛骨、上枕骨、基枕骨和副蝶骨。无第 6 眶下骨(又名膜蝶耳骨 dermosphenotic), 基蝶骨(basisphenoid)和鼻骨在此描述。

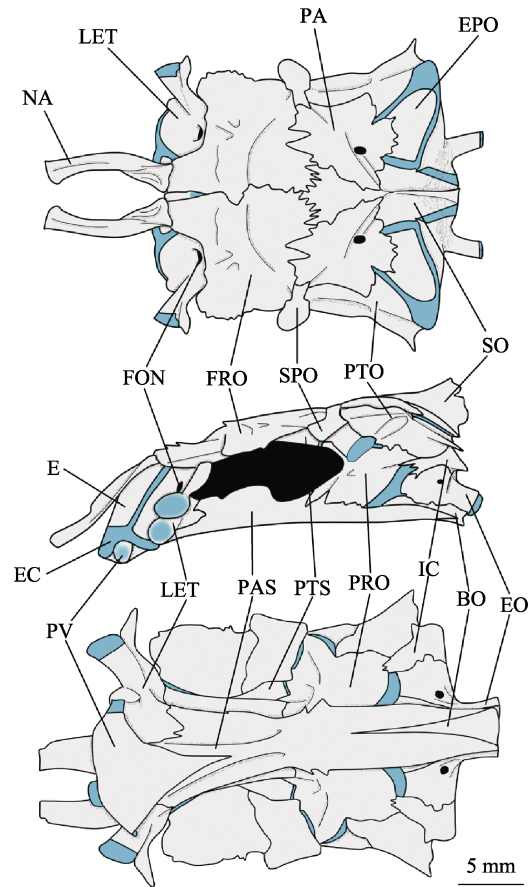


图 2 脑颅部的背面图(上)、侧面图(中)和腹面图(下)

Fig.2 Dorsal (upper), lateral (middle) and ventral (lower) views of neurocranium

BO: 基枕骨; E: 中筛骨; EC: 中筛骨软骨; EO: 侧枕骨; EPO: 上耳骨; FON: 嗅神经孔; FRO: 额骨; IC: 后耳骨; LET: 侧筛骨; NA: 鼻骨; PA: 顶骨; PAS: 副蝶骨; PRO: 前耳骨; PTO: 翼耳骨; PTS: 翼蝶骨; PV: 前犁骨; SO: 上枕骨; SPO: 蝶耳骨  
BO: Basioccipital; E: Ethmoid; EC: Ethmoid cartilage; EO: Exoccipital; EPO: Epiotic; FON: Foramen for olfactory nerve; FRO: Frontal; IC: Intercalar; LET: Lateral ethmoid; NA: Nasal; PA: Parietal; PAS: Parasphenoid; PRO: Prootic; PTO: Pterotic; PTS: Pterosphenoid; PV: Prevomer; SO: Supraoccipital; SPO: Sphenotic

鼻骨(nasal, NA)近长方形片状, 具不完全管状结构, 位于头部最前端, 眶上管(supraorbital canal)由额骨通向鼻骨。

前犁骨(prevomer, PV, 又名 vomer)似三角形, 位于脑颅前端腹侧, 上接中筛骨软骨(ethmoid cartilage, EC)。

中筛骨(ethmoid, E, 又名 mesethmoid)位于脑颅前部中线处, 似长椭圆柱体, 前侧形成关节面, 接触吻软骨。

侧筛骨(lateral ethmoid, LET, 曾用名 parethmoid 和

ectoethmoid)如翼状,构成眼眶前缘,上有嗅神经穿过的嗅神经孔(foramen for olfactory nerve, FON),侧面有上下2个关节头,分别与第1眶下骨和颞骨关节面接触。

额骨(frontal, FRO)位于脑颅背面前半部分,构成眼眶上缘,上有眶上管和眶上连管(supraorbital commissure)的管道沟槽。

顶骨(parietal, PA)位于脑颅背面中央偏后区,呈锯齿边片状。侧线副神经支(ramus lateralis accessorius)从其孔穿出。紧密接合周围各骨。

蝶耳骨(sphenotic, SPO)位于脑颅中部外侧,构成眼眶后上缘,紧密接合周围各骨,在与前耳骨的接缝处形成关节窝,与舌颌骨前上部髁突接触。

翼蝶骨(pterospheoid, PTS, 曾用名 alisphenoid)位于眼眶内侧后上方,后方通过软骨带接前耳骨。

前耳骨(prootic, PRO)构成眼眶后缘以及耳囊的前侧和外侧面。

翼耳骨(pterotic, PTO)位于脑颅后外角,外侧面中部有一个小窝,与舌颌骨中上部髁突相接。

上耳骨(epiotic, EPO)位于脑颅后上方,与周围除顶骨外的骨头通过软骨带连接,后颞骨内臂通过强韧结缔组织与其连接。

后耳骨(intercalar, IC, 曾用名 opisthotic)位于脑颅外侧面的后部,与周围骨头紧密接合。

上枕骨(supraoccipital, SO)处于脑颅后上部中间,具一个向上凸起的不发达的脊。

侧枕骨(exoccipital, EO)位于脑颅后方中间部,左右侧枕骨后方构成枕骨大孔,神经从内穿出,其后端关节连接第1椎骨。

基枕骨(basioccipital, BO)是脑颅后下部骨头,其后端关节连接第1椎骨。

副蝶骨(paraspheoid, PAS)是脑颅底部中轴处长骨。它后部分叉于两侧,紧密贴合基枕骨。

**2.1.3 颌部(jaws)(图3)** 颌骨位于鱼头的前下部,脑颅外侧,包括上颌和下颌两部分。上颌包括前颌骨和上颌骨,下颌包括齿骨、关节骨和隅骨,皆左右成对。

前颌骨(premaxilla, PMX, 曾用名 premaxillary)呈L型,由上升突(ascending process, ACP)、关节突(articular process, ARP)、牙槽突(alveolar process, ALP)和吻软骨(rostral cartilage, RC)组成。牙槽突的腹面有齿板,吻软骨附着于上升突上,与中筛骨及中筛骨软骨接触。

上颌骨(maxilla, MAX, 曾用名 maxillary)呈扁条状,前端膨大似半球面,前颌骨的关节突嵌合于其中。

齿骨(dentary, DEN)是下颌的前半部分,是深槽的V形骨,上方具齿板,后方关节骨和美克耳氏软骨(Meckelian cartilage, MEC, 又名麦克氏软骨)插入其深槽内。鳃盖下颌管(operculomandibular sensory canal)穿过该骨,向外有4个开口即为下颌部黏液孔。

关节骨(anguloarticular, ANG, 曾用名 articular 和 angular)是下颌的后半部分,后上方突起与方骨下端突起相嵌合。美克耳氏软骨附着于该骨内侧面,鳃盖下颌管穿过该骨。

隅骨(retroarticular, RA, 曾用名 angular)是一块类三角形骨头,紧密接合于关节骨上,上方有一美克耳氏板小骨(coronomeckelian, COM)很小,位于关节骨与美克耳氏软骨的夹缝间。

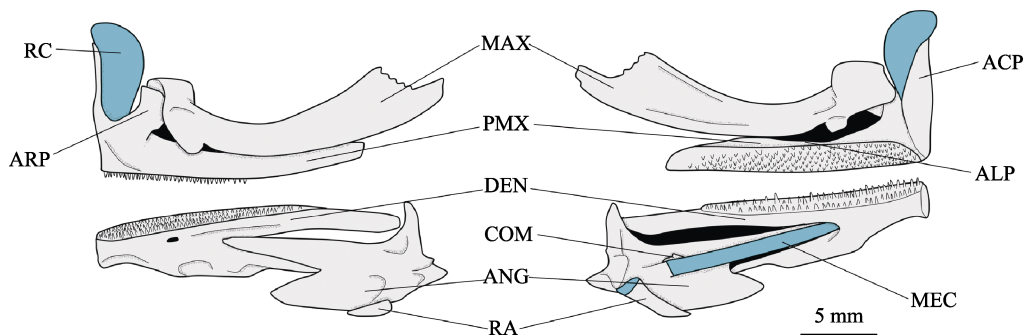


图3 上颌骨外侧面图(左上)和内侧面图(右上),下颌骨外侧面图(左下)和内侧面图(右下)  
Fig.3 Lateral (upper left) and medial (upper right) views of upper jaw, and lateral (lower left) and medial (lower right) views of lower jaw

ACP: 上升突; ALP: 牙槽突; ANG: 关节骨; ARP: 关节突; COM: 美克耳氏板小骨; DEN: 齿骨; MAX: 上颌骨;  
MEC: 美克耳氏软骨(麦克氏软骨); PMX: 前颌骨; RA: 隅骨(后关节骨); RC: 吻软骨  
ACP: Ascending process; ALP: Alveolar process; ANG: Anguloarticular; ARP: Articular process; COM: Coronomeckelian;  
DEN: Dentary; MAX: Maxilla; MEC: Meckelian cartilage; PMX: Premaxilla; RA: Retroarticular; RC: Rostral cartilage



**2.1.4 悬器和鳃盖骨(suspensorium and opercular bones)(图 4)** 悬器在脑颅的左右两侧,下部被上颌覆盖,下接舌弓,包括腭骨、翼骨+中翼骨复合体、后翼骨、舌颌骨、方骨和续骨。鳃盖骨接于悬器后方,是构成鳃孔的重要部分,包括前鳃盖骨、鳃盖骨、下鳃盖骨和间鳃盖骨,皆左右成对。

腭骨(palatine, PAL)似扭曲的三角形,位于悬器最前部,其前端有一软骨盖,与上颌骨、第1眶下骨的艺术面相接触。其内侧有一关节面与侧筛骨下关节头接触。

翼骨+中翼骨复合体是由翼骨(ectopterygioid, ECP, 曾用名 pterygioid)和中翼骨(endopterygioid, ENP, 曾用名 mesopterygioid)融合而成,似梯形片状,其后下方通过软骨带连方骨(不接触),此软骨带向前延伸,横贯本骨外侧面中部。

后翼骨(metapterygioid, MEP)呈近似矩形的薄片状,与舌颌骨的接合处有一神经孔。

舌颌骨(hyomandibula, HYO)呈倒 L 形,下部内

侧通过软骨带连接续骨和间舌骨。舌颌骨的上方有2个髁突,与脑颅侧面2个小窝接触;向后延伸的长柄末端有第3个髁突,与鳃盖骨前端的凹槽接触。

方骨(quadrate, QUA)呈三角形,其内侧面有一个凹槽,续骨的下部插入其中。

续骨(symplectic, SYM)是上下皆有软骨盖的棒状骨头,其后与前鳃盖骨之间有一个大间隙。

前鳃盖骨(preopercle, POP)是鳃盖骨中最大的,呈弯月状。鳃盖下颌管穿过该骨。

鳃盖骨(opercle, 又称主鳃盖骨, OPC)呈细长三角形,下方内侧与下鳃盖骨接触。

下鳃盖骨(subopercle, SOP, 又名 infraopercle)呈 V 形,两枝都较细长。

间鳃盖骨(interopercle, IOP)很细长,位于前鳃盖骨的后方,下鳃盖骨前方和鳃盖骨下方,游离于其他骨头,仅靠肌肉和韧带连接。

**2.1.5 舌弓(hyoid arch)(图 5)** 舌弓位于下颌的内侧、下鳃弓的外侧,后上方连接悬器内侧,包括下舌

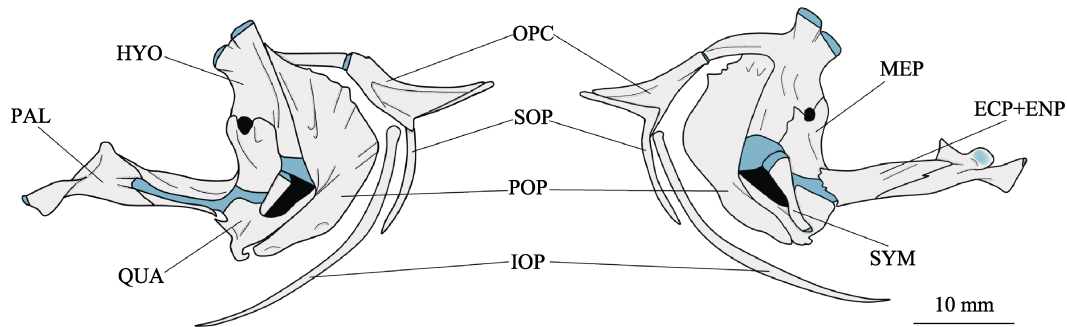


图 4 悬器和鳃盖骨的外侧图(左)和内侧图(右)

Fig.4 Lateral (left) and medial (right) views of suspensorium and opercular bones

ECP+ENP: 翼骨+中翼骨复合体; HYO: 舌颌骨; IOP: 间鳃盖骨; MEP: 后翼骨; OPC: (主)鳃盖骨; PAL: 腭骨; POP: 前鳃盖骨; QUA: 方骨; SOP: 下鳃盖骨; SYM: 续骨  
ECP+ENP: Ectopterygioid+endopterygioid; HYO: Hyomandibula; IOP: Interopercle; MEP: Metapterygioid; OPC: Opercle; PAL: Palatine; POP: Preopercle; QUA: Quadrate; SOP: Subopercle; SYM: Symplectic

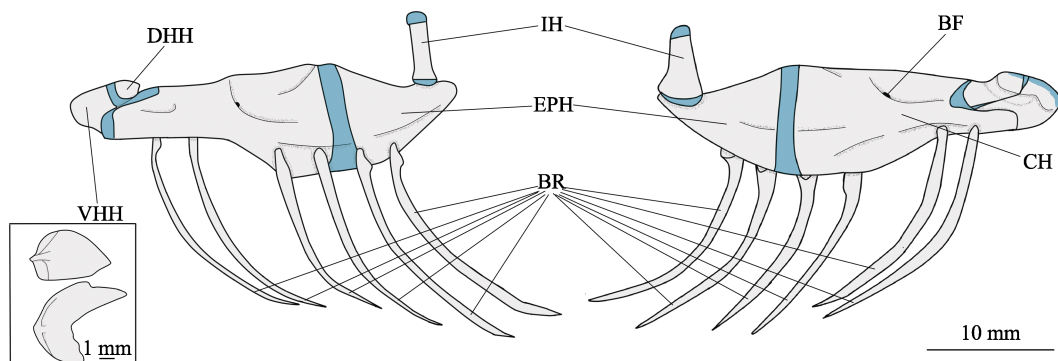


图 5 舌弓骨的外侧图(左)和内侧图(右), 尾舌骨(左下)

Fig.5 Lateral (left) and medial (right) views of hyoid arch, urohyal (lower left)

BF: Beryciform foramen; BR: 鳃条骨; CH: 角舌骨; DHH: 上下舌骨; EPH: 上舌骨; IH: 间舌骨; VHH: 下舌骨  
BF: Beryciform foramen; BR: Branchiostegal ray; CH: Ceratohyal; DHH: Dorsal hypohyal; EPH: Epiphyal; IH: Interhyal; VHH: Ventral hypohyal



骨、角舌骨、上舌骨、间舌骨、鳃条骨和尾舌骨。无基舌骨(basihyal)。仅尾舌骨不成对。

下舌骨(hypohyal)位于舌弓的前部,由一条软骨带分为上下舌骨(dorsal hypohyal, DHH)和上下舌骨(ventral hypohyal, VHH)。左右侧下舌骨于前端通过韧带紧紧连接。

角舌骨(ceratohyal, CH)较大且厚,后方通过软骨带连接上舌骨,前下方内侧和后下方外侧分别附着2条鳃条骨。其中央位置有1个孔(beryciform foramen, BF),舌动脉从其中穿过。

上舌骨(epihyal, EPH)呈三角形,后上方的凹槽与间舌骨下部软骨盖相接触,下方外侧附着2条鳃条骨。

间舌骨(interhyal, IH)呈棒状,上下都有软骨盖,下方与上舌骨的凹槽相接触,上方与舌颌骨下软骨带相接触。

鳃条骨(branchiostegal ray, BR)每侧有6条,皆呈细长弧形,上端附着于角舌骨或上舌骨,下端游离,靠肌肉拉动张合。

尾舌骨(urohyal, URO)位于下舌骨前端和第1基鳃骨的下方,呈半月状。

**2.1.6 鳃弓(branchial arches)**(图6) 鳃弓分为上下2部分,上鳃弓位于脑颅后下方、鳃盖的内侧,下鳃弓位于舌弓内侧。上鳃弓包括上鳃骨和咽鳃骨,下鳃弓包括基鳃骨、下鳃骨、角鳃骨和中央软骨。除基鳃骨和中央软骨外,其余皆左右成对。

基鳃骨(basibranchial, BB)位于下鳃弓中线处,也是口腔腹面的中线处。第1基鳃骨为硬骨,位于最前端,呈较小的卵形,覆盖于尾舌骨上,后方接触由第2和第3基鳃骨融合形成的第2+3基鳃骨复合体,该复合体为软骨,呈长圆柱状,向后接触中央软骨,其左右两侧腹面接触3对下鳃骨。

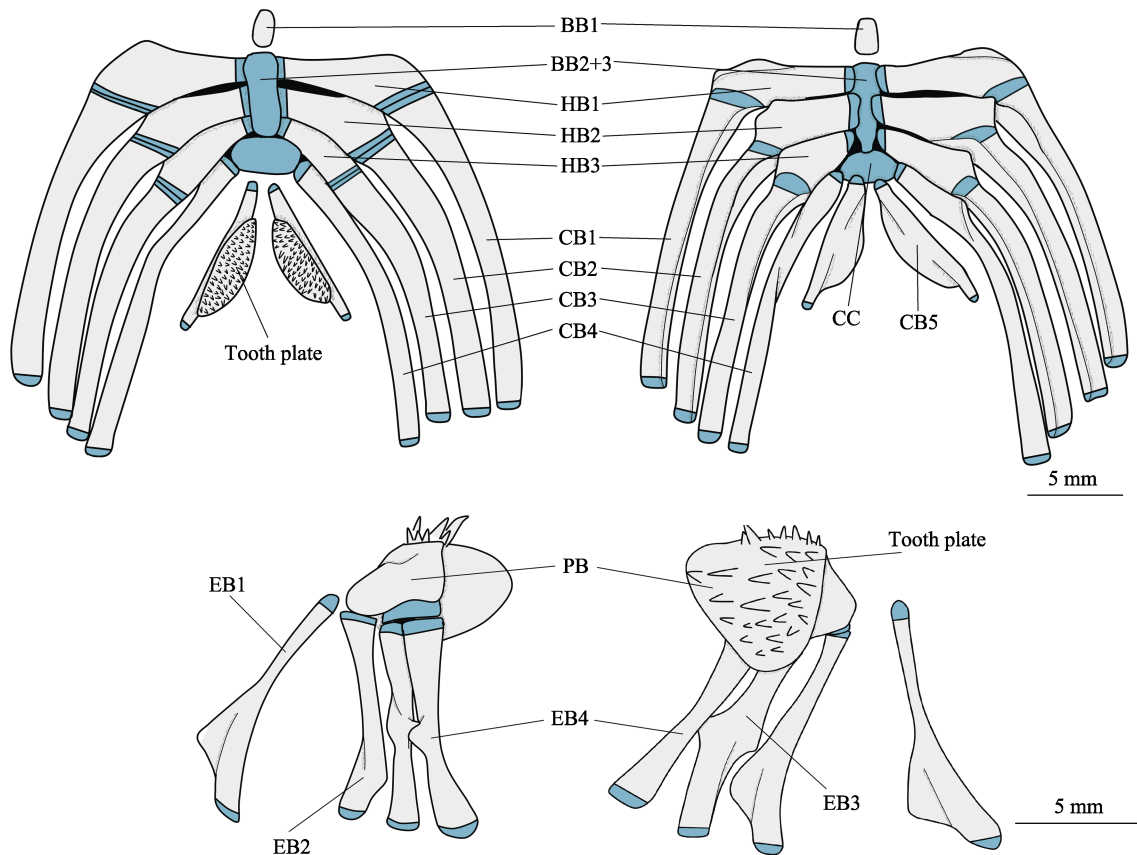


图6 下鳃弓骨的背侧图(左上)和腹侧图(右上),上鳃弓骨的背侧图(左下)和腹侧图(右下)

Fig.6 Dorsal (upper left) and ventral (upper right) views of lower branchial arch, and dorsal (lower left) and ventral (lower right) views of upper branchial arch

BB1: 第1基鳃骨; BB 2+3: 第2+3基鳃骨复合体; CB 1~5: 第1~5角鳃骨; CC: 中央软骨;

EB 1~4: 第1~4上鳃骨; HB 1~3: 第1~3下鳃骨; PB: 咽鳃骨; tooth plate: 齿板

BB1: First basibranchial; BB 2+3: Second+third basibranchial; CB 1~5: First to fifth ceratobranchials; CC: Central cartilage;

EB 1~4: First to fourth epibranchials; HB 1~3: First to third hypobranchials; PB: Pharyngobranchial

中央软骨(central cartilage, CC), 或被认作第4基鳃骨, 为椭圆状软骨, 与两侧第4和第5角鳃骨接触。

下鳃骨(hypobranchial, HB)共3对, 内侧端有软骨盖, 外边缘有软骨带。第1~3下鳃骨外侧分别与第1~3角鳃骨之间通过关节相连。

角鳃骨(ceratobranchial, CB)共5对。第1~3角鳃骨为长条状, 腹侧有凹槽, 后端以关节分别连接第1~3上鳃骨后端。第4角鳃骨呈弧形条状, 后端以关节连接第4上鳃骨后端。第5角鳃骨又名咽骨(pharyngeal bone), 背生有齿板(tooth plate), 附着咽齿(pharyngeal teeth), 后端游离。

上鳃骨(epibranchial, EB)共4对, 两端有软骨盖, 第1上鳃骨为细长棒状, 前端游离。第2上鳃骨呈略

粗的棒状, 前端与咽鳃骨外侧软骨接触。第3和第4上鳃骨的侧面分支彼此相连, 前端与咽鳃骨后部大软骨接触。

咽鳃骨(pharyngobranchial, PB)仅有1对。第1、2和4咽鳃骨缺失, 第3咽鳃骨发达且腹面生有大齿板。

**2.1.7 肩带(pectoral girdle)(图7)** 肩带位于鱼头部后方, 构成鳃孔的后缘, 与所承担的鳍条共同构成胸鳍的骨骼框架。该部位骨头皆左右成对, 每侧包括上颞骨、后颞骨、上匙骨、匙骨、肩胛骨、乌喙骨、和后匙骨各1块, 以及4块支鳍骨。肩胛骨、乌喙骨和支鳍骨都支撑鳍条, 连通的软骨带填充在肩胛骨、匙骨、乌喙骨、支鳍骨和鳍条之间。

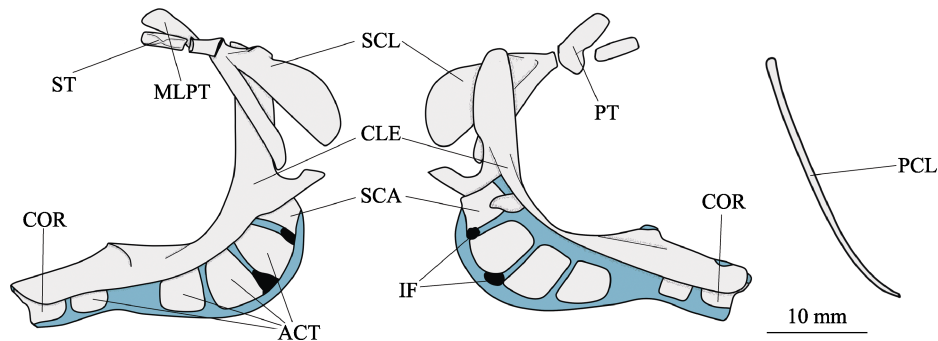


图7 肩带骨的外侧图(左)和内侧图(中), 后匙骨图(右)

Fig.7 Lateral (left) and medial (middle) views of pectoral girdle, and postcleithrum (right)

ACT: 支鳍骨; CLE: 匙骨; COR: 乌喙骨; IF: 支鳍骨间孔; PCL: 后匙骨; PT: 后颞骨;

SCA: 肩胛骨; SCL: 上匙骨; ST: 上颞骨; MLPT: 后颞骨内臂

ACT: Actinost; CLE: Cleithrum; COR: Coracoid; IF: Interradial foramen; PCL: Postcleithrum; PT: Posttemporal;

SCA: Scapula; SCL: Supracleithrum; ST: Supratemporal; MLPT: Medial limb of posttemporal

上颞骨(supratemporal, ST, 又名 extrascapular)位于肩带最上部, 具不完全管状结构, 连通翼耳骨背面与后颞骨的管道。下方贴合在翼耳骨背面后端。

后颞骨(posttemporal, PT)分内外2个部分, 外侧部分有沟槽结构, 经由上匙骨的感觉管通向前方; 内侧部分为长方形片状, 称为后颞骨内臂(medial limb of posttemporal, MLPT), 以强韧的结缔组织紧密贴于上耳骨及其后方软骨带背面。

上匙骨(supracleithrum, SCL, 曾用名 supraclavicle)的上部向后形成薄片状扇面, 有一沟槽供感觉管通过, 下部为长棒状, 贴于匙骨上半部分外侧。

匙骨(cleithrum, CLE, 曾用名 clavicle)是肩带最大的骨头, 呈弧形, 下部分别向内外两侧扩张形成片状板, 后接肩胛骨、乌喙骨和周围的软骨板, 形成的间隙供肩带肌肉附着。两侧匙骨在前端通过结缔组织相连。

肩胛骨(scapula, SCA)像缺了一角的正方形, 通过软骨带向前连接匙骨, 向下连接第1支鳍骨。肩胛骨孔(scapular foramen)由肩胛骨、匙骨和软骨带共同围成。

乌喙骨(coracoid, COR)位于肩带前下部, 并通过软骨带向后上方连接第4支鳍骨。

支鳍骨(actinost, ACT, 曾用名 radial)由上至下排列于匙骨下部的后侧, 皆由软骨带包围。第1支鳍骨上下各有1个支鳍骨间孔(interradial foramen, IF), 前3个支鳍骨和第4支鳍骨之间距离很大。

后匙骨(postcleithrum, PCL, 曾用名 postclavicle)很细长, 贴于匙骨和上匙骨的内侧, 后下部深入腹壁肌肉。

**2.1.8 腰带(pelvic girdle)(图8)** 腰带位于鱼头后下方腹面, 外观呈盘状, 其上部结构夹于左右匙骨之间。腹鳍骨骼包括1对腰骨、1对鳍棘和5对鳍条。

腰骨(pelvis, P, 又名 basipterygia)包括前上部的扇形板(fan-shaped plate, FP)和前下部的下腰骨突

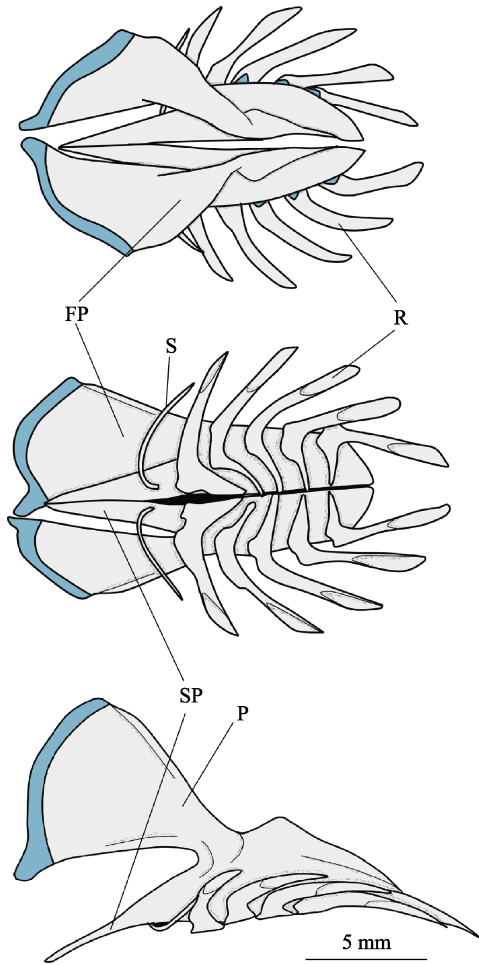


图8 腰带骨的背侧图(上)、腹侧图(中)和左侧图(下)  
Fig.8 Dorsal (upper), ventral (middle) and lateral (lower) views of pelvic fin

FP: 扇形板; P: 腰骨; R: 鳍条;  
S: 鳍棘; SP: 下腰骨突  
FP: Fan-shaped plate; P: Pelvis; R: Ray;  
S: Spine; SBP: Subpelvic process

(subpelvic process, SP), 以及后侧的担鳍部分。扇形板向上插入左右匙骨之间, 其上缘有软骨带, 软骨带顶端和底端分别以关节连接匙骨内侧中部和前下部的软骨位点。下腰骨突向前延伸, 并担起鳍棘, 鳍棘呈弯曲的缝合针状。后侧的担鳍部分左右相对, 其中间形成一个空隙, 附着肌肉, 两边外侧腹面各附着5条鳍条, 鳍条的末端特化成半筒状舌形结构。

**2.1.9 中轴骨架和奇鳍支鳍骨(axial skeleton and median fin supports)(图9~图10)** 中轴骨骼由椎骨、脉弓小骨和腹肋组成。

椎骨分为躯椎(abdominal vertebrae)和尾椎(caudal vertebrae)2种。前12节为躯椎, 包括椎体(centrum, CT)、髓弓(neural arch)、髓棘(neural spine, NS, 又名神经棘)和椎管, 除前2节之外都有椎体横突(parapophysis)。

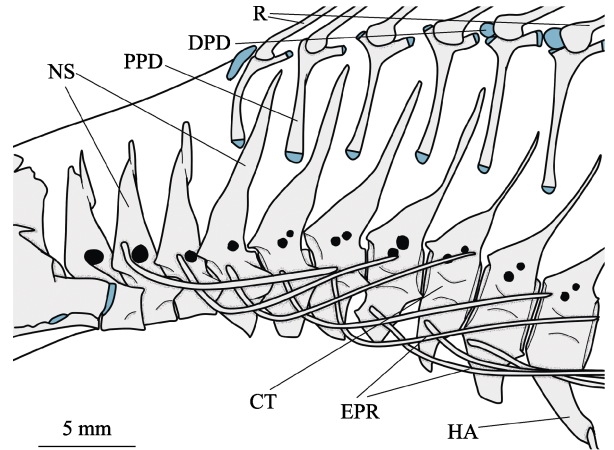


图9 背鳍前端与部分腹椎骨骼图  
Fig.9 Anterior bones of dorsal fin and some abdominal vertebrae

CT: 椎体; DPD: 背鳍末节; EPR: 脉弓小骨; HA: 脉弓;  
NS: 髓棘; PPD: 背鳍基节; R: 鳍条  
CT: Centrum; DPD: Distal pterygiophore of dorsal fin;  
EPR: Epipleural rib; HA: Haemal arch; NS: Neural spine;  
PPD: Proximal pterygiophore of dorsal fin; R: Ray

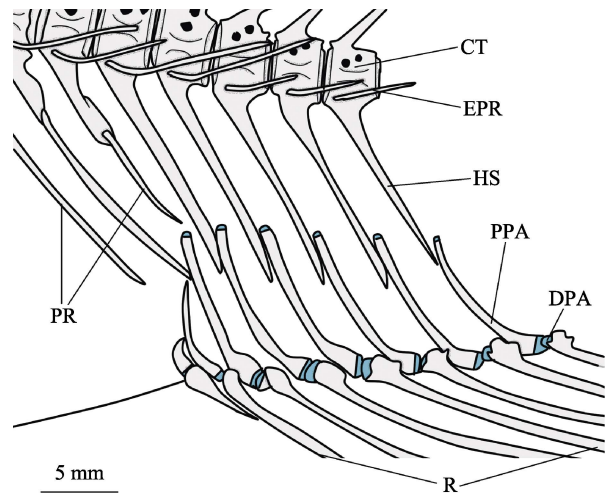


图10 臀鳍前端与相关脊椎骨骼图  
Fig.10 Anterior bones of anal fin and associated vertebrate

CT: 椎体; DPA: 臀鳍末节; EPR: 脉弓小骨; HS: 脉棘;  
PPA: 臀鳍基节; PR: 腹肋; R: 鳍条  
CT: Centrum; DPA: Distal pterygiophore of anal fin;  
EPR: Epipleural rib; HS: Haemal spine; PPA: Proximal pterygiophore of anal fin; PR: Pleural rib; R: Ray

后34节为尾椎, 下部有脉弓(haemal arch, HA)和髓棘(hemal spine, HS, 又名血管棘)。

脉弓小骨(epipleural rib, EPR, 曾用名 hypomerallia) 每侧有30条, 附着于第2~31椎骨。

腹肋(pleural rib, PR, 又名 ventral rib)每侧有3条, 分别附着于第10~12节椎骨的椎体横突下端。

奇鳍包括背鳍和臀鳍, 两鳍延长至尾鳍部, 主要



由不分枝的鳍条、末节(distal pterygiophore, 又名远位支鳍骨, 曾用名 distal radial)和基节(proximal pterygiophore, 又名近位支鳍骨, 曾用名 basal radial)组成, 无鳍棘。左右两侧鳍条将末节夹在中间, 无中节(medial pterygiophore, 又名间位支鳍骨, 曾用名 median radial)、上髓棘(supraneural)和终端骨(stay)。

背鳍末节(distal pterygiophore of dorsal fin, DPD)是位于背鳍鳍条和基节之间的小骨头, 自第6鳍条下开始出现。

背鳍基节(proximal pterygiophore of dorsal fin, PPD)是细长的棒状骨, 第1基节退化为软骨棒, 不支撑鳍条。第2基节位于第3和第4椎骨的神经棘之间, 之后与神经棘依次穿插排列。

臀鳍末节(distal pterygiophore of anal fin, DPA)形态结构与背鳍末节相似, 自第3鳍条下开始出现。

臀鳍基节(proximal pterygiophore of anal fin, PPA)形态结构与背鳍基节相似, 前2个臀鳍基节退化变小, 支撑鳍条。

**2.1.10 尾骨(caudal skeleton)(图 11)** 尾部骨架包括尾椎前椎体、尾上骨、上尾下骨、下尾下骨+准尾下骨复合体及它们周围的软骨和鳍条。无尾髓棘(uroneural, 又名尾神经骨)。

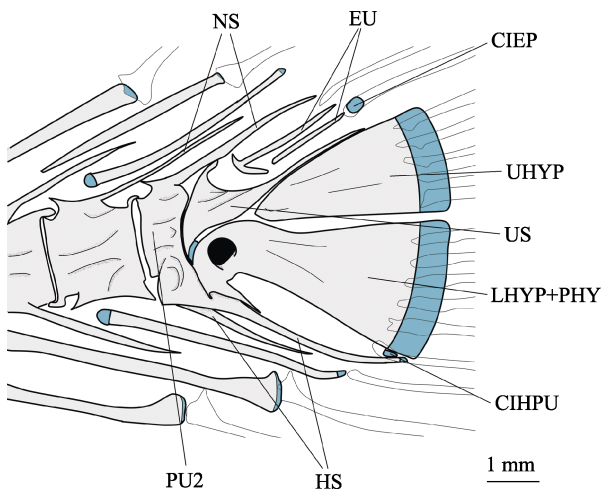


图 11 尾鳍骨骼图

Fig.11 Lateral view of caudal skeleton

CIEP: 尾上骨周软骨; CIHPU: 尾椎前脉棘周软骨;  
EU: 尾上骨; HS: 脉棘; LHYP+PHY: 下尾下骨+准尾下骨复合体; NS: 髓棘; PU2: 第2尾椎前椎体;  
UHYP: 上尾下骨; US: 尾杆骨

CIEP: Inter-epural cartilage; CIHPU: Inter-hemal spine cartilage of preural; EU: Epural; HS: Hemal spine; LHYP+PHY: Lower hypural+Parhypural; NS: Neural spine; PU2: Second preural centrum; UHYP: Upper hypural; US: Urostyle

尾椎前椎体包括尾杆骨(urostyle, US, 既第1尾椎前椎体 preural centrum 1)和第2尾椎前椎体(preural centrum 2, PU2)。尾杆骨是最后一节椎骨, 蝌蚪状, 末梢向斜上方伸出。第2尾椎前椎体的椎体较短, 上部接髓棘, 下部脉弓膨大接脉棘并支撑一条前倾鳍条, 脉棘末端有一块小软骨, 称为尾椎前脉棘周软骨(inter-hemal spine cartilage of preural, CIHPU)。

尾上骨(epural, EU)有2块, 位于尾骨后上部, 支撑2条前倾鳍条。较大的一块为倒T形, 较小的一块为棒状, 后方有一块椭圆形软骨, 即尾上骨周软骨(inter-epural cartilage, CIEP)。

尾下骨(hypural)分为2个部分, 上方的称为上尾下骨(upper hypural, UHYP), 下方的称为下尾下骨(lower hypural, LHYP), 下尾下骨与准尾下骨融合形成复合体(详见准尾下骨)。两部分骨板似三角形, 分别位于尾鳍水平线的上下两侧, 构成尾部扇形结构主体。

准尾下骨(parhypural)位于尾下骨下方, 第2尾椎前椎体脉棘的上方。准尾下骨与下尾下骨融合形成下尾下骨+准尾下骨复合体(LHYP+PHY), 准尾下骨侧突(parhypurapophysis)不明显, 骨板前部有一孔, 前下部有一个倒钩状骨片。

尾鳍鳍条不分叉, 分为2种: 前倾鳍条(procurent ray)和主鳍条(principal ray)。

## 2.2 肌肉学

**2.2.1 颊肌(cheek muscles)(图 12~图 13)** 颊肌位于鱼头两侧下颌及悬器区域, 控制口的闭合, 与摄食和呼吸动作相关, 主要指的是下颌收肌(adductor mandibulae, 曾用名 adductor mandibularis)系列肌肉。细纹狮子鱼的下颌收肌分化成4部分: 分肌1~3和分肌 $\omega$ 。分肌1又分为 $\alpha$ 和 $\beta$ 两部分, 皆左右对称出现。

下颌收肌分肌1(adductor mandibulae section 1)又称为头部分肌a(cephalic portion a), 分化为外侧的 $\alpha$ 和内侧的 $\beta$ 两个部分, 即下颌收肌分肌1 $\alpha$ (A1 $\alpha$ )和分肌1 $\beta$ (A1 $\beta$ )。A1 $\alpha$ 是鱼头最外侧的肌肉, 收缩使颌骨向后方移动, 起始于前鳃盖骨下部、眶下骨架下缘、舌颌骨下缘和方骨上缘, 止于原始韧带(primitive ligament, PL, 又名 ligamentum primordium)后部。A1 $\beta$ 向内分出一部分称为下颌收肌分肌1 $\beta'$ (A1 $\beta'$ ), 其肌腱与A1 $\beta$ 韧带前端融合, 向前连于上颌骨头部内侧, A1 $\beta$ 韧带的下端连于关节骨内侧, 该韧带的后部与原始韧带和A2的肌腱融合。A1 $\beta$ 起于舌颌骨和前鳃盖骨上部, 收缩使颌骨向后上方移动; A1 $\beta'$ 起于后翼骨, 收缩可使上颌骨向内向上运动。

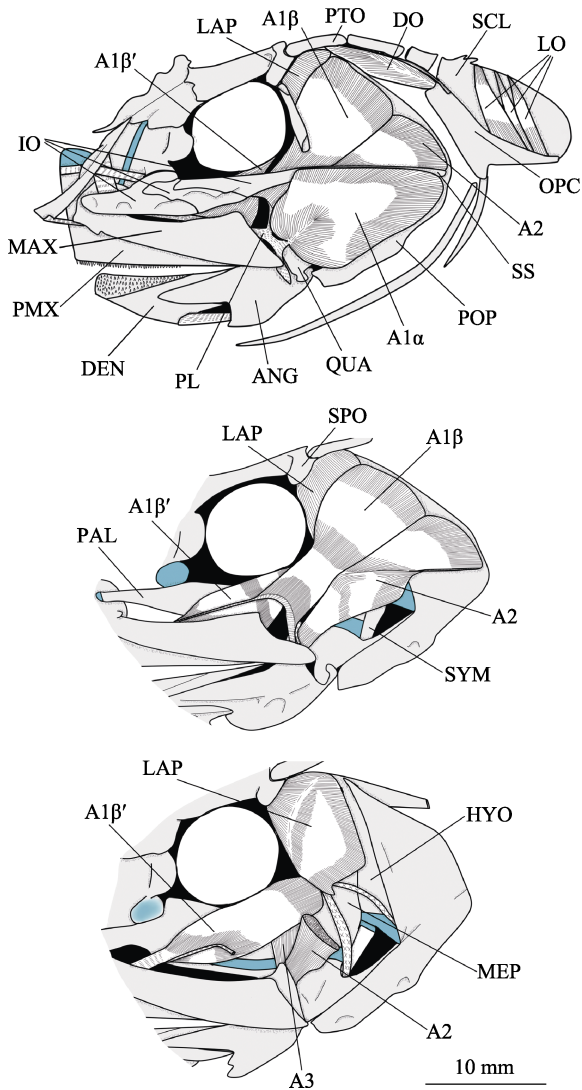


图 12 颊肌图：外侧面全图(上)，移除眶下骨和 A1 $\alpha$  肌后图(中)，再移除 A1 $\beta$  和 A2 后图(下)

Fig.12 Lateral view of cheek muscles: overall (upper), after removal of infraorbitals and A1 $\alpha$ , (middle) and after more removal of A1 $\beta$  and A2 (lower)

A1 $\alpha$ 、A1 $\beta$ 、A1 $\beta'$ 、A2 和 A3 分别为下颌收肌分肌 A1 $\alpha$ 、A1 $\beta$ 、A1 $\beta'$ 、A2 和 A3；ANG：关节骨；DEN：齿骨；DO：鳃盖开肌；HYO：舌颌骨；IO：眶下骨；SS：眶下骨架；LAP：腭弓提肌；LO：鳃盖提肌；MAX：上颌骨；MEP：后翼骨；OPC：(主)鳃盖骨；PAL：腭骨；PL：原始韧带；PMX：前颌骨；POP：前鳃盖骨；PTO：翼耳骨；QUA：方骨；SCL：上匙骨；SPO：蝶耳骨；SYM：续骨  
A1 $\alpha$ , A1 $\beta$ , A1 $\beta'$ , A2, and A3 indicate adductor mandibulae section A1 $\alpha$ , A1 $\beta$ , A1 $\beta'$ , A2, and A3, respectively;  
ANG: Anguloarticular; DEN: Dentary; DO: Dilatator operculi; HYO: Hyomandibula; IO: Infraorbital; SS: Suborbital stay; LAP: Levator arcus palatini; LO: Levator operculi; MAX: Maxilla; MEP: Metapterygoid; OPC: Opercle; PAL: Palatine; PL: Primordial ligament; PMX: Premaxilla; POP: Preopercle; PTO: Pterotic; QUA: Quadrate; SCL: Supracleithrum; SPO: Sphenotic; SYM: Symplectic

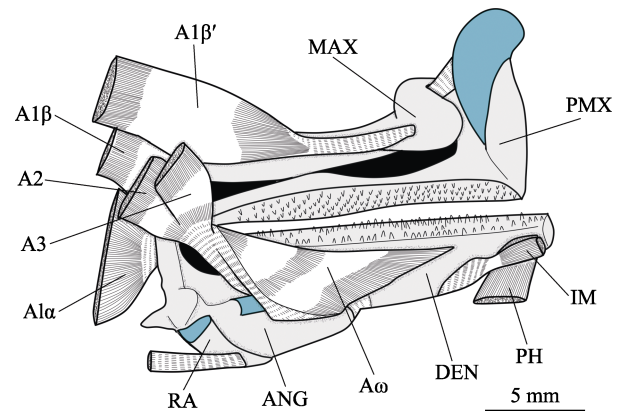


图 13 颌骨内侧肌肉图

Fig.13 Medial view of cheek muscles on jaws

A1 $\alpha$ 、A1 $\beta$ 、A1 $\beta'$ 、A2、A3 和 A $\omega$  分别为下颌收肌分肌 A1 $\alpha$ 、A1 $\beta$ 、A1 $\beta'$ 、A2、A3 和 A $\omega$ ；ANG：关节骨；DEN：齿骨；IM：下颌间肌；MAX：上颌骨；PH：颏舌肌；PMX：前颌骨；RA：隅骨  
A1 $\alpha$ , A1 $\beta$ , A1 $\beta'$ , A2, A3, and A $\omega$  indicated adductor mandibulae section A1 $\alpha$ , A1 $\beta$ , A1 $\beta'$ , A2, A3 and A $\omega$ , respectively;  
ANG: Anguloarticular; DEN: Dentary; IM: Intermandibularis; MAX: Maxilla; PH: Protractor hyohyoidei; PMX: Premaxilla; RA: Retroarticular

下颌收肌分肌 2 (adductor mandibulae section 2, A2)又称为头部分肌 b (cephalic portion b)，起始于后翼骨、舌颌骨下部、前鳃盖骨中部和眶下骨架上缘，止于关节骨内侧，收缩使下颌骨向后上方移动。A2 与 A3 下部融合。三叉神经下颌枝(ramus mandibularis trigeminus)从 A2 和 A1 $\beta$  间穿出。

下颌收肌分肌 3 (adductor mandibulae section 3, A3)起始于后翼骨，下部与 A2 融合，具有相同止点，收缩使下颌骨向内向上移动。

下颌收肌分肌  $\omega$  (adductor mandibulae section  $\omega$ , A $\omega$ )又称为下颌部分肌(mandibular portion)，附着于齿骨和关节骨的内侧，后部连接原始韧带和 A2、A3 的肌腱，收缩时可协同其他分肌将口闭合。

2.2.2 脑颅与悬器鳃盖骨间肌肉(cephalic muscles between cranium and suspensorium-opercular bones) (图 12、图 14 和图 15) 该部肌肉位于头骨和悬器鳃盖骨之间，司该部分的运动和鳃盖的开合，包括腭弓提肌、腭弓收肌、鳃盖开肌、鳃盖收肌、舌颌收肌和鳃盖提肌，皆左右对称。

腭弓提肌(levator arcus palatini, LAP)较强壮，起始于后翼骨和舌颌骨上部，止于蝶耳骨下部和翼耳骨外侧，收缩可使悬器上提。

腭弓收肌(adductor arcus palatini, AAP)起始于副蝶骨外侧，少量附于侧筛骨内后侧，止于腭骨内侧与



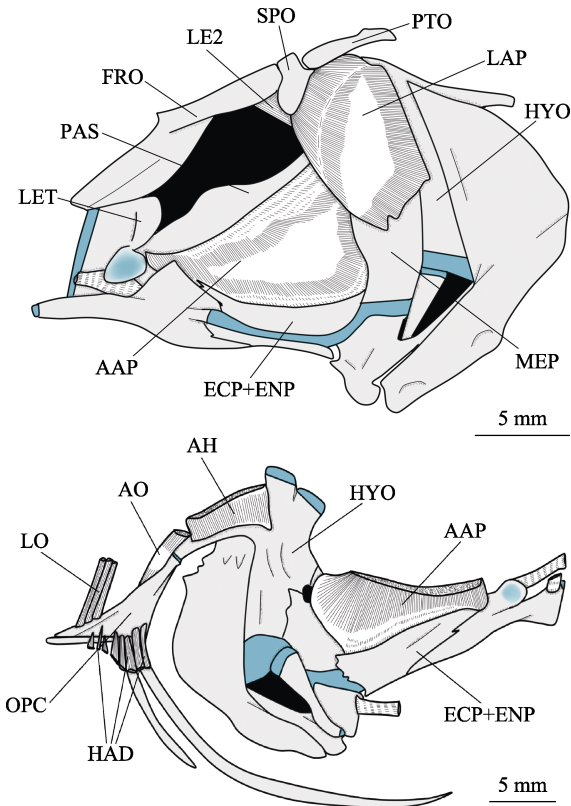


图 14 脑颅与悬器鳃盖骨间肌肉: 外侧面图(上), 悬器鳃盖骨内侧面图(下)

Fig.14 Lateral view of cephalic muscles after removal of jaws and cheek muscles (upper), and medial view of cephalic muscles and ventral muscles of head (lower)

AAP: 腭弓收肌; AH: 舌颌收肌; AO: 鳃盖收肌; ECP+ENP: 翼骨+中翼骨复合体; FRO: 额骨; HAD: 鳃盖条舌肌; HYO: 舌颌骨; LAP: 腭弓提肌; LE2: 第 2 鳃弓外提肌; LO: 鳃盖提肌; MEP: 后翼骨; OPC: (主)鳃盖骨; PAS: 副蝶骨; PTO: 翼耳骨; LET: 侧筛骨; SPO: 蝶耳骨  
 AAP: Adductor arcus palatini; AH: Adductor hyomandibulae; AO: Adductor opercula; ECP + ENP: Ectopterygioid + Endopterygioid; FRO: Frontal; HAD: Hyohyoideus adductores; HYO: Hyomandibula; LAP: Levator arcus palatini; LE2: Second levator externus; LO: Levator opercula; MEP: Metapterygioid; OPC: Opercle; PAS: Parasphenoid; PTO: Pterotic; LET: Lateral ethmoid; SPO: Sphenotic

翼骨+中翼骨复合体的上缘, 皆以腱膜连接, 收缩使口角提起, 悬器内收。

鳃盖开肌(dilatator operculi, DO, 曾用名 dilatator operculis)起始于翼耳骨外侧前部, 止于鳃盖骨的前端, 收缩可使鳃盖张开。

舌颌收肌(adductor hyomandibulae, AH)短粗且强壮, 毗邻鳃盖收肌, 控制悬器和鳃盖的张合。起始于翼耳骨外侧, 止于舌颌骨内侧上部。

鳃盖收肌(adductor operculi, AO)不发达, 位于舌颌收肌后侧, 收缩使鳃盖闭合。起始于翼耳骨外侧,

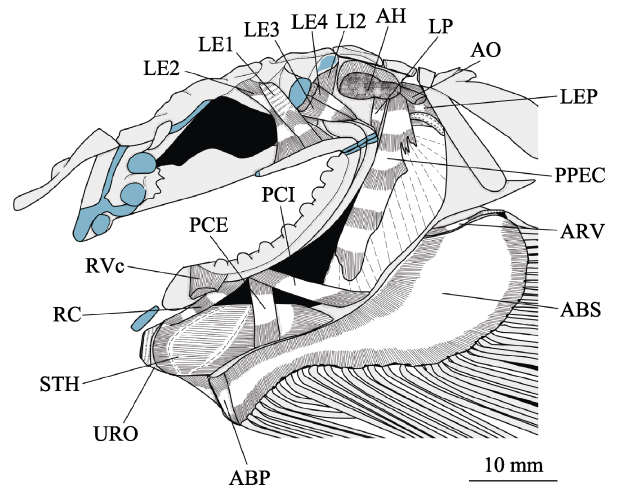


图 15 鳃弓和胸鳍外侧面肌肉图  
 Fig.15 Lateral view of muscles of branchial arch and pectoral fin

AH: 舌颌收肌; ABP: 肩带深层展肌; ABS: 肩带浅层展肌; AO: 鳃盖收肌; ARV: 肩带腹侧立肌; LE 1~4: 第 1~4 鳃弓外提肌; LEP: 胸鳍提肌; LI2: 第 2 鳃弓内提肌; LP: 鳃弓后提肌; PCE: 外咽匙肌; PCI: 内咽匙肌; PPEC: 胸鳍牵引肌; RC: 鳃弓纵直肌; RVc: 鳃弓腹直肌分肌 c; STH: 胸舌肌; URO: 尾舌骨

AH: Adductor hyomandibulae; ABP: Abductor profundus; ABS: Abductor superficialis; AO: Adductor operculi; ARV: Arrector ventralis; LE 1~4: First to fourth levator externus, respectively; LEP: Levator pectoralis; LI2: Second levator internus; LP: Levator posterior; PCE: Pharyngoclavicularis externus; PCI: Pharyngoclavicularis internus; PPEC: Protractor pectoralis; RC: Rectus communis; RVc: Rectus ventralis section c; STH: Sternohyoideus; URO: Urohyal

止于鳃盖骨前端内侧。

鳃盖提肌(levator operculi, LO)有三四条薄肌肉束, 起点和止点分别位于上匙骨的扇形薄片和鳃盖骨的内侧上缘, 收缩使鳃盖骨提起。

2.2.3 头部腹面肌肉(ventral muscles of head)(图 14、图 16 和图 17) 头部腹面肌肉主要包括下颌间肌、颏舌肌、舌弓展肌、舌肌和鳃盖条舌肌, 控制下颌和舌弓的运动。除下颌间肌之外, 其余左右对称。

下颌间肌(intermanibularis, IM)很短小, 附着于左右齿骨前部内侧面, 收缩使两侧齿骨彼此靠近, 与下方颏舌肌相邻。

颏舌肌(protractor hyohyoidei, PH, 曾用名 geniohyoideus)发达, 起始于齿骨前端内侧, 向后延伸至中前部, 两侧肌肉经肌隔接合, 再分别向左右延伸, 止于角舌骨外侧中下部与第 3 鳃条骨上部。每侧均由 2 个肌隔间隔成 3 段, 控制下颌骨与舌弓骨以及左右两侧的位置关系, 不同段的收缩对呼吸活动产生作用, 吸气时后段收缩, 呼气时前段收缩。

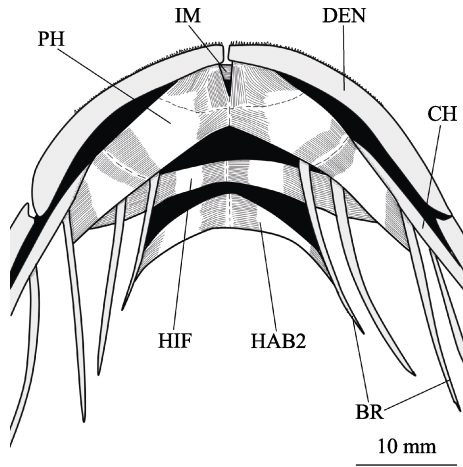


图 16 头部腹面肌肉图  
Fig.16 Ventral view of ventral muscles of head

BR: 鳃条骨; CH: 角舌骨; DEN: 齿骨; HAB2: 舌弓展肌分肌 2; HIF: 舌肌; IM: 下颌间肌; PH: 颞舌肌  
BR: Branchiostegal ray; CH: Ceratohyal; DEN: Dentary;  
HAB 2: Second hyohyoidei abductor; HIF: Hyohyoidei inferioris; IM: Intermandibularis; PH: Protractor hyohyoidei

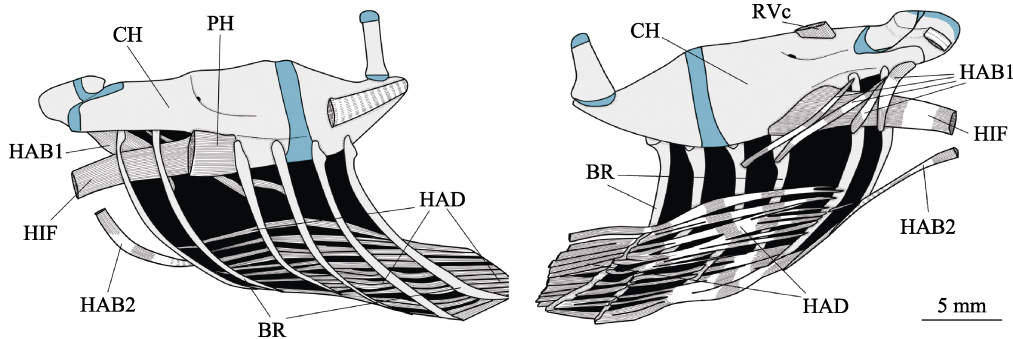


图 17 舌弓肌肉图: 外侧面(左)和内侧面(右)  
Fig.17 Lateral (left) and medial (right) views of ventral muscles of head

BR: 鳃条骨; CH: 角舌骨; HAB1、2: 舌弓展肌分肌 1、2; HAD: 鳃盖条舌肌;  
HIF: 舌肌; PH: 颞舌肌; RVc: 鳃弓腹直肌分肌 c

BR: Branchiostegal ray; CH: Ceratohyal; HAB1 and HAB2 indicate hyohyoidei abductors section 1 and section 2, respectively;  
HAD: Hyohyoidei adductor; HIF: Hyohyoidei inferioris; PH: Protractor hyohyoidei; RVc: Rectus ventralis section c

#### 2.2.4 鳃弓肌肉(branchial muscles)(图 15 和图 18)

鳃弓部肌肉包括鳃弓提肌(levator arcum branchialium, 即鳃弓外提肌、鳃弓内提肌和鳃弓后提肌)、背面横肌、鳃间背斜肌、鳃间后斜肌、鳃弓背面牵缩肌、鳃弓纵直肌、咽匙肌、鳃弓腹直肌及分肌 c 和 u、鳃间腹斜肌、腹面横肌、鳃弓收肌以及食道括约肌。

鳃弓外提肌(levator externus)分为 4 个部分,即第 1~4 鳃弓外提肌(first to fourth levator externus, LE1~4),分别起始于第 1~4 上鳃骨,分别止于蝶耳骨外侧(腱膜连接)、蝶耳骨下侧面和眼眶内侧、前耳骨关节窝下方以及舌颌骨内侧上部,收缩可使上鳃骨上提。

舌弓展肌分为 2 个部分:上侧的分肌 1 (hyohyoidei abductor section 1, HAB1)和下侧的分肌 2 (hyohyoidei abductor section 2, HAB2)。HAB1 有 4 束,控制鳃条骨的贴伏和直立,前 3 束起始于角舌骨内侧前端底部,最后一束起始于第 2 鳃条骨内侧顶端,4 束肌肉依次止于前 4 条鳃条骨内侧上部。HAB2 起始于第 1 鳃条骨的中下部,向鱼头腹面中线延伸,两侧经中缝(median raphe)接合,收缩可使两侧第 1 鳃条骨彼此靠近。

舌肌(hyohyoidei inferioris, HIF, 曾用名 hyohyoideus)由角舌骨内侧中后部底部起始,向前穿过 HAB1 和鳃条骨的间隙,再向鱼头腹面中线延伸,两侧经中缝接合,前侧有透明的薄腱膜(几乎不可见)连接下舌骨和角舌骨腹侧。该肌收缩可使两侧舌弓相互靠近。

鳃盖条舌肌(hyohyoidei adductores, HAD,又名鳃条收肌,曾用名 branchiostegohyoideus)附着于鳃条骨下部,后方连接鳃盖骨和下鳃盖骨的内侧,控制鳃条骨间开合。

鳃弓内提肌(levator internus)分为 2 个部分,即第 1 和第 2 鳃弓内提肌(first and second levator internus, LI1~2),分别起始于咽鳃骨背面前端和后部,止于前耳骨上缘和翼耳骨下部,收缩可使咽鳃骨上提。

鳃弓后提肌(levator posterior, LP)起始于第 4 上鳃骨的末端软骨,止于后耳骨,收缩可使第 4 上鳃骨向后上方移动。

背面横肌(transversus dorsalis, 曾用名 transversus dorsalis)分为背面前横肌(transversus dorsalis anterior, TDA)和背面后横肌(transversus dorsalis posterior, TDP) 2 部分,它们在相接处部分融合。前者连接第 2

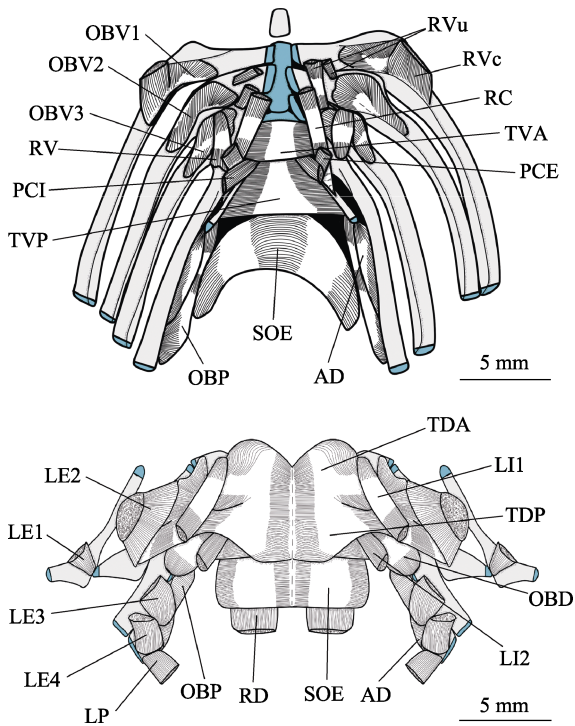


图 18 鳃弓肌肉图: 下鳃弓腹面(上)和上鳃弓背面(下)  
Fig.18 Ventral (upper) and dorsal (lower) views of muscles serving lower and upper branchial arches, respectively

AD: 鳃弓收肌; LE 1~4: 第 1~4 鳃弓外提肌; LI1~2: 第 1 和第 2 鳃弓内提肌; LP: 鳃弓后提肌; OBD: 鳃间背斜肌; OBP: 鳃间后斜肌; OBV 1~3: 第 1~3 鳃间腹斜肌; PCE: 外咽匙肌; PCI: 内咽匙肌; RC: 鳃弓纵直肌; RD: 鳃弓背面牵缩肌; RV: 鳃弓腹直肌; RVc: 鳃弓腹直肌分肌 c; RVu: 鳃弓腹直肌分肌 u; SOE: 食道括约肌; TDA: 背面前横肌; TDP: 背面后横肌; TVA: 腹面前横肌; TVP: 腹面后横肌  
AD: Adductor; LE 1~4: First to fourth levator externus, respectively; LI 1~2: First and second levator internus; LP: Levator posterior; OBD: Obliquus dorsalis; OBP: Obliquus posterior; OBV 1~3: First to third obliquus ventralis, respectively; PCE: Pharyngoclavicularis externus; PCI: Pharyngoclavicularis internus; RC: Rectus communis; RD: Retractor dorsalis; RV: Rectus ventralis; RVc: Rectus ventralis from ceratohyal; RVu: Rectus ventralis from urohyal; SOE: Sphincter oesophagi; TDA: Transversus dorsalis anterior; TDP: Transversus dorsalis posterior; TVA: Transversus ventralis anterior, TVP: Transversus ventralis posterior

上鳃骨前部, 后延伸至中缝左右接合; 后者连接第 3、第 4 上鳃骨前部, 后延伸至中缝左右接合。背面横肌收缩使两侧连接的上鳃骨彼此靠近, 上鳃弓向下拱起。

鳃间背斜肌(obliquus dorsalis, OBD, 曾用名 *interarcualis dorsalis obliquus*)起始于咽鳃骨前部, 止于第 3 和第 4 上鳃骨前部, 前部夹于咽鳃骨和背面后横肌之间, 收缩使第 3 和第 4 上鳃骨靠近咽鳃骨。

鳃弓背面牵缩肌(retractor dorsalis, RD)连接咽鳃骨及其后侧皮肤与第 4~8 节椎体的腹面, 收缩使鳃弓

后移, 功能与咽骨退缩肌(retractor ossium pharyngealium)相似, 推测为同源。

鳃弓纵直肌(rectus communis, RC)起始于尾舌骨的上缘, 止于第 5 角鳃骨的腹面中外部, 与外咽匙肌的止点相邻。

咽匙肌位于下鳃弓中部, 分为外咽匙肌(pharyngoclavicularis externus, PCE)和内咽匙肌(pharyngoclavicularis internus, PCI) 2 种。外咽匙肌起始于胸鳍匙骨下部背面, 止于第 5 角鳃骨腹面中外部, 收缩使咽骨有下压的趋势。内咽匙肌起始于胸鳍匙骨下部背面, 外咽匙肌起点的后侧, 止于第 5 角鳃骨腹面的前端, 其前部夹在腹面前横肌与腹面后横肌之间, 收缩使咽骨有缩向食道的趋势。

鳃弓腹直肌(rectus ventralis, RV, 曾用名鳃弓连肌 *interarcuales branchialis*)连接第 4 角鳃骨腹面的前端与第 3 下鳃骨腹面的前外侧, 收缩使第 4 角鳃骨与第 3 下鳃骨相靠近, 下鳃弓隆起。

鳃弓腹直肌分肌 c (rectus ventralis from ceratohyal, RVc, 曾用名鳃弓牵引肌 *protractor arcuum branchialium*、角舌角鳃肌 *ceratohyoceratobranchialis*)起始于角舌骨内侧上缘, 止于第 1 角鳃骨腹面前端, 下部与鳃间腹斜肌分肌 1 接合, 收缩使角舌骨与第 1 角鳃骨彼此靠近。

鳃弓腹直肌分肌 u (rectus ventralis from urohyal, RVu)有 2 束前端融合的肌肉, 它们的起点分别位于第 2 和第 3 下鳃骨腹面的前内侧, 止点位于尾舌骨上缘, 与鳃弓纵直肌相邻, 收缩使下鳃弓靠近尾舌骨。

鳃间腹斜肌(obliquus ventralis, OBV, 曾用名 *interarcualis ventralis obliquus* 和下鳃角鳃肌 *hypoceratobranchialis*)有 3 块: 第 1~3 鳃间腹斜肌(OBV1~3), 分别连接第 1~3 角鳃骨前端与第 1~3 下鳃骨外部。该种肌肉收缩使角鳃骨与下鳃骨关节处向上拱起。

腹面前横肌(transversus ventralis, 曾用名 *transversi ventralis*)分为腹面前横肌(transversus ventralis anterior, TVA)腹面后横肌(transversus ventralis posterior, TVP) 2 部分。前者连接左右第 4 角鳃骨腹侧前部, 位于腹面后横肌前部的下方。后者连接中央软骨后部与左右第 5 角鳃骨的内侧。腹面前横肌收缩使两侧第 4 和第 5 角鳃骨彼此靠近, 从而使下鳃弓腹面收紧。

鳃弓收肌(adductor, AD, 曾用名 *adductor arcuum branchialium*)连接成对的角鳃骨和上鳃骨的后端, 通常有 5 部分, 而细纹狮子鱼的前 4 部分肌肉退化, 仅留第 5 块鳃弓收肌, 连接第 5 与第 4 角鳃骨, 并延伸至第 4 上鳃骨, 收缩使第 4 和第 5 角鳃骨彼此靠近, 并使上下鳃弓后部相靠近。



鳃间后斜肌(obliquus posterior, OBP, 曾用名 *interarcualis posterior obliquus*)位于鳃弓的后部, 连接第4上鳃骨和咽鳃骨的背面, 至第4和第5角鳃骨的腹面。与鳃弓收肌相邻, 功能上也与其相似。

食道括约肌(sphincter oesophagi, SOE)包裹着鳃弓后侧的食道, 肌肉束横向分布, 控制食道的收缩扩张。

### 2.2.5 胸鳍肌肉(pectoral fin muscles)(图15、图19)

胸鳍肌肉包括肩带浅层展肌、肩带深层展肌、肩带腹侧立肌、肩带浅层收肌、肩带深层收肌和肩带背侧立肌。无肩带桡收肌(*adductor radialis*)和喙桡肌(*coracoradialis*)。胸舌肌、胸鳍牵引肌和胸鳍提肌在此描述。脊神经腹枝前3支与侧线副神经枝的分支相结合, 由上至下伸入胸鳍形成网式结构, 并延伸至鳍条上, 称为肩带神经丛(pectoral plexus, 曾用名 *branchial plexus*)。

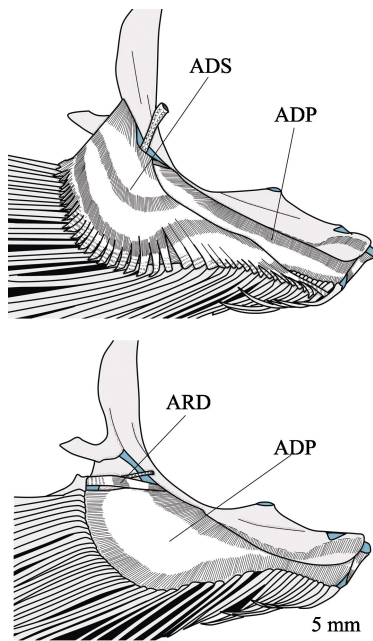


图19 胸鳍内侧肌肉图: 肌肉全图(上)和移去肩带浅层收肌后图(下)

Fig.19 Medial views of pectoral fin muscles: overall (upper) and after removal of ADS (lower)

ADP: 肩带深层收肌; ADS: 肩带浅层收肌;

ARD: 肩带背侧立肌

ADP: Adductor profundus; ADS: Adductor superficialis;

ARD: Arrector dorsalis

肩带浅层展肌(*abductor superficialis*, ABS, 又名 *abductor pectoralis superficialis*)起始于匙骨外侧片状板的内侧, 止于除第1胸鳍鳍条外所有鳍条的前部外侧, 收缩使胸鳍远离身体, 上部往前、下部往前上外翻, 鳍条间相靠近。

肩带深层展肌(*abductor profundus*, ABP, 又名 *abductor pectoralis profundus*)起始于匙骨外侧片状板

的内侧和乌喙骨、支鳍骨的外侧, 止于所有胸鳍鳍条的基部外侧, 收缩使胸鳍往前下方外翻, 可使鱼体在水底静止时维持平衡。

肩带腹侧立肌(*arrector ventralis*, ARV, 又名肩带伸肌 *extensor pectoralis*)起始于匙骨外侧片状板内侧的上部与肩胛骨的外侧, 止于第1胸鳍鳍条的前部外侧, 收缩使鳍条展开, 胸鳍上部往前下方外翻。

肩带浅层收肌(*adductor superficialis*, ADS, 又名 *adductor pectoralis superficialis*)起始于匙骨内侧的中部与肩胛骨的内侧, 止于除第1胸鳍鳍条外所有鳍条的前部内侧, 收缩使胸鳍往后往内上方收起。

肩带深层收肌(*adductor profundus*, ADP, 又名 *adductor pectoralis profundus*)起始于匙骨前部与乌喙骨、支鳍骨的内侧, 止于所有胸鳍鳍条内侧的基部, 收缩使胸鳍往后往内收起, 与肩带浅层收肌配合使胸鳍靠近鱼体。

肩带背侧立肌(*arrector dorsalis*, ARD)起始于匙骨与第1支鳍骨间软骨带的内侧, 止于第1胸鳍鳍条前部内侧, 收缩可展开鳍条, 胸鳍上部往前下方内收。在早期的解剖学研究中, 通常被作为肩带深层收肌的一部分进行描述。

胸舌肌(*sternohyoideus*, STH)是很大的肌肉, 起始于匙骨前部的背面以及外侧面, 并插入匙骨外侧凹槽中, 止于尾舌骨的外侧和后缘。该肌被2个肌隔分为3段, 中段肌节的少量肌肉纤维与轴下肌相连, 收缩不同部位可调节匙骨的位置方向。

胸鳍提肌(*levator pectoralis*, LEP)连接脑颅后部与匙骨上端, 收缩可使肩带上部靠近脑颅。

胸鳍牵引肌(*protractor pectoralis*, PPEC, 又名上耳咽匙肌 *epioticopharyngoclavicularis*、锁骨提肌 *levator clavicularis*)起始于后耳骨外后侧, 下方以薄薄的腱膜连接匙骨下部的背缘和上部的前缘, 收缩可使肩带下部向上移动。

2.2.6 腹鳍肌肉(pelvic fin muscles)(图20) 腹鳍肌肉包括腰带浅层展肌+腰带深层展肌复合体、腰带腹侧立肌、腰带浅层收肌、腰带深层收肌和腰带背侧立肌。无腰带固有伸肌(*extensor proprius*)。前下棱肌和中下棱肌也在此描述。

腰带浅层展肌(*abductor superficialis pelvius*, ABSP, 又名 *abductor pelvis superficialis*)与腰带深层展肌(*abductor profundus pelvius*, ABPP, 又名 *abductor pelvis profundus*)融合形成的复合体(ABSP+ABPP)起始于腰骨内侧面下部, 经下缘翻出, 止点分别位于5条腹鳍鳍条的基部。收缩可使腹鳍鳍条基部下提, 末端下降, 腹鳍吸盘上拱。

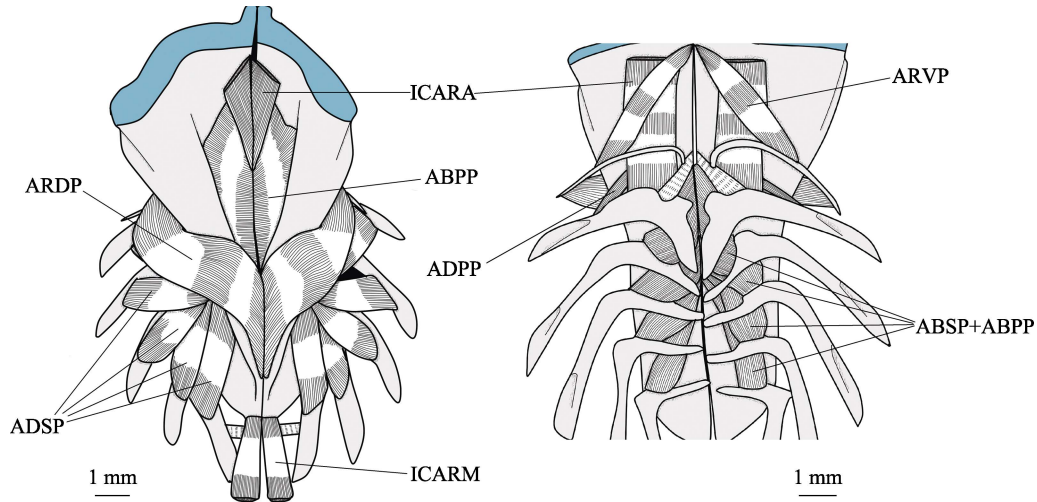


图 20 腹鳍肌背面图(左)和腹面图(右)  
Fig.20 Dorsal (left) and ventral (right) views of pelvic fin muscles

ABSP+ABPP: 腰带浅层展肌+腰带深层展肌复合体; ADPP: 腰带深层收肌; ADSP: 腰带浅层收肌;  
 ARDP: 腰带背侧立肌; ARVP: 腰带腹侧立肌; ICARA: 前下棱肌; ICARM: 中下棱肌  
 ABSP+ABPP: Abductor superficialis pelvici+Abductor profundus pelvici; ADPP: Adductor profundus pelvici;  
 ADSP: Adductor superficialis pelvici; ARDP: Arrector dorsalis pelvici; ARVP: Arrector ventralis pelvici;  
 ICARA: Infracarinalis anterior; ICARM: Infracarinalis medius

腰带腹侧立肌(arrector ventralis pelvici, ARVP, 曾用名腰带降肌 depressor pelvis)起始于下腰骨突的尖端, 止于腹鳍鳍棘中后部。收缩使鳍棘向前运动。

腰带浅层收肌(adductor superficialis pelvici, ADSP, 又名 adductor pelvis superficialis)完全分离为 5 块, 由前至后依次为分肌 1~5。它们的起点由前至后依次排列于腰骨背部的外侧, 止点分别位于第 1~5 腹鳍鳍条背面的中部。收缩使腹鳍鳍条基部下降, 末端上提, 腹鳍吸盘下降。

腰带深层收肌(adductor profundus pelvici, ADPP, 又名 adductor pelvis profundus)不发达, 较小的一束肌肉连接腰骨背部外侧的下方与最前方一条腹鳍鳍条的前部。收缩时辅助腰带浅层收肌的功能。

腰带背侧立肌(arrector dorsalis pelvici, ARDP, 曾用名腰带提肌 levator pelvis)起始于腰骨担鳍部背面中缝内侧, 由上向外翻出后向前延伸, 止于腹鳍鳍棘的后部。收缩使鳍棘向后上方运动。

前下棱肌(infracarinalis anterior, ICARA, 又名腹鳍牵引肌 protractor pelvis)起始于胸鳍前端匙骨与鸟喙骨内侧下部, 止于腹鳍扇形板外侧和内侧的下部。其前端与胸舌肌的后部纤维联合。收缩使腹鳍向前移动。

中下棱肌(infracarinalis medius, ICARM, 又名腹鳍牵缩肌 retractor pelvis)起始于腹鳍腰骨的后端, 止于肛门往后至臀鳍前方。收缩使腹鳍向后移动。

2.2.7 奇鳍相关肌肉(muscles associated with median fins)(图 21) 背鳍相关肌肉包括背鳍倾肌、背鳍竖肌和背鳍降肌。前上棱肌在此描述。无前、后上棱肌。

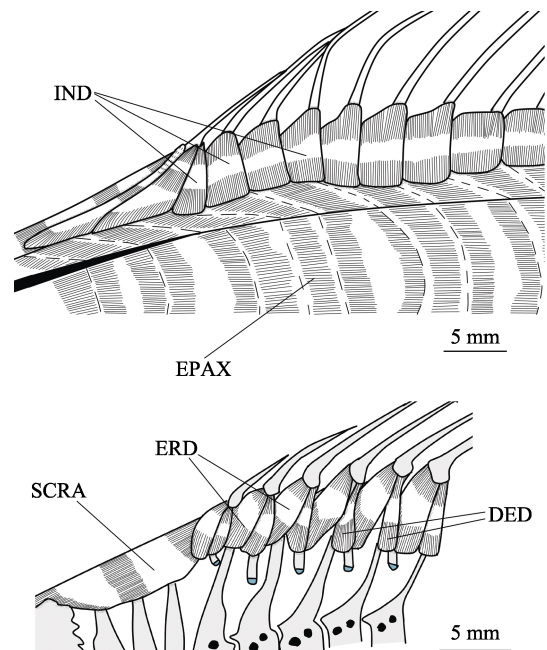


图 21 背鳍肌肉全图(上)和移除轴上肌图(下)  
Fig.21 Muscles associated with dorsal fin and epaxialis (upper) and after removal of epaxialis (lower)

DED: 背鳍降肌; ERD: 背鳍竖肌; EPAX: 轴上肌;  
 IND: 背鳍倾肌; SCRA: 前上棱肌  
 DED: Depressores dorsales; ERD: Erectores dorsales;  
 EPAX: Epaxialis; IND: Inclinatores dorsales;  
 SCRA: Supracarinalis anterior



背鳍倾肌(*inclinatores dorsales*, IND)为小片状肌肉,连于每条背鳍鳍条前部近基部位置,末端在背鳍基部皮肤下的腱膜上,覆盖轴上肌(*epaxialis*, EPAX)的上缘,收缩使其附着的鳍条向该侧倾倒。

背鳍竖肌(*erectores dorsales*, ERD)覆盖于轴上肌之下,对应背鳍鳍条有多块。它起始于相应基节前面一个髓棘和其周围腱膜(除了第1块背鳍竖肌起始于软骨化基节),止于相应鳍条基部外侧。后临背鳍降肌,收缩使鳍条竖起。

背鳍降肌(*depressores dorsales*, DED)覆盖于轴上肌之下,对应背鳍鳍条数有多块。它起始于相应基节和其周围腱膜,止于相应鳍条基部外侧,收缩使鳍条降下。

前上棱肌(*supracarinalis anterior*, SCRA, 又名背鳍牵引肌 *protractor dorsalis*)位于鱼头部后上方,连接上枕骨后上端和背鳍第1基节。收缩牵引背鳍向前,使鱼背有拱起的趋势。

臀鳍相关肌肉包括臀鳍倾肌、臀鳍竖肌和臀鳍降肌,结构与背鳍相同。无后下棱肌。

臀鳍倾肌(*inclinatores anales*)连于每条臀鳍鳍条前部近基部位置,末端在臀鳍基部皮肤下的腱膜上,覆盖轴下肌(*hypaxialis*, HPAX)的下缘,收缩使其附着的鳍条向该侧倾倒。

臀鳍竖肌(*erectores anales*)起始于相应基节前部与其前方腱膜,止于相应鳍条基部外侧面的前部。后临臀鳍降肌,收缩使鳍条竖起。

臀鳍降肌(*depressores anales*)起始于相应基节后部,止于相应鳍条基部外侧面的后部,收缩使鳍条降下。

**2.2.8 尾鳍肌肉(caudal fin muscles)(图22)** 尾鳍肌肉包括尾鳍下背屈肌、尾鳍上背屈肌、尾鳍上腹屈肌、尾鳍外腹屈肌、尾鳍下腹屈肌、尾鳍腹收肌和尾鳍条间肌。

尾鳍下背屈肌(*flexor dorsalis*, FD, 又名 *flexor caudalis dorsalis inferior*)起始于上尾下骨板的上缘、尾杆骨后杆和最后一条髓棘后部,止于最上方2条尾鳍主鳍条的前部,收缩使尾鳍上部向该侧弯曲。

尾鳍上背屈肌(*flexor dorsalis superior*, FDS, 又名 *flexor caudalis dorsalis superior*)是尾鳍最上方的肌肉,起始于最后一条髓棘,并覆盖尾鳍下背屈肌上部,止于背侧2条前倾鳍条的前部,收缩使尾鳍上缘向该侧下方弯曲。

尾鳍外腹屈肌(*flexor ventralis externus*, FVE, 又名尾鳍中腹屈肌 *flexor caudalis ventralis medialis*)起始于最后2条脉棘前部和最后一个臀鳍基节,止于第

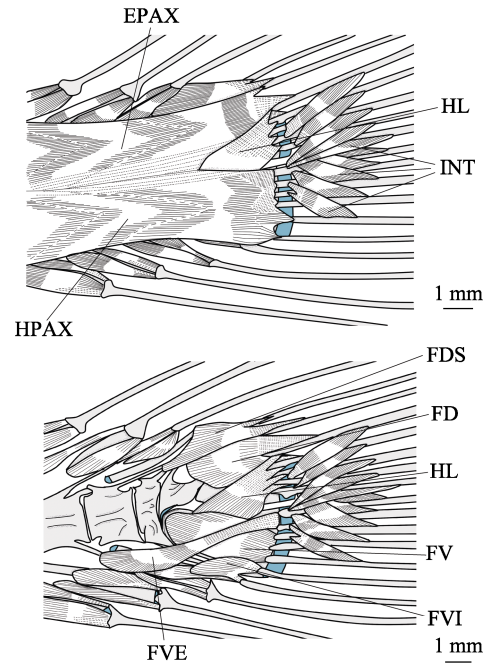


图22 尾鳍肌肉全图(上)和移除轴上肌轴下肌后图(下)  
Fig.22 Muscles associated with caudal fin (upper) and after removal of epaxialis and hypaxialis (lower)

EPAX: 轴上肌; FD: 尾鳍下背屈肌; FDS: 尾鳍上背屈肌;  
FV: 尾鳍上腹屈肌; FVE: 尾鳍外腹屈肌;  
FVI: 尾鳍下腹屈肌; HL: 尾鳍腹收肌;  
HPAX: 轴下肌; INT: 尾鳍条间肌  
EPAX: Epaxialis; FD: Flexor dorsalis; FDS: Flexor dorsalis superior; FV: Flexor ventralis; FVE: flexor ventralis externus; FVI: Flexor ventralis inferior; HL: Hypochordal longitudinalis; HPAX: Hypaxialis; INT: Interradialis

6、第7尾鳍主鳍条的基部,收缩使尾鳍中部鳍条向该侧屈转。

尾鳍上腹屈肌(*flexor ventralis*, FV, 又名 *flexor caudalis ventralis superior*)起始于下尾下骨+准尾下骨复合体,止于第8~10尾鳍主鳍条及腹侧前倾鳍条的基部,收缩使尾鳍下部向该侧卷曲。

尾鳍下腹屈肌(*flexor ventralis inferior*, FVI, 又名 *flexor caudalis ventralis inferior*)起始于倒数第1、第2脉棘的后部,止于第10尾鳍主鳍条和腹侧前倾鳍条的基部,收缩使尾鳍下缘向该侧上方弯曲。

尾鳍腹收肌(*hypochordal longitudinalis*, HL, 又名 *adductor caudalis ventralis*)起始于下尾下骨+准尾下骨复合体上缘,止于第1~4尾鳍主鳍条的基部,收缩使尾鳍上半部向该侧腹面卷曲。

尾鳍条间肌(*interradialis*, INT, 又名 *interradialis caudalis*)位于尾鳍主鳍条侧面前部,连接于10条尾鳍主鳍条之间,从第5、第6鳍条之间分别向上下两侧延伸,上下各5块,收缩使各鳍条向中轴靠近。

### 3 讨论

#### 3.1 术语与描述

本研究的中文术语主要采用水产类规划教材中的名词,但由于国内相关研究较少,大多沿用早期论文研究结果的原因,存在中文术语与现行英文术语不匹配、更新滞后和未定名描述等情况。随着学科的发展,鱼类解剖学的英文名词更新多次,定义恰当或流传最广的被采纳。例如,现在国外鱼类学家广泛使用的关节骨和隅骨的英文名分别为 *anguloarticular* 和 *retroarticular*,但很多中文相关论文中标注的英文名分别为 *articular* 和 *angular*。在 20 世纪 60 年代之前,关节骨和隅骨的英文名为 *articular* 和 *angular* (Johnson, 1918; Tominaga, 1968),之后逐渐被 *angular* (在此指代关节骨)和 *retroarticular* 代替(Fraser, 1968; Yabe, 1985),近年来,使用 *anguloarticular* 和 *retroarticular* 分别指代关节骨和隅骨成为主流(Datovo *et al.*, 2012; Vilasri, 2013; Keivany, 2014)。这种英文名词术语更新的情况也发生在眶下骨、后耳骨、侧筛骨、翼蝶骨、翼骨、中翼骨等骨头以及下颌收肌、鳃盖开肌、舌肌和鳃间背斜肌等肌肉上。本研究在结果描述中采用的是现今国际广泛认可的英文名词术语,也标注了常用的曾用名,可供与早期论文对照。针对某些骨头或肌肉至今仍存在同物异名的情况,也在结果描述中注明(如中筛骨、前犁骨、上颞骨和前下棱肌等)。部分肌肉在国内文献中未被定义和描述过,在本研究中按照细纹狮子鱼的情况进行了描述,并根据其功能、英文名约定俗成的命名规则确定了中文名(如舌弓展肌和鳃弓背面牵缩肌)。在早期研究中,舌颌骨通常被作为舌弓的一部分进行描述,本研究将舌颌骨作为悬器的组成之一,因为它与悬器部分的关联性更强,与后翼骨和前鳃盖骨的接合更紧密,有利于骨骼系统描述的连贯性。

#### 3.2 特殊结构的功能探讨

**3.2.1 腹鳍吸盘的特殊结构** 细纹狮子鱼腹鳍的骨骼和肌肉构造与其他科目的鱼类(圆鳍鱼科除外)具有很大的差异。一般鱼类的腹鳍腰骨呈三角状,以较小的倾斜角度贴于腹部底面内侧,大多依靠肌肉、韧带和其他结缔组织连接尾舌骨和肩带等部位,常有下腰骨突、下腰骨龙骨和后腰骨突等附属结构,鳍棘呈条状,鳍条为分叉或条状形态,主要附着在腰骨的后缘(Yabe, 1985; Vilasri, 2013; Kang *et al.*, 2018)(图 5)。而细纹狮子鱼的腰骨从腹侧看则更趋向于椭圆形,背侧的扇形板以软骨带与肩带骨内侧关联,加上结缔组

织和肌肉的连接,使腹鳍与身体的关系更牢固,在不丧失活动能力的前提下,运动稳定性也更高;鳍棘呈缝合针状,附着与下腰骨突后部,鳍条特化,末端呈半筒状舌形结构,辐射式附着于腰骨腹侧面,构成了吸盘的基本框架。一般鱼类腹鳍的肌肉包括腰带深层展肌、腰带浅层展肌、腰带腹侧立肌、腰带浅层收肌、腰带深层收肌和腰带背侧立肌,纵向附着于背腹两侧(Sasaki, 1989; Winterbottom, 1993; Vilasri, 2013),背侧肌肉收缩使其腹鳍鳍条向上收起贴向身体,腹侧面肌肉收缩使其腹鳍鳍条向下张开远离身体,从而达到腹鳍的收张运动。而细纹狮子鱼腹鳍肌肉并不纵向排列,它的腰带深层收肌退化,腰带浅层展肌+腰带深层展肌复合体和腰带浅层收肌分别分化为 5 个分肌,近似辐射式连于 5 个腹鳍鳍条和腰骨之间,加上腰带腹侧立肌和腰带背侧立肌的作用,共同带动盘状腹鳍进行上拱和下凸的动作,结合外侧褶皱状皮肤和结缔组织,使腹鳍具有吸盘的功能。通过该器官,细纹狮子鱼能吸附在岩礁上面,有利于在流水中固定身体,因此,腹鳍吸盘是其适应生活环境的重要器官(金鑫波, 2006)。

**3.2.2 颊肌的分化** 鱼类颊肌在一定程度上是研究系统进化和亲缘关系时易于掌握的指标。其分肌的数量、形态和种类多种多样,有的只有 1 块下颌收肌,有的却有 10 块明显的分肌(Winterbottom, 1974)。一般低等鲈形目鱼类有 3~5 块分肌(Kang *et al.*, 2018),鲈形目鱼类有 2~5 块分肌(Yabe, 1985; Imamura, 1996)。细纹狮子鱼的颊肌分化为 6 块且较发达,有使颌骨向后方移动的 A1 $\alpha$ 、使颌骨向后上方移动的 A1 $\beta$ 、使上颌骨向内向上运动的 A1 $\beta'$ 、使下颌骨向后上方移动的 A2、使下颌骨向内向上移动的 A3 以及协同其他分肌将口闭合的 A $\omega$ 。这种分化相较于许多鱼类来说更为复杂,能够更灵活地控制颌骨的运动,使咬合动作更加精准、力度更强,从而使细纹狮子鱼能更好地捕食鱼虾等生物,成为生态系统中的顶级捕食者(张波等, 2011)。

#### 3.3 系统进化的问题

狮子鱼科是种类最多、分布最广的鱼类类群之一,其成员在形态、分布和生活习性等方面千差万别,至今仍有新物种不断被发现(Wang *et al.*, 2019),该族群内的分类学研究以及系统进化关系十分值得探讨。不少学者采用比较骨学或分子生物学手段对狮子鱼进行系统进化分析(Kido, 1988; Knudsen *et al.*, 2007),但包含肌肉性状分析的比较形态学研究尚无报道,并且细纹狮子鱼的亲缘关系也不清楚。要得到具体而可

靠的细纹狮子鱼的亲缘关系以及更为详细的狮子鱼科鱼类的系统进化关系,进一步的比较解剖学研究是十分必要的。

**致谢:**感谢日本北海道大学水产学部海洋生物学实验室鱼类分类学家 Hisashi Imamura 教授给与的宝贵意见。

## 参 考 文 献

- CHEN Y X, LIU J, LIU L. Comparative osteology in eight sparid fishes (Osteichthyes: Perciformes) with remarks on their classification. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1360–1374 [陈咏霞, 刘静, 刘龙. 中国鲷科鱼类骨骼系统比较及属种间分类地位探讨. *水产学报*, 2014, 38(9): 1360–1374]
- CHERNOVA N V. Systematics and phylogeny of fish of the genus *Liparis* (Liparidae, Scorpaeniformes). *Journal of Ichthyology*, 2008, 48(10): 831–852
- DATOVO A, CASTRO R M C. Anatomy and evolution of the mandibular, hyopalatine, and opercular muscles in characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoology (Jena, Germany)*, 2012, 115(2): 84–116
- ENDO H, TAKAGI Y. Myology. In: YABE M, KUWAMURA T, TAKAGI Y. *Ichthyology*. Tokyo: Kouseisha Kouseikaku Company Limited, 2017, 377
- FRASER T H. Comparative osteology of the Atlantic snooks (Pisces: *Centropomus*). *Copeia*, 1968, 1968(3): 433–460
- FREIHOFER W C. Cranial nerves of a percoid fish, *Polycentrus schomburgkii* (family Nandidae), a contribution to the morphology and classification of the order Perciformes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1978, 128: 78
- IMAMURA H. Phylogeny of the family Platycephalidae and related taxa (Pisces: Scorpaeniformes). *Species Diversity*, 1996, 1(2): 123–233
- JIN X B. *Fauna Sinica: Osteichthyes Scorpaeniformes*. Beijing: Science Press, 2006, 739 [金鑫波. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲷形目. 北京: 科学出版社, 2006, 739]
- JIN X S, TANG Q S. Changes in fish species diversity and dominant species composition in the Yellow Sea. *Fisheries Research*, 1996, 26(3/4): 337–352
- JOHNSON S E. Osteology of the gruntfish, *Rhamphocottus richardsoni*. *Journal of Morphology*, 1918, 31(3): 461–487
- KANG S, IMAMURA H, KAWAI T. Morphological evidence supporting the monophyly of the family Polynemidae (Teleostei: Perciformes) and its sister relationship with Sciaenidae. *Ichthyological Research*, 2018, 65(1): 29–41
- KAWAI T. Osteology. In: YABE M, KUWAMURA T, TAKAGI Y. *Ichthyology*. Tokyo: Kouseisha Kouseikaku Company Limited, 2017, 377
- KEIVANY Y. Comparative osteology of the jaws in representatives of the Eurypterygian fishes. *Research in Zoology*, 2014, 4(2): 29–42
- KIDO K. Phylogeny of the family Liparidae, with the taxonomy of the species found around Japan. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1988, 35(2): 125–256
- KNUDSEN S W, MØLLER P R, GRAVLUND P. Phylogeny of snailfishes (Teleostei: Liparidae) based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(2): 649–666
- MENG Q W, MIAO X S, YU Q J, *et al.* *Ichthyology: Morphology and classification*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1994, 298 [孟庆闻, 缪学祖, 俞秦济, 等. 鱼类学: 形态分类. 上海: 上海科学技术出版社, 1994, 298]
- MYOUNG S H, BAN T W, KIM J K. Population structure of *Liparis tanakae* (PISCES, Liparidae) from Korea based on morphological and molecular traits. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, 49(2): 198–207
- NAKABO T. *Fishes of Japan with pictorial keys to the species*, English edition. Tokyo: Tokai University Press, 2002, 1749
- PING C, PAO S, CHEN J S. A preliminary observation of the gross anatomy of the nerve system of the carp (*Cyprinus Carpio*). *Acta Zoologica Sinica*, 1959, 11(3): 370–389 [秉志, 鲍璿, 陈进生. 鲤鱼神经系统的初步观察. *动物学报*, 1959, 11(3): 370–389]
- PING C, PAO S, YANG H Y. The skeletal musculature of the carp (*Cyprinus Carpio*). *Acta Zoologica Sinica*, 1958, 10(3): 289–315 [秉志, 鲍璿, 杨慧一. 鲤鱼骨骼肌的初步观察. *动物学报*, 1958, 10(3): 289–315]
- SASAKI K. Phylogeny of the family Sciaenidae, with notes on its zoogeography (Teleostei, Perciformes). *Memoirs of the Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University*, 1989, 36: 1–137
- SHAN X J, CHEN Y L, ZHOU Z P, *et al.* Inter-annual variations in propagational biological characteristics of *Liparis tanakae* in central and southern Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 1–8 [单秀娟, 陈云龙, 周志鹏, 等. 黄海中南部细纹狮子鱼繁殖生物学特征的年际变化. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 1–8]
- SHUI B N, ZHANG S L, HAN Z Q, *et al.* *Ichthyological systematics*. Beijing: Ocean Press, 2019, 462 [水柏年, 张盛龙, 韩志强, 等. 系统鱼类学. 北京: 海洋出版社, 2019, 462]
- TOMINAGA Y. Internal morphology, mutual relationships and systematic position of the fishes belonging to the family Pempheridae. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1968, 15(2): 43–95
- VILASRI V. Comparative anatomy and phylogenetic systematics of the family Uranoscopidae (Actinopterygii: Perciformes). *Memoirs of the Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University*, 2013, 55(1/2): 1–106

- WANG K, SHEN Y, YANG Y, *et al.* Morphology and genome of a snailfish from the Mariana Trench provide insights into deep-sea adaptation. *Nature Ecology and Evolution*, 2019, 3(5): 823–833
- WINTERBOTTOM R. A descriptive synonymy of the striated muscles of the Teleostei. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 1974, 125: 235–317
- WINTERBOTTOM R. Myological evidence for the phylogeny of recent genera of surgeonfishes (Percomorpha, Acanthuridae), with comments on the Acanthuroidei. *Copeia*, 1993, 1993(1): 21–39
- YABE M. Comparative osteology and myology of the superfamily Cottoidea (Pisces: Scorpaeniformes), its phylogenetic classification. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University*, 1985, 32: 1–130
- YANG T Y, LIU F, LI Y J, *et al.* Comparison of skeletal characteristics of four fish species in Stromateoidei. *Fisheries Science*, 2014, 33(10): 643–648 [杨太有, 刘芳, 李艳洁, 等. 鲷亚目 4 种鱼类骨骼系统的比较研究. *水产科学*, 2014, 33(10): 643–648]
- ZHANG B, JIN X S, DAI F Q. Feeding habits and their variation of seasnail (*Liparis tanakae*) in the central and southern Yellow Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1199–1207 [张波, 金显仕, 戴芳群. 黄海中南部细纹狮子鱼的摄食习性及其变化. *水产学报*, 2011, 35(8): 1199–1207]

(编辑 马瑾艳)

## Osteological and Myological Characteristics of *Liparis tanakae* from Chinese Coasts

KANG Shihua<sup>1</sup>, JIN Xianshi<sup>1,2</sup>, WANG Jun<sup>1,3</sup>✉

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao, Shandong 266071, 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. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266237, China)

**Abstract** Fish anatomy, including osteology and myology, is very important for traditional ichthyological research and systematics. It provides the basis for taxonomy, phylogeny, morphology, veterinary, evolution, and other studies. However, few related papers on fish anatomy have been published in China, and hence, research is currently insufficient. *Liparis tanakae*, is a dominant species in the Yellow Sea and Bo Hai, which occupies an important position in the ecosystem, but no study has so far described its anatomical characteristics in detail. The osteological and myological descriptions of *L. tanakae* are given in this study, and some associated nerves are also mentioned here. The osteological descriptions comprise ten parts: circumorbital bones, neurocranium, jaws, suspensorium and opercular bones, hyoid arch, branchial arches, pectoral girdle, pelvic girdle, axial skeleton, median fin supports, and caudal skeleton; and myological descriptions comprise eight parts: cheek muscles, cephalic muscles between the cranium and suspensorium-opercular bones, ventral muscles of the head, branchial muscles, pectoral fin muscles, pelvic fin muscles, muscles associated with median fins, and caudal fin muscles. Examinations were made on specimens stained with alcian blue and alizarin red. The specimens were dissected under a stereomicroscope used to prepare drawings. Some renewal conditions of terminology and synonyms were stated, and few portions unnamed in Chinese, such as hyohyoidei abductor and retractor dorsalis, were named. The special structure of the pelvic fin and its locomotory mechanism were illustrated, along with the differentiation and function of the cheek muscles.

**Key words** Osteology; Myology; *Liparis tanakae*; Morphology; Fish anatomy

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210713001

http://www.yykyxjz.cn/

贲玲芝, 史雪莹, 郭金龙, 陈秀玲, 张配瑜, 刘海燕. 全脂黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆养殖性能、生理代谢及体色的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 80-88

BEN L Z, SHI X Y, GUO J L, CHEN X L, ZHANG P Y, LIU H Y. Effects of replacement of fish meal with full-fat *Hermetia illucens* larvae on culture performance, physiological metabolism and skin color in turbot. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 80-88

# 全脂黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆养殖性能、生理代谢及体色的影响\*



贲玲芝<sup>1</sup> 史雪莹<sup>1</sup> 郭金龙<sup>2</sup> 陈秀玲<sup>3</sup> 张配瑜<sup>1</sup> 刘海燕<sup>1①</sup>

(1. 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050024; 2. 河北省海洋与水产科学研究院 河北 秦皇岛 066002; 3. 北戴河新区水产技术推广站 河北 秦皇岛 066600)

**摘要** 以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为研究对象,探讨其配合饲料中以全脂黑水虻(*Hermetia illucens*)幼虫粉替代鱼粉后对大菱鲆生长性能、饲料利用、血清生理生化指标及体色的影响。本研究设计4个处理组,分别为全脂黑水虻幼虫粉替代0(FM)(对照组)、20%(HI20)、40%(HI40)的鱼粉及40%替代后添加晶体赖氨酸(Lys)和蛋氨酸(Met)(HI40AA)形成4种等氮、等能的实验饲料。将1200尾大菱鲆幼鱼[(26.57±0.54)g]随机分为4组,每组3个重复,每个重复100尾鱼,实验时间为56 d。结果显示,黑水虻幼虫粉替代鱼粉显著影响了大菱鲆的相对增重率(WGR)和特定生长率(SGR),HI40和HI40AA组显著低于HI20和FM组( $P<0.05$ ),对大菱鲆的摄食率(SR)、饲料系数(FCR)、肝体比(HSI)、脏体比(VSI)、肥满度(CF)及体成分中的粗蛋白、粗灰分含量均无显著影响( $P>0.05$ ),FM和HI20组大菱鲆血清总胆固醇(TCHO)及高密度脂蛋白(HDL)含量显著高于HI40和HI40AA组( $P<0.05$ ),FM组低密度脂蛋白(LDL)含量显著高于各替代组( $P<0.05$ );HI40和HI40AA组大菱鲆背部体色 $L^*$ 值、 $a^*$ 值显著低于FM和HI20组( $P<0.05$ ),FM组背部体色 $b^*$ 值显著低于其他各实验组( $P<0.05$ ),HI40组的 $b^*$ 值显著高于HI20和HI40AA组( $P<0.05$ );大菱鲆腹部的体色参数各实验组相比无显著差异( $P>0.05$ )。研究表明,本研究条件下,全脂黑水虻幼虫粉替代大菱鲆饲料中鱼粉为20%时,不会影响大菱鲆的生长与生理功能,其在大菱鲆幼鱼饲料中的鱼粉替代推荐量为20%。

**关键词** 大菱鲆; 黑水虻虫; 生长; 血清生化指标; 体色

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0080-09

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*),又名多宝鱼,是我国北方三省重要的海水养殖动物。作为冷水肉食性鱼类,其对饲料的蛋白质需求较高,且主要依赖于鱼

粉。然而,由于过度捕捞及不良气候的影响,全球鱼粉资源已明显不足且价格飙升(杜玉雯等,2016),亟需展开替代鱼粉的研究,并开发适合大菱鲆的优质蛋

\* 河北省省级科技计划(19226705D)、河北省现代农业产业技术体系专项(HBCT2018170205)和河北省农业农村厅科技计划(冀农科 19033)共同资助 [This work was supported by Science and Technology Program of Hebei (19226705D), Hebei MATRT (HBCT2018170205), and Science and Technology Program of Apartment of Agriculture and Rural affairs of Hebei (19033)]. 贲玲芝, E-mail: 1741885806@qq.com。

① 通讯作者: 刘海燕, 教授, E-mail: liuhaiyan@hebtu.edu.cn

收稿日期: 2021-07-13, 收修改稿日期: 2021-09-22



白源。昆虫是一类新型动物蛋白源, 其有望在未来替代鱼粉方面发挥重要作用。黑水虻(*Hermetia illucens*)为腐生性昆虫, 能取食禽畜粪便和生活垃圾并生产高价值的动物蛋白饲料。其幼虫氨基酸含量丰富, 中链脂肪酸与多不饱和脂肪酸含量占脂肪酸总量的60%以上, 其中, 月桂酸(Lauric acid)含量高达40%, 可作为鱼粉的替代蛋白源(刘世胜, 2016; Oteri *et al.*, 2021)。目前, 已经在海鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Rui *et al.*, 2017)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Renna *et al.*, 2017)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(Xiao *et al.*, 2018; 陈晓璞等, 2019)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(韩星星, 2019)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(Lu *et al.*, 2020)、加州鲈(*Micropterus salmoides*)(彭凯等, 2021)及大菱鲆(Kroeckel *et al.*, 2012)中进行了应用研究。这些研究结果多是基于黑水虻虫的脱脂干粉进行的, 但在实际生产中, 市场上常见的是全脂黑水虻虫粉。全脂黑水虻虫粉对大菱鲆的影响尚未见报道。因此, 本研究拟探讨全脂黑水虻虫粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼的生长、饲料利用、血清生理生化指标及体色的影响, 为全脂黑水虻虫粉在大菱鲆饲料中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计

本实验以大菱鲆为研究对象, 共分4个处理组: 分别采用全脂黑水虻幼虫粉替代基础饲料中0、20%和40%的鱼粉, 及在40%替代组添加晶体氨基酸[赖氨酸(Lys)和蛋氨酸(Met)], 分别标记为FM(对照组)、HI20、HI40和HI40AA组, 每组3个重复, 每个重复100尾大菱鲆, 共1200尾, 养殖时间为56 d。

### 1.2 实验鱼及实验饲料

大菱鲆幼苗购于天津盛亿水产公司, 从中选出1200尾大小均匀、健康的幼鱼, 随机分到12个养殖缸内, 大菱鲆幼鱼的初始体重为(26.57±0.54) g。实验所用黑水虻幼虫粉购自广州飞禧特生物科技有限公司, 其粗蛋白及粗脂肪的含量分别为38.81%和29.94%。以白鱼粉、乌贼肝粉、豆粕、谷朊粉为主要蛋白源, 鱼油、豆油为主要脂肪源配置实验饲料。饲料组成和营养成分见表1。使用颗粒机将饲料制成直径为3.0 mm的软颗粒, 存放至-20℃冰箱备用。

### 1.3 实验条件

养殖实验在河北省秦皇岛天合水产良种有限公

司进行, 所用鱼缸为长方体玻璃纤维缸(2 m×1 m×1 m), 缸内水深为40 cm。每个玻璃纤维缸均匀放置2个充气气石, 24 h增氧, 保证溶解氧(DO)充足。DO>6.0 mg/L, 氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)浓度<0.05 mg/L。养殖用水为砂滤处理后的地下水(盐度为25~28), 缸内水温为11.0℃~14.4℃。光照采用自然光照加人工光照, 光照周期为14L:10D。

### 1.4 养殖管理

养殖实验正式开始前, 对大菱鲆幼鱼进行为期14 d的驯化, 与正式实验养殖环境及投喂时间相同, 使其行为安逸, 摄食正常。结束后, 禁食24 h, 称重, 选择体质健壮、规格整齐的个体作为实验用鱼, 根据动物分组的随机化原则, 分组称重。每日饱食投喂2次(08:00、18:00), 换水2次, 定时记录水温; 每日观察大菱鲆幼鱼的摄食和活动状态, 如有死亡, 及时取出并称重记录。

表1 实验饲料配方及营养组成  
Tab.1 Formulation and composition of experimental diet nutrient content

项目 Items	实验组 Group			
	FM	HI20	HI40	HI40AA
原料 Ingredients				
白鱼粉 White fish meal	45.00	36.00	27.00	27.00
黑水虻虫粉 <i>H. illucens</i> meal	0.00	13.69	27.39	27.39
赖氨酸 Lys	0.00	0.00	0.00	0.37
蛋氨酸 Met	0.00	0.00	0.00	0.18
乌贼肝粉 Squid liver powder	5.00	5.00	5.00	5.00
豆粕 Soybean meal	7.50	7.50	7.50	7.50
谷朊粉 Wheat gluten	13.00	13.00	13.00	13.00
α-淀粉 α-starch	11.29	11.29	11.29	11.29
豆油 Soybean oil	3.90	1.95	0.00	0.00
鱼油 Fish oil	3.90	1.95	0.00	0.00
磷酸氢钙 Calcium hydrophosphate	4.37	4.37	4.37	4.37
石粉 Stone flour	1.00	1.00	1.00	1.00
沸石粉 Zeolite powder	2.14	1.35	0.55	0.00
预混料 Premix	2.90	2.90	2.90	2.90
合计 Total	100.00	100	100	100
营养组成 Proximate composition (% dry matter basis)				
粗蛋白 Crude protein	44.70	44.92	45.70	45.97
粗脂肪 Crude lipid	10.81	9.77	9.18	9.76
粗灰分 Ash	22.15	20.93	19.58	19.14
能量 Gross energy/(MJ/kg)	18.57	18.62	18.86	19.17

### 1.5 实验样品的采集和处理

养殖实验结束后,禁食 24 h,对每缸实验鱼进行称重并记录。每缸随机取 3 尾大菱鲂,称重记录后,装入塑封袋保存至-20℃冰箱中,用于全鱼常规营养成分指标检测;每缸随机取 6 尾鱼尾静脉抽血,静置 2 h,使用 D1008E 离心机(美国)于 3000 r/min 离心 11 min,取血清,保存至-80℃冰箱待测血清生理生化指标;每缸随机取 3 尾鱼,称重、记录,使用游标卡尺测量并记录每条鱼的体重、体长,再迅速于冰盘上解剖,取完整内脏团,采用生理盐水冲洗,滤纸吸干,称重、记录,再剥离肝脏,称重、记录,放入液氮中速冻,用于肝脏抗氧化能力的测定;每缸取 3 尾鱼在其背、腹面各设置 3 个固定点进行色差的测定。

### 1.6 养殖性能指标

存活率(survival rate, SR, %)=100×终末鱼数量/初始鱼数量;

增重率(weight gain rate, WGR, %)=100×(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>)/W<sub>0</sub>;

饲料系数(feed efficiency ratio, FCR)=I<sub>t</sub>/(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>);

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=100×[lnW<sub>t</sub>-lnW<sub>0</sub>]/t;

摄食率(feeding rate, FR, %/d)=100×I<sub>t</sub>/[t×(W<sub>t</sub>+W<sub>0</sub>)/2];

式中, W<sub>t</sub>(g)为终末体重; W<sub>0</sub>(g)为初始体重; t 为实验天数; I<sub>t</sub>(g)为摄入饲料干重。

肥满度(condition factor, CF)=100×体重/体长<sup>3</sup>;

脏体比(viscerosomatic index, VSI, %)=100×内脏重/体重;

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)=100×肝脏重/体重。

### 1.7 样品分析

水分含量采用直接干燥法进行测定(GB/T6435);粗蛋白含量采用 FOSS 全自动凯氏定氮仪测定(GB/T6432);粗脂肪含量采用索氏提取法测定(GB/T6433);粗灰分含量采用马弗炉灼烧法测定(GB/T6438);能量采用 Parr6300 (Parr, 美国)全自动氧弹式热量计测定。血清生理生化指标在河北师范大学采用 Mindary BS-180 全自动分析仪测定。肝脏组织样本的超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量以及总蛋白浓度的测定分别采用 BCA(bicinchoninic acid)法、黄嘌呤氧化酶法、TBA 法,即硫代巴比妥酸(Thiobarbituric Acid)法,所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所。体色采用美能达 CR-400 色彩色差仪(日本)进行测定。

### 1.8 数据处理及统计分析

各实验数据以平均值±标准差(mean±SD)表示,使用 Statistica 10.0 软件首先对各项实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),差异显著时进行 Duncan's 多重比较检验, P<0.05 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲂养殖性能的影响

从表 2 可以看出,饲料中黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲂的终末均体重(FBW)、WGR 及 SGR 的影响均差异显著(P<0.05)。其中, FM 和 HI20 组显著高于 HI40 和 HI40AA 组, FM 和 HI20 组、HI40 和 HI40AA 组相比无显著差异(P>0.05);黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲂的 FR 无显著影响(P>0.05);FCR 在各组之间相比也无显著差异(P>0.05);大菱鲂的 SR、VSI、HSI 和 CF 各组相比均无显著差异(P>0.05)。

表 2 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲂生长、饲料利用及形体指标的影响(平均数±标准差)

Tab.2 Effects of replacement of fish meal with *H. illucens* in diets on the growth performance, feed utilization and body index of turbot (Mean±SD)

指标 Items	实验组 Groups			
	FM	HI20	HI40	HI40AA
存活率 SR%	99.00±1.00	99.67±0.58	99.00±1.73	99.33±0.58
终末均体重 FBW/g	49.78±0.88 <sup>a</sup>	49.00±1.40 <sup>a</sup>	45.30±1.52 <sup>b</sup>	45.01±0.89 <sup>b</sup>
摄食率 FR/(%/d)	0.98±0.02	0.99±0.02	0.93±0.05	0.92±0.04
增重率 WGR/%	88.09±3.25 <sup>a</sup>	84.68±4.77 <sup>a</sup>	70.41±5.24 <sup>b</sup>	70.66±11.84 <sup>b</sup>
特定生长率 SGR/(%/d)	1.13±0.03 <sup>a</sup>	1.10±0.05 <sup>a</sup>	0.95±0.05 <sup>b</sup>	0.95±0.13 <sup>b</sup>
饲料系数 FCR	0.91±0.00	0.93±0.04	1.01±0.12	1.01±0.10
肝体比 HSI/%	2.09±0.33	2.50±0.50	2.10±0.70	1.85±0.43
脏体比 VSI/%	6.36±0.55	6.54±0.65	6.38±0.78	6.02±0.40
肥满度 CF	4.19±0.90	4.22±0.45	4.63±0.45	4.84±0.72

注:同一行各数值不同的字母表示差异显著(P<0.05),下同

Note: Different letters on each numerical value in the same line indicated significant difference (P<0.05), the same as below

## 2.2 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆鱼体成分的影响

从表 3 可以看出,黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆体成分中的水分、粗蛋白及粗灰分含量均无显著影响( $P>0.05$ )。HI40AA 组大菱鲆粗脂肪含量显著低于其他 3 组( $P<0.05$ )。

## 2.3 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆血清生化指标的影响

从表 4 可以看出,FM 和 HI20 组的总胆固醇(TCHO)和高密度脂蛋白(HDL)含量均显著高于 HI40 和 HI40AA 组( $P<0.05$ )。FM 组血清中低密度脂蛋白(LDL)

含量显著高于各实验组( $P<0.05$ )。除此之外,甘油三酯(TG)、血糖(GLU)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)与碱性磷酸酶(ALP)等指标各实验组相比无显著差异( $P>0.05$ )。

## 2.4 黑水虻幼虫粉对大菱鲆肝脏抗氧化能力的影响

从表 5 可以看出,黑水虻幼虫粉替代鱼粉后,各实验组 SOD 活力及 MDA 含量相比均无显著差异( $P>0.05$ )。但随替代比例的增加,各实验组呈先升高再降低的趋势,各黑水虻幼虫添加组 SOD 活力均高于 FM 组。

表 3 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆体成分的影响(平均数±标准差)

Tab.3 Effects of replacement of fish meal with *H. illucens* in diets on the body composition of turbot (Mean±SD)

指标 Indexes	实验组 Groups			
	FM	HI20	HI40	HI40AA
水分 Moisture/%	78.11±0.43	78.43±0.56	78.47±0.30	78.99±0.25
粗蛋白 Crude protein/%	14.65±0.31	14.58±0.32	14.70±0.23	14.45±0.06
粗脂肪 Crude lipid/%	3.00±0.33 <sup>a</sup>	2.91±0.31 <sup>a</sup>	2.83±0.12 <sup>a</sup>	2.32±0.19 <sup>b</sup>
粗灰分 Ash/%	3.49±0.08	3.40±0.12	3.49±0.11	3.57±0.05

表 4 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆血清生化指标的影响(平均数±标准差)

Tab.4 Effects of replacement of fish meal with *H. illucens* in diets on the serum biochemical indexes of turbot (Mean±SD)

指标 Indexes	实验组 Groups			
	FM	HI20	HI40	HI40AA
甘油三酯 TG/(mmol/L)	5.53±2.25	5.72±3.34	3.75±1.20	4.16±1.19
总胆固醇 TCHO/(mmol/L)	3.36±0.98 <sup>a</sup>	3.24±1.01 <sup>a</sup>	1.93±0.59 <sup>b</sup>	1.89±0.31 <sup>b</sup>
血糖 GLU/(mmol/L)	2.11±1.17	1.96±0.30	1.68±0.42	1.64±0.22
高密度脂蛋白 HDL/(mmol/L)	2.76±0.71 <sup>a</sup>	2.97±0.53 <sup>a</sup>	1.85±0.48 <sup>b</sup>	1.72±0.28 <sup>b</sup>
低密度脂蛋白 LDL/(mmol/L)	0.90±0.31 <sup>a</sup>	0.60±0.22 <sup>b</sup>	0.35±0.10 <sup>b</sup>	0.34±0.07 <sup>b</sup>
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	9.93±1.37	9.23±0.78	9.40±2.31	9.12±1.61
谷草转氨酶 AST/(U/L)	81.17±54.16	63.88±8.97	94.22±55.28	72.71±28.64
碱性磷酸酶 ALP/(U/L)	15.41±1.86	15.75±1.33	15.02±0.99	13.58±0.83

表 5 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆肝脏抗氧化能力的影响(平均数±标准差)

Tab.5 Effects of replacement of fish meal with *H. illucens* in diets on the hepatic antioxidant capacity of turbot (Mean±SD)

指标 Indexes	实验组 Groups			
	FM	HI20	HI40	HI40AA
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	68.93±23.12	90.56±23.97	76.04±20.30	71.14±24.83
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	3.30±1.86	4.11±1.43	4.08±1.78	2.17±0.53

## 2.5 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲆体色的影响

从表 6 可以看出,HI40 和 HI40AA 组大菱鲆幼鱼的体色特征表现为背部体色  $L^*$ 值、 $a^*$ 值显著低于 FM 和 HI20 组( $P<0.05$ )。HI40 组的  $b^*$ 值显著高于其他各组( $P<0.05$ ), HI20 和 HI40AA 组的  $b^*$ 值也显著高于 FM 组( $P<0.05$ ); 大菱鲆幼鱼腹部体色  $L^*$ 值、 $a^*$

值和  $b^*$ 值相比均无显著差异( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

黑水虻虫粉替代饲料中鱼粉蛋白质的研究在一些鱼类中已有报道。Caimi等(2020)在含70%鱼粉的饲料中,以脱脂黑水虻虫粉替代了鱼粉用量的25%

表6 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大菱鲂体色的影响(平均数±标准差)

Tab.6 Effects of replacement of fish meal with *H. illucens* in diets on the skin color of turbot (Mean±SD)

测量部位 Measured position	指标 Items	实验组 Group			
		FM组	HI20组	HI40组	HI40AA组
背部 Dorsal area	<i>L</i> *	48.73±3.50 <sup>a</sup>	47.67±2.50 <sup>a</sup>	45.65±2.67 <sup>bc</sup>	43.52±3.26 <sup>b</sup>
	<i>a</i> *	-2.10±0.52 <sup>a</sup>	-2.16±0.44 <sup>a</sup>	-2.59±0.52 <sup>b</sup>	-2.59±0.32 <sup>b</sup>
	<i>b</i> *	0.93±1.53 <sup>c</sup>	1.98±0.58 <sup>b</sup>	3.09±1.06 <sup>a</sup>	2.32±0.85 <sup>b</sup>
腹部 Ventral area	<i>L</i> *	62.81±5.53	62.50±5.54	59.85±6.07	59.63±6.38
	<i>a</i> *	-2.28±0.77	-2.34±0.76	-2.34±0.87	-2.45±0.65
	<i>b</i> *	-1.78±1.76	-2.23±1.98	-1.98±2.09	-2.20±1.49

时,西伯利亚鲟鱼(*Acipenser baerii*)的生长不受影响,当替代比例高达50%时,生长出现显著下降;Rui等(2017)研究发现,饲料中脱脂黑水虻幼虫粉的添加量为19.5%时,可改善海鲈的生长和摄食,但未达到显著水平;Xiao等(2018)研究表明,黄颡鱼饲料中含黑水虻虫粉为22.3%时,其WGR和SGR有所提高,当添加水平高于34.3%时,生长性能下降。其他昆虫蛋白在鱼类饲料研究中也有相似的结果,梅琳等(2015)在含鱼粉为65%的基础饲料中,采用蛹肽蛋白粉替代鱼粉用量的15%时,不会对大菱鲂幼鱼的生长和饲料利用造成影响,若高于此比例,幼鱼的生长性能随替代比例的增加而显著降低;饶远等(2019)在含鱼粉40%的基础饲料中,以蚕粉替代17.90%~22.00%的鱼粉蛋白,加州鲈幼鱼的生长性能不受影响。与以上研究结果相似,本研究中,随着饲料中全脂黑水虻虫粉添加量的增加,大菱鲂的生长呈下降趋势,当黑水虻幼虫粉替代鱼粉蛋白20%时,对大菱鲂的生长性能无显著影响,然而,当替代水平达到40%(在饲料中的添加比例为27.39%)时,生长性能出现显著降低。此研究结果与Kroeckel等(2012)研究结果有所不同。Kroeckel等(2012)研究发现,当脱脂黑水虻虫粉替代鱼粉比例超过17%时,大菱鲂的SGR出现显著降低。这说明脱脂工艺可能也引起黑水虻幼虫粉中某些营养物质的流失,降低了黑水虻幼虫粉的营养价值。脱脂黑水虻虫粉与全脂黑水虻虫粉相比,其在饲料中替代鱼粉时的水平要略低。当替代鱼粉比例过高时,2种黑水虻虫粉均导致大菱鲂的生长性能降低。黑水虻虫粉高水平替代带来的不良影响可能与黑水虻虫粉中的氨基酸模式及高含量的几丁质有关。黑水虻幼虫粉中的必需氨基酸模式略逊于鱼粉,赖氨酸和蛋氨酸等的含量低于鱼粉(Li et al, 2021)。本研究在HI40AA组额外补充了赖氨酸和蛋氨酸后,仍未达到提高大菱鲂生长的目的,这间接说明本研究中高含量黑水虻虫粉降低大菱鲂生长的主要原因可能不在于其氨基酸模式,而是

由于其所含有的几丁质成分。黑水虻虫具有高含量的几丁质, Kroeckel等(2012)并没有在大菱鲂的肠中检测到几丁质酶的活性,高含量的几丁质能抑制消化道中营养物质的吸收,从而降低了大菱鲂的生长。

本研究中,大菱鲂各实验组VSI、HSI、CF相比无显著差异。但Kroeckel等(2012)研究表明,饲料中脱脂黑水虻虫粉含量升高使大菱鲂的CF和HSI含量显著降低,与本研究结果略有不同,这可能与实验所使用大菱鲂的大小及黑水虻幼虫品质存在的差异有关,不同的养殖基质饲养黑水虻幼虫,对幼虫的营养成分影响很大。本研究中,各实验组大菱鲂体成分中的粗蛋白、水分及粗灰分含量相比均无显著影响,而随着替代比例的增加,粗脂肪含量下降,这与黑水虻幼虫制品替代鱼粉在虹鳟、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)中的研究结果相似(St-hilair et al, 2007; 胡俊茹等, 2018)。在一些鱼类的研究中发现,随着黑水虻替代鱼粉的比例增加,鱼体脂肪呈现出不同的变化规律。Zhang等(2008)和Li等(2016)研究表明,几丁质及其衍生物能干扰脂肪酸的合成以及促进肝脏中脂蛋白和TG的水解。因此,脂肪含量的降低可能是由于几丁质影响了鱼体肝脏脂肪酸的合成(Li et al, 2017)。饲料中脂肪酸的比例不同,会对鱼体脂质消化率以及能量变化产生影响,进而影响鱼体脂肪的含量(广哲师等, 2021)。但大菱鲂脂肪代谢受黑水虻虫粉影响的调控机制还有待进一步研究。

鱼类的血清生理生化指标可以体现机体的营养代谢特点及生理健康状况。本研究中,替代比例为40%时,TCHO含量显著降低,与黑水虻虫制品在幼建鲤(*Cyprinus carpio* Jian)、海鲈、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)等饲料中添加的研究结果相似(Li et al, 2017; Rui et al, 2017; 胡俊茹等, 2018),可能与饲料中黑水虻虫与饲料中添加的油脂组成有关。HDL将机体中的胆固醇运送回肝脏组织中进行代谢,LDL作用则相反,且易于沉积而引起疾病的发生。本研

究中,大菱鲆饲料中黑水虻幼虫粉替代鱼粉超过 40% 时, HDL 含量显著降低, FM 组的 LDL 含量显著高于其他 3 个实验组, 也进一步说明在此替代比例下, 大菱鲆幼鱼血清中胆固醇在肝脏和其他组织的输送过程出现了异常。这与韩星星(2019)使用脱脂黑水虻幼虫粉替代鱼粉在大黄鱼的研究结果相一致。郝甜甜等(2019)使用复合蛋白源替代大菱鲆幼鱼饲料中的鱼粉时发现, 大菱鲆脂质代谢出现异常, 主要表现为血清胆固醇、HDL 及 LDL 降低。ALT 和 AST 在正常情况下分布于肝细胞中, 当细胞受到损伤时, 这 2 种酶会从肝细胞释放到血清中, 从而含量升高, 其升高程度表明肝细胞的受损程度。本研究中, 以黑水虻幼虫粉替代大菱鲆饲料中的鱼粉未对血清中的 ALT 及 AST 含量造成显著影响, 但 40% 组的 AST 比对照组高, 表明黑水虻幼虫粉较高水平的替代可能对大菱鲆幼鱼的肝脏产生一定的应激。

SOD 具有清除活性氧, 能阻断脂质过氧化作用, 其活力的变化可以反映鱼机体健康及免疫状态(Campa-Cordova *et al.*, 2002); MDA 是脂质发生过氧化反应后的产物之一, 不仅能表明机体脂质过氧化程度, 还可以评价细胞氧化损伤程度(白冬清等, 2011)。刘兴等(2017)研究发现, 随着黑水虻替代鱼粉比例的增加, 锦鲤(*Cyprinus carpio*)肝胰脏内 SOD 活力升高, MDA 含量降低; 黑水虻幼虫替代鱼粉组锦鲤肝胰脏 SOD 活力均显著高于鱼粉组(石洪玥等, 2019); 适量的脱脂黑水虻幼虫粉替代鱼粉对大黄鱼幼鱼的抗氧化能力有一定的增强作用, 但是高比例的替代则可能引发机体的氧化应激反应(韩星星, 2019)。黑水虻幼虫的体内含有生物活性物质, 如抗菌肽、甲壳素等, 可以作为免疫增强剂提高动物机体非特异免疫能力和抗氧化能力(徐齐云等, 2012)。尽管本研究中各实验组 SOD 活力与 MDA 含量相比无显著影响, 但与上述研究结果类似的是, 各实验组大菱鲆幼鱼肝脏 SOD 活力随着替代比例的增加, 呈先升高后降低的趋势, MDA 含量也呈此趋势。究其原因, 可能是高水平的替代加快了大菱鲆幼鱼正常的代谢, 从而产生了过量的  $O_2^-$ , 机体处于一种氧化应激状态, 所以使 MDA 含量有所增加, 为清除过量 MDA 过氧化产物, SOD 及相关酶活性也相应增强。

鱼类的体色在评价鱼类品质等方面不可或缺, 体色不仅能反应外界环境对鱼体的影响, 也能代表其健康状况, 体色异常则意味着品质和价格的降低(Breithaupt, 2007)。鱼类的体色一方面直接受到饲料源中色素物质的影响, 另一方面也会间接受到外界环境、饲料营养与机体健康状况的影响。本研究发现, 全脂黑水虻

幼虫粉替代鱼粉比例达到 40%, 大菱鲆幼鱼背部体色亮度减弱。Hearing(2005)研究表明, 体表颜色较暗是因为其中含有较多的黑色素。而酪氨酸酶作为限速酶控制着黑色素合成, 酪氨酸酶活力与黑色素的含量呈正比关系(Koga *et al.*, 1999)。本研究未对大菱鲆幼鱼体内酪氨酸酶的活力进行测定, 推测黑水虻幼虫粉在饲料中添加比例较高时, 影响了酪氨酸酶活力。类胡萝卜素是鱼体红色素细胞和黄色素细胞的成色物质之一, 黑水虻幼虫粉替代鱼粉比例超过 40% 时, 大菱鲆幼鱼背部的红度和黄度增强, 原因可能为黑水虻幼虫中含有大菱鲆幼鱼能够代谢的类胡萝卜素, 对鱼体呈色起到了一定作用, 类胡萝卜素的着色效果受饲料中脂肪的添加量和来源的影响(刘晓东等, 2018), 也可能是饲料脂肪酸改变引起了此变化。目前, 蛋白替代对鱼类体色的影响研究较少, 本研究中, 大菱鲆体色改变的内在机制还需今后进一步探讨。

#### 4 结论

本研究条件下, 全脂黑水虻幼虫粉可以替代 20% 的鱼粉蛋白而不影响大菱鲆幼鱼生长及健康状态, 因此, 全脂黑水虻幼虫粉在大菱鲆幼鱼饲料中替代鱼粉蛋白的推荐量为 20%。

#### 参 考 文 献

- BAI D Q, WU X, GUO Y J, *et al.* Effects of long-term feeding of Astragalus polysaccharide on Antioxidant and Non-specific immune indices of Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(9): 1622–1630 [白冬清, 吴璇, 郭永军, 等. 长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼抗氧化及非特异性免疫指标的影响. 动物营养学报, 2011, 23(9): 1622–1630]
- CAIMI C, RENNA M, LUSSIANA C, *et al.* First insights on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal dietary administration in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) juveniles. Aquaculture, 2020, 515: 734539–734539
- CAMPA-CORDOVA A I. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. Fish and Shellfish Immunology, 2002, 12: 353–366
- CHEN X Y, HU J R, WANG G X, *et al.* Effects of fish meal replacement by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on growth performance, serum biochemical indices and meat quality of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(6): 2788–2799 [陈晓瑛, 胡俊茹, 王国霞, 等. 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、肌肉品质及血



- 清生化指标的影响. 动物营养学报, 2019, 31(6): 2788–2799]
- DU Y W, SUN C. Analysis of influencing factors and countermeasures of fishmeal market demand in China. China Fishery Economy, 2016, 34(3): 10–17 [杜玉雯, 孙琛. 我国鱼粉市场需求的影响因素及对策分析. 中国渔业经济, 2016, 34(3): 10–17]
- HAO T T, WANG J Y, LI B S, *et al.* Effects of partial replacement of Fish meal by Compound Animal and plant Proteins on growth, body composition and Physiological and biochemical indices of juvenile turbot. Progress in Fishery Science, 2019, 40(4): 11–20 [郝甜甜, 王际英, 李宝山, 等. 复合动植物蛋白部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 11–20]
- HAN X X. Study on the application of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae meal in the compound feed of juvenile large yellow croaker. Master's Thesis of Jimei University, 2019 [韩星星. 脱脂黑水虻虫粉在大黄鱼幼鱼配合饲料中的应用研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2019]
- HEARING VINCENT J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. Journal of Dermatological Science, 2005, 37(1): 3–14
- HU J R, WANG G X, MO W Y, *et al.* Effects of replacement of fish meal with larvae meal of black gadfly on growth performance, body composition, plasma biochemical indices and tissue structure of juvenile sea bass (*Perch perch*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(2): 613–623 [胡俊茹, 王国霞, 莫文艳, 等. 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对鲈鱼幼鱼生长性能、体组成、血浆生化指标和组织结构的影响. 动物营养学报, 2018, 30(2): 613–623]
- KOGA A, WAKAMATSU Y, KUROSAWA J, *et al.* Oculocutaneous albinism in the 16 mutant of the medaka fish is associated with a deletion in the tyrosinase gene. Pigment cell research, 1999, 12(4): 250–258
- KROECKEL S, HARJES A G E, ROTH I, *et al.* When a turbot catches a fly: evaluation of a prepupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 2012, 364: 345–352
- KUANG Z S, LI X, Zhou P F, *et al.* Application of black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein in replacing fish meal of Marine fish culture. China Feed, 2021(7): 101–105 [邝哲师, 李鑫, 周鹏飞, 等. 黑水虻蛋白在海水鱼养殖业中替代鱼粉的应用概况. 中国饲料, 2021(7): 101–105]
- LI M M, LI M F, WANG G Y *et al.* Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal can partially replace fish meal in diets for adult Chinese soft-shelled turtles. Aquaculture, 2021, 541: 736758
- LI Q P, GOONERATNE S R, WANG R L, *et al.* Effect of different molecular weight of chitosans on performance and lipid metabolism in chicken. Animal Feed Science and Technology, 2016, 211: 174–180
- LI S, JI H, ZHANG B, *et al.* Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*): growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. Aquaculture, 2017, 477: 62–70
- LIU S S. Study on the application of black water fly larvae replacing fish meal in carp feed. Master's Thesis of Northwest A & F University, 2016 [刘世胜. 黑水虻幼虫替代鱼粉在鲤鱼饲料中的应用研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016]
- LIU X, SUN X L, LI L X, *et al.* Effects of replacement of fish meal by black soldier fly on growth and health status of Koi Carp. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(4): 422–427 [刘兴, 孙学亮, 李连星, 等. 黑水虻替代鱼粉对锦鲤生长和健康状况的影响. 大连海洋大学学报, 2017, 32(4): 422–427]
- LIU X D, CHEN Z Z. Pigment cells and body color regulation in fishes. Aquatic Science and Technology Information, 2008, 35(1): 13–18 [刘晓东, 陈再忠. 鱼类色素细胞及体色调控. 水产科技情报, 2008, 35(1): 13–18]
- LU R H, CHEN Y N, YU W P, *et al.* Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal can replace soybean meal in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diets. Aquaculture Reports, 2020, 18: 100520
- MEI L, ZHOU H H, MAI K S, *et al.* Effects of fish meal replacement by pupal peptide protein on growth performance, feed utilization, digestive and metabolic enzymes and immune performance of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Science, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92]
- OTERI M, DI ROSA A R, LO P, *et al.* Black soldier fly larvae meal as alternative to fish meal for aquaculture feed. Sustainability, 2021, 13: 5447
- PENG K, XIAO H F, MO W Y, *et al.* Effects of replacing fish meal with black soldier fly larvae meal on growth performance, physical indexes, body composition and nutrient retention rates of *Micropterus salmoides*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(11): 1–9 [彭凯, 萧鸿发, 莫文艳, 等. 黑水虻幼虫粉替代鱼粉对加州鲈生长性能、形体指标、体成分及营养物质沉积率的影响. 动物营养学报, 2021, 33(11): 1–9]
- RENNA M, SCHIAVONE A, GAI F, *et al.* Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia Illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2017, 8(4): 957–969
- RUI M, ANTONIO S, RENATO S L, *et al.* Black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae meal as a fish meal replacement in diets for European Seabass (*Dicentrarchus labrax*).

- Aquaculture, 2017, 476: 79–85
- RAO Y, XIANG X, HUANG X Z, *et al.* Effects of replacement of fish meal with silkworm powder on growth performance, feed intake, and body composition of juvenile black bass (*Micropterus salmonides*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 31–38 [饶远, 向泉, 黄先智, 等. 蚕粉替代鱼粉对加州鲈幼鱼生长、饲料利用及体成分的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 31–38]
- ST-HILAIR E S, SHEPPAR D C, TOMBERLIN J K, *et al.* Fly prepupae as a feed stuff for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(1): 59–67
- SHI H Y, CHEN Y X, SUN X L, *et al.* Effects of direct feeding of black soldier fly as an alternative diet on growth and digestion, hepatopancreas antioxidant enzymes and serum non-specific immune indices of Koi carp. *Feed research*, 2019, 42(6): 17–22 [石洪玥, 陈雨滢, 孙学亮, 等. 黑水虻幼虫替代饲料直接投喂对锦鲤生长消化、肝胰脏抗氧化酶和血清非特异性免疫指标的影响. *饲料研究*, 2019, 42(6): 17–22]
- XIAO X, JIN P, ZHENG L, *et al.* Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Research*, 2018, 49(4), 1569–1577
- XU Q Y, YU G H, AN X C, *et al.* Research on extraction of chitin and preparation of chitosan from pupal shell of Black soldier fly. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(5): 87–88 [徐齐云, 喻国辉, 安新城. 黑水虻蛹壳中几丁质的提取及壳聚糖制备研究. *广东农业科学*, 2012, 39(5): 87–88]
- ZHANG J, LIU J, LI L, *et al.* Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutrition Research*, 2008, 28(6): 383–390

(编辑 陈 严)

## Effects of Replacement of Fish Meal with Full-Fat *Hermetia illucens* Larvae on Culture Performance, Physiological Metabolism, and Skin Color in Turbot

BEN Lingzhi<sup>1</sup>, SHI Xueying<sup>1</sup>, GUO Jinlong<sup>2</sup>, CHEN Xiuling<sup>3</sup>, ZHANG Peiyu<sup>1</sup>, LIU Haiyan<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei 050024, China;

2. Hebei Ocean and Fisheries Science Research Institute, Qinhuangdao Hebei 066002, China;

3. Beidaihe New District Aquatic Technology Promotion Station, Qinhuangdao Hebei 066600, China)

**Abstract** Turbot (*Scophthalmus maximus*) is an important mariculture species in northern China because of its high economic value. As a cold-water carnivorous fish, its rapid growth relies on high dietary protein in the form of fish meal. Fish meal is a major component of aquatic feed because of its highly digestible protein, balanced amino acids, and good palatability. However, global fish meal production is insufficient, and its price has soared due to overfishing and climate change. There is an urgent need to find high-quality protein sources to replace fish meal in the diet. Many experimental studies on replacing fish meal with protein sources have identified shortcomings. Plant protein sources contain anti-nutritional factors and defects in the amino acid profile, and have poor palatability; animal protein sources are unstable in their nutrient composition. Much work remains to be done to identify new protein sources. Insects are the largest organism community in ecosystems, and offer a new kind of protein source with great potential. The European Commission has recently approved the use of protein derived from insects in aquatic feed. *Hermetia illucens* is a saprophytic insect that can consume livestock manure and domestic waste to produce high-value animal feedstuff. Its larvae can be used as an alternative protein source to fish meal because they are rich in amino acids and polyunsaturated fatty acids. In addition, *H. illucens* is fed on decaying organic matter such as food waste, animal excrement, and animal and plant carcasses; the breeding cost is low, and the adults do not disturb humans. It can be added

① Corresponding author: LIU Haiyan, E-mail: liuhaiyan@hebtu.edu.cn

to the feed of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), california bass (*Micropterus salmoides*), and *Scophthalmus maximus* (turbot). Most research has investigated the defatted dry powder of *H. illucens*. However, there are no reports on the replacement of fish meal with full-fat *H. illucens* in turbot. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the application of *H. illucens* larvae as turbot feed. This experiment was conducted to investigate the effects of replacement of fish meal protein with full-fat *H. illucens* larvae meal on the growth performance, feed utilization, serum biochemical indexes, and skin color of turbot, in order to provide important information for turbot culture. Four treatments were designed for this study. Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with *H. illucens* larvae meal by substituting it into fish meal at 0% (FM), 20% (HI20), and 40% (HI40); the fourth experimental diet (HI40AA) was HI40 supplemented with methionine and lysine. A total of 1200 turbot [initial body weight: (26.57±0.54) g] were randomly distributed into four experimental diets, each group with three replicates, and each replicate with 100 juvenile turbot. The fish were fed twice daily to apparent satiation. The water temperature was kept at 11.0°C~14.4°C and the water was changed twice daily. After the 56 d feeding trial, the results showed that *H. illucens* larvae meal significantly influenced weight gain and specific growth rate, which were significantly lower in the HI40 and HI40AA groups than in the HI20 and FM groups ( $P<0.05$ ); no significant differences were observed in the feeding rate, feed conversion ratio, hepatosomatic index, viscerosomatic index, condition factor, or body composition, including crude protein and ash, among all groups ( $P>0.05$ ). The serum cholesterol and high-density lipoprotein in the HI40 and HI40AA groups were significantly lower than those in the HI20 and FM groups ( $P<0.05$ ), and the content of serum low-density lipoprotein in the FM group was significantly higher than that in the other groups ( $P<0.05$ ). The values of  $L^*$  (lightness) and  $a^*$  (redness) of turbot dorsal skin color in the HI40 and HI40AA groups were significantly lower than those in the FM and HI20 groups ( $P<0.05$ ). The value of  $b^*$  (yellowness) of turbot dorsal skin color in the FM group was significantly lower than those in the other groups ( $P<0.05$ ); it was higher in the HI40 group than in the HI20 and HI40AA groups ( $P<0.05$ ). No significant differences were observed in skin color parameters in the ventral area of the turbot ( $P>0.05$ ). In conclusion, the replacement of dietary fish meal with *H. illucens* did not affect the growth performance and physiological parameters of turbot when the replacement level was no more than 20%, which is therefore the recommended substitution level of fish meal by full-fat *H. illucens* larvae meal in the diet of juvenile turbot.

**Key words** Turbot; *Hermetia illucens*; Growth performance; Serum biochemical indexes; Skin color

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210126002

http://www.yykxjz.cn/

唐荣叶, 苏孟园, 杨汶珊, 徐杰杰, 王涛, 尹绍武. 斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 89-97

TANG R Y, SU M Y, YANG W S, XU J J, WANG T, YIN S W. Analysis of microsatellite distribution characteristics in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) genome. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 89-97

# 斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析\*



唐荣叶 苏孟园 杨汶珊 徐杰杰 王涛<sup>①</sup> 尹绍武<sup>①</sup>

(南京师范大学海洋科学与工程学院 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心 江苏 南京 210023)

**摘要** 为了解斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)全基因组中完整型微卫星的分布特征,本研究使用生物信息学软件 MISA 对其全基因组微卫星进行了搜索并分析。结果显示,在斑点叉尾鲷29条染色体中,筛选到完整型微卫星共 510 256 个,总长度达 11 036 941 bp。其中,微卫星数量最多的是 2 号染色体(25 284 个),其次分别是 3 号、1 号和 5 号染色体,29 号染色体的微卫星数量最少,只有 11 591 个。每条染色体长度与位于其上的微卫星的数量均显著相关(SPSS,  $r=0.98$ ,  $P<0.01$ )。27 号染色体的微卫星相对丰度最大(785.03 个/Mb),11 号染色体的微卫星相对丰度最小(615.89 个/Mb)。6 种重复拷贝类型的微卫星中,单碱基的数量最多,占总数的 45.31%,随后依次是二碱基(38.53%)、三碱基(8.73%)、四碱基(6.93%)、五碱基(0.46%)和六碱基(0.04%)。斑点叉尾鲷全基因组微卫星中,前 10 种优势重复拷贝类别为 A、AC、AG、AT、AAT、AAAT、C、AAC、AAAC 和 AAG,表现出明显的 A、T 碱基优势。本研究结果可为进一步研究斑点叉尾鲷全基因组特征提供参考,并为今后进行斑点叉尾鲷分子标记辅助育种及遗传信息评估等工作提供基础资料。

**关键词** 斑点叉尾鲷; 全基因组; 微卫星; 分布特征

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0089-09

微卫星又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs), 广泛分布于真核、原核生物以及病毒中, 是由 1~6 bp 碱基为单元重复串联而成的 DNA 序列。根据核心序列的排列差异, 又分为完整型和不完整型(Morgante *et al.*, 2001)。其中, 完整型指重复序列中不存在其他碱基或重复序列的情况, 不完整型指重复序列中存在错配情况。目前, 对微卫星的研究主要集中于完整型(郑燕等, 2012), 因其具有多态性高、

共显性遗传等特点, 目前被广泛应用于遗传图谱构建 (Shen *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2010)、遗传多样性分析和种质资源保护(Narasimhamoorthy *et al.*, 2008)等研究中。

斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*), 又名沟鲶, 是一种原产于北美洲的大型淡水鱼类。由湖北省水产科学院在 1984 年引入我国后进行驯养, 于 1987 年成功解决人工繁育的难题, 成为我国重要的淡水经济鱼类之一(向建国等, 2004)。另外, 较强的繁殖能力使其

\* 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201742)、江苏省重点研发计划(现代农业)重点项目(BE2017377)、江苏省农业科技自主创新资金[CX(19)2034]和南京师范大学大学生创新创业训练计划项目共同资助 [This work was supported by Agricultural Major New Variety Creation Project of Jiangsu Province (PZCZ201742), Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2017377), Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(19)2034], and Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Nanjing Normal University].

唐荣叶, E-mail: 2508049280@qq.com

① 通讯作者: 王涛, 副教授, E-mail: seawater88@126.com; 尹绍武, 教授, E-mail: yinshaowu@163.com

收稿日期: 2021-01-26, 收修改稿日期: 2021-02-23

能形成庞杂的品系和群体,成为基因组学研究有代表性的生物群体和实验材料(张涛等, 2019)。

近年来,由于远离原产地多年、亲本数量有限等原因,无可避免地对国内的斑点叉尾鲷群体进行近亲繁殖育种,造成了一定程度的遗传漂变和种质退化等问题。因此,斑点叉尾鲷种质资源的保护越来越受到关注。目前,已有随机扩增长度多态性 DNA(RAPD)标记(Liu *et al*, 1998、1999)、扩增片段长度多态性(AFLP)标记(Mickett *et al*, 2003; Simmons *et al*, 2006)和表达序列微卫星(EST-SSR)标记(赫崇波等, 2008)等多种分子标记技术应用于斑点叉尾鲷遗传育种和种质资源方面的研究,而关于斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布规律的研究尚未见报道。本研究对斑点叉尾鲷29条染色体上微卫星序列的数量、频率、密度等分布情况进行统计分析,旨在为进一步系统地进行斑点叉尾鲷全基因组微卫星引物的开发、遗传多样性和遗传育种等研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 全基因组来源

斑点叉尾鲷全基因组数据从 NCBI Genome 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Ictalurus+punctatus>)下载,登录号为 GCA\_004006655.3,以 FASTA 格式文件保存,共包含 29 条染色体,总大小为 11 036 941 bp。

### 1.2 数据处理方法

利用微卫星搜索软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)对斑点叉尾鲷全基因组中完整型微卫星序列进行搜索和统计。本研究统计标准设置为 MISA 默认参数,经过前期的大量研究可知,以此标准搜索全基因组微卫星得出的结果最优(徐杰杰等, 2020),即单碱基重复序列最小拷贝数设置为 10,二

碱基重复序列最小拷贝数设置为 6,三、四、五、六碱基重复序列最小拷贝数设置为 5。考虑碱基互补配对原则和碱基排列顺序的差异,对可聚为同一类型的微卫星进行兼并统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 斑点叉尾鲷全基因组微卫星总体分布特征

从斑点叉尾鲷全基因组中共筛选出 510 256 个完整型微卫星,总长度为 11 036 941 bp,占全基因组 DNA 序列总长度的 1.45%。在斑点叉尾鲷29条染色体中,出现微卫星数量最多的是 2 号染色体,占微卫星总数的 4.96%,其次是 3 号染色体和 1 号染色体,分别占 4.72%和 4.64%。29 号染色体在所有染色体中所含微卫星数量最少,仅占 2.27%。线性回归分析表明,斑点叉尾鲷微卫星数量和其所在的染色体长度具有显著相关性(SPSS,  $r=0.98$ ,  $P<0.01$ ),微卫星频率与染色体长度也具有显著相关性(SPSS,  $r=-0.67$ ,  $P<0.01$ ) (图 1、图 2)。

### 2.2 斑点叉尾鲷29条染色体不同重复类型微卫星分布特征

通过统计分析可知,斑点叉尾鲷全基因组 1~6 碱基重复类型中,含量最高的是单碱基重复类型,其后依次是二碱基和三碱基。在斑点叉尾鲷各染色体碱基重复序列中,除 27 号和 29 号染色体二碱基数量大于单碱基外,其余 27 条染色体均是单碱基微卫星数量最多,其他依次是二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复类型(表 1、图 3)。

### 2.3 斑点叉尾鲷全基因组微卫星各重复类别特征

在斑点叉尾鲷全基因组微卫星各重复类型中,同种碱基类型的不同类别分布有很大差异。在单碱基重复类型中,以 A 碱基重复类别最多, C 碱基重复类别



图 1 斑点叉尾鲷各染色体微卫星数量分布

Fig.1 Distribution of SSRs number in each chromosome of *I. punctatus*



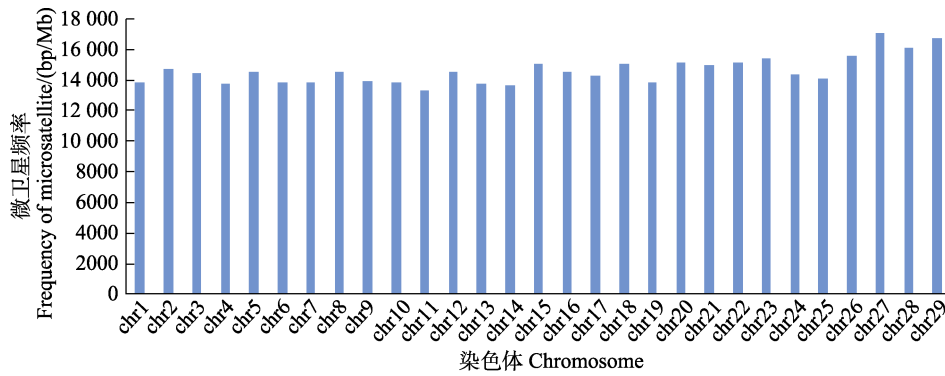


图 2 斑点叉尾鲷各染色体微卫星频率分布

Fig.2 Distribution of SSRs frequency in each chromosome of *I. punctatus*

表 1 斑点叉尾鲷各染色体上各种类型微卫星数量分布情况

Tab.1 Distribution of different types of SSRs in each chromosome of *I. punctatus*

染色体 Chromosome	单碱基 Mono-nucleotide	二碱基 Di-nucleotide	三碱基 Tri-nucleotide	四碱基 Tetra-nucleotide	五碱基 Penta-nucleotide	六碱基 Hexa-nucleotide	总数 Total number	占比 Proportion /%	丰度 Abundance /(ind./Mb)
chr1	10 706	9314	2026	1541	90	8	23 685	4.64	631.43
chr2	10 765	10 510	2210	1670	113	16	25 284	4.96	678.63
chr3	11 153	9133	1966	1708	106	8	24 074	4.72	671.46
chr4	9397	8655	1805	1477	94	15	21 443	4.20	619.81
chr5	9870	8857	1884	1503	87	14	22 215	4.35	666.09
chr6	9679	7564	1808	1440	94	7	20 592	4.04	640.71
chr7	9182	7664	1763	1344	78	11	20 042	3.93	645.94
chr8	9192	7383	1738	1506	134	9	19 962	3.91	656.43
chr9	9246	7323	1700	1400	95	5	19 769	3.87	654.32
chr10	9319	6579	1671	1309	81	4	18 963	3.72	652.86
chr11	8191	6362	1506	1216	84	14	17 373	3.40	615.89
chr12	8163	7613	1657	1241	94	8	18 776	3.68	667.10
chr13	8010	6474	1517	1187	89	2	17 279	3.39	630.03
chr14	7540	6573	1438	1167	72	9	16 799	3.29	629.18
chr15	7986	7062	1632	1301	81	8	18 070	3.54	692.71
chr16	8445	6545	1555	1214	67	9	17 835	3.50	686.91
chr17	7701	6527	1534	1209	85	7	17 063	3.34	658.37
chr18	8296	6242	1616	1272	75	6	17 507	3.43	714.20
chr19	6657	6175	1265	1031	70	5	15 203	2.98	630.12
chr20	6985	6069	1424	1140	85	9	15 712	3.08	699.23
chr21	6935	5508	1348	995	72	6	14 864	2.91	708.25
chr22	6194	5538	1237	918	65	3	13 955	2.73	702.17
chr23	6590	5309	1281	1049	71	5	14 305	2.80	725.33
chr24	6139	4763	1259	963	64	5	13 193	2.59	669.60
chr25	6063	4649	1209	956	65	4	12 946	2.54	665.34
chr26	5789	5457	1185	977	73	7	13 488	2.64	706.88
chr27	6132	6198	1174	981	69	4	14 558	2.85	785.03
chr28	6124	5438	1148	931	62	7	13 710	2.69	744.33
chr29	4675	5143	998	723	45	7	11 591	2.27	759.74

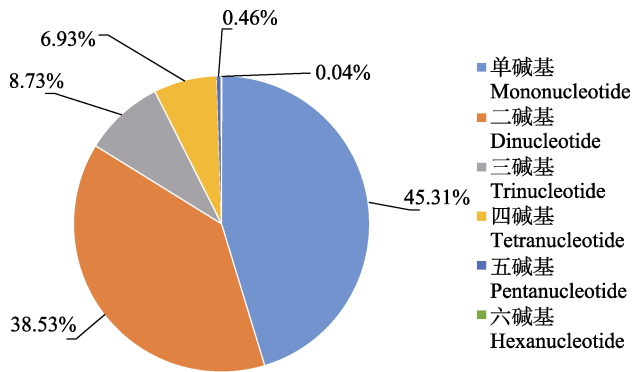


图3 斑点叉尾鲷全基因组微卫星各重复类型占比  
Fig.3 Distribution of SSRs repeat types in genomes of *I. punctatus*

最少。二碱基重复类型的4种类别中,数量最多的是AC类别,其次是AG和AT,CG类别的数量最小,仅占二碱基类型的0.14%。三碱基类别中,数量最多的是AAT,其次是AAC和AAG。四碱基重复类型中,以AAAT和AAAC类别数量最多。五碱基中前3种类别分别是ATAAT(394个)、AAAAC(223个)和AAAAT(168个),分别占五碱基的16.69%、9.45%和7.12%。六碱基各类型数量相对于前5种重复类型数量较少且分布较分散,没有出现明显的优势类别。

#### 2.4 斑点叉尾鲷微卫星各重复类型拷贝数分布特征

斑点叉尾鲷各重复类型微卫星的核心序列拷贝数范围差异很大,最小拷贝为5次,最大拷贝为127次,96.66%的微卫星核心序列拷贝数集中在5~30之间。单碱基重复拷贝数主要集中在10~30次,占单碱基所有微卫星数目的98.30%。二碱基重复拷贝数主要集中在5~30次,占二碱基总数目的93.47%。三碱基重

复拷贝数主要集中在5~20次,占三碱基总数目的98.28%。四碱基重复拷贝数主要集中在5~14次,占四碱基总数目的98.59%。五碱基重复拷贝数主要集中在5~12次,占五碱基总数目的96.53%。六碱基重复拷贝数主要集中在5~7次,占六碱基总数目的83.78%(图4)。

### 3 讨论

#### 3.1 斑点叉尾鲷全基因组微卫星序列分布特征分析

微卫星标记是一种应用广泛的分子标记技术,斑点叉尾鲷是我国重要的水产养殖品种,将微卫星标记技术运用于斑点叉尾鲷的研究中,能很好地为斑点叉尾鲷分子标记辅助育种等方面的研究提供基础资料。本研究分析显示,在斑点叉尾鲷约762 Mb的全基因组序列中,微卫星含量为全基因组的1.45%。与人(*Homo sapiens*)(3%)(Subramanian *et al.*, 2003)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(1.8%)(徐杰杰等, 2020)等物种相比,微卫星在斑点叉尾鲷全基因组中分布较少。而与猪(*Sus scrofa*)(0.85%)(戚文华等, 2014)、大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)(0.64%)(李午佼等, 2014)、林麝(*Moschus berezovskii*)(0.42%)(卢婷等, 2017)等相比分布较多,其原因可能是不同物种的基因组大小有差异及基因组内的碱基组成和排列方式不同。

在本研究中,染色体DNA序列的长度与染色体上所含有的微卫星数量具有高度相关性( $SPSS, r=0.98, P<0.01$ ),这与黄杰等(2012)和戚文华等(2013)的研究结果一致。同时也支持了Hancock(1996)的假说:染色体序列越长,微卫星含量越高的趋势。统计

表2 斑点叉尾鲷全基因组微卫星数量最多的10种重复拷贝类别

Tab.2 Top 10 repeated copy categories of microsatellites in genomes of *I. punctatus*

重复类别 Motif	数量 Counts	长度 Length /bp	占比 Percentage /%	平均长度 Average length /bp	丰度 Abundance /(ind./Mb)	密度 Density /(bp/Mb)
A	215 753	2 958 299	93.35	13.71	283.14	3882.25
AC	123 484	3 065 578	62.80	24.83	162.05	4023.04
AG	39 884	1 025 944	20.28	25.72	52.34	1346.37
AT	32 978	1 490 536	16.77	45.20	43.28	1956.07
AAT	25 903	839 853	58.14	32.42	33.99	1102.16
AAAT	15 598	415 802	44.10	26.66	20.47	545.67
C	15 371	219 430	6.65	14.28	20.17	287.96
AAC	7320	151 989	16.43	20.76	9.61	199.46
AAAC	4908	123 278	13.88	25.12	6.44	161.78
AAG	3076	67 944	6.90	22.09	4.04	89.16

注:占比表示该类别在各自重复类型微卫星中的占比

Note: The percentage represents the proportion of different types of SSRs

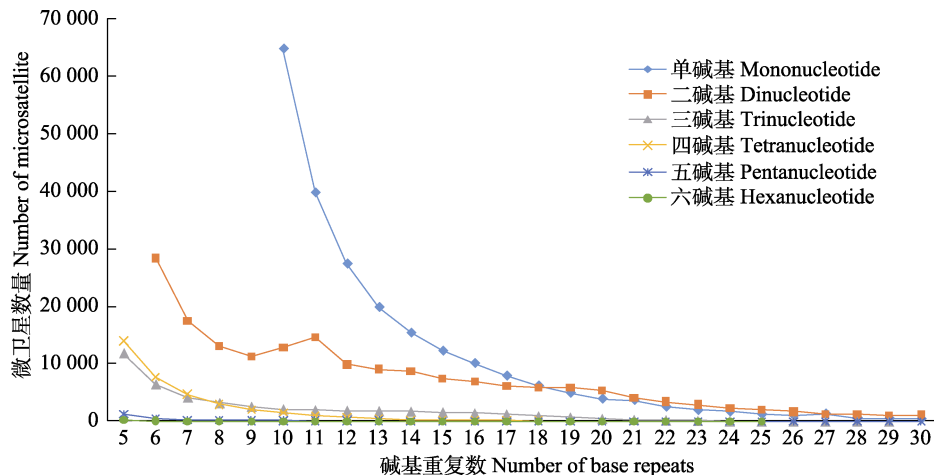


图 4 斑点叉尾鲷全基因组微卫星重复类型重复数分布

Fig.4 Distribution of number of base repetitions SSRs repeat types in *L. punctatus* genome

各染色体上的各种类型微卫星数量,发现各类型的比例除 27 号和 29 号染色体二碱基大于单碱基外,均符合 29 条染色体整体微卫星分布特征,即单碱基最多,其次是二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基。这个规律与张琳琳等(2008)对赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的研究结果相似,而与黄杰等(2012)对红原鸡(*Gallus gallus*)各染色体微卫星分布情况的研究结果相差甚远。高焕等(2005)认为,同一物种的不同染色体上,各种类型的重复序列分布有很大差异。而本研究的结果表明,各种类型的微卫星在各染色体上的分布符合整体规律,这可能和不同物种的不同类型微卫星的特定功能有关系。

斑点叉尾鲷全基因组微卫星中占比例最高的是单碱基类型,其次是二碱基类型,这与猪(戚文华等, 2014)、林麝(卢婷等, 2017)等哺乳动物以及菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)(徐杰杰等, 2021)等水生动物的有关研究结果一致;而与一些其他物种的研究结果相异,如大鼠(*Rattus norvegicus*)(涂飞云等, 2015)、虾虎鱼科(Gobiidae)(白翠翠等, 2016)是以二碱基类型所占比例较高。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(Katti *et al.*, 2001)、德国小蠊(*Blattella germanica*)(王晨等, 2015)等则以三碱基类型占比例最高。从大部分已公布的物种全基因组微卫星分布特征来看,大多数物种都是单碱基或者二碱基占优势,少部分低等动物则为三碱基或六碱基数目最多。黄杰等(2015)认为高等生物基因组更倾向于单碱基微卫星占优势。虽然以上推论不能概括出所有已公布物种的全基因组微卫星的分布特征,但在对比分析中,仍可以从整体上看到大致的规律。而对于不同物种的全基因组微卫星分布情况具有的差别。可能的原因有 2 种: 1)所用微卫星筛选软件

不同,参数设置不同; 2)可能与不同生物的基因表达及调控有关,体现了不同物种基因组的特征。

### 3.2 斑点叉尾鲷各碱基类型微卫星不同类别分布特征分析

不同物种的全基因组中重复序列不仅不同类型分布差异很大,同一类型不同类别也存在很大差异。斑点叉尾鲷全基因组微卫星中的前 5 种优势碱基类别分别为 A、AC、AG、AT 和 AAT,与同属于鲇形目的黄颡鱼(徐杰杰等, 2020)、花斑无须鲢(*Ageneiosus marmoratus*)(未发表)及巨鲟(*Bagarius yarrelli*)(未发表)的前 5 类优势碱基类别完全一致。由此可以猜测,物种亲缘关系越近,微卫星分布特征越接近。王月月等(2015)对 7 种家养动物全基因组微卫星分布的研究也得出了同样的结论。这可能说明微卫星序列是随着生物基因组的进化和发展而不断变化的,由于选择压力等缘故,使得亲缘关系相近的物种其微卫星序列分布规律也接近。

单碱基类型微卫星以 A 类别为主,这与已公布的绝大多数生物的全基因组微卫星单碱基类型特征相符合,如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)(涂飞云等, 2018)、红尾蚺(*Boa constrictor*)(聂虎等, 2017)等。二碱基类型以 AC 所占比例最高,与大鼠(涂飞云等, 2015)、小鼠(*Mus musculus*)(童晓玲等, 2006)的二碱基类型的优势类别一致,而与德国小蠊(王晨等, 2015)、红原鸡(黄杰等, 2012)以 AT 碱基类别占优势的结果并不相同。Bachtrog 等(2000)曾用 6 个黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)群体作为研究对象,得出二碱基重复类型中不同重复类别的微卫星突变率不同的结论,表明在黑腹果蝇基因组微卫星中 AC 类别相

对突变率比 AT 要大得多。而在斑点叉尾鲷基因组中,与黑腹果蝇不同,二碱基 AC 类别所占的比例最高。此现象可能由两个原因造成:1)在斑点叉尾鲷全基因组微卫星中,AC 类别重复序列的突变率明显低于其他类别,使得这个类别被较完整地保留下来;2) AC 类别重复序列容易由其他类别突变而成,且被不断地积累。猜想不同的物种在进化过程中总倾向于选择对自身发展有利的微卫星类别保留下来。对斑点叉尾鲷来说,可能微卫星 AC 重复类别对其进化和生长过程起着十分重要的作用。因此,无论是以上来源中的哪种途径,都使得 AC 类别在数量上占据优势地位。另外,CG 类别的含量最低,综合已有研究的物种的全基因组微卫星特征来看,二碱基 CG 类别重复序列的分布在绝大多数物种中都较低。

三碱基类型中,数目最多的是 AAT 类别,其次是 AAC 和 AAG,这与人的三碱基重复类型的前 3 种类别是一样的(Subramanian *et al*, 2003)。研究表明,某些三碱基重复类别可以形成特殊的结构,如发夹结构、三叶草结构和滑链结构等,这些结构非常的灵活,可能导致它们的遗传不稳定性(Pearson *et al*, 1996),此外,这些结构对基因的表达也起着十分重要的调控作用(戚文华等, 2016)。研究发现,人类的一些遗传疾病,如脆 X 综合征、肌强制性营养不良等与基因组中某些三碱基重复序列的增加有关(Schlötterer, 1998; Kovtun *et al*, 2001),而斑点叉尾鲷三碱基重复序列的前 3 种类别与人的一致,因此,斑点叉尾鲷的某些疾病可能也与三碱基重复序列相关(徐杰杰等, 2021)。

四碱基、五碱基的数量较多的前 2 种类别分别是 AAAT、AAAC 和 ATAAT、AAAAC,六碱基的数量相对于前 5 种重复类型比较少,数量最多的 2 种类别是 TGACTA 和 ATAGTC。与前 3 种碱基类型一样,四碱基、五碱基和六碱基也表现出明显的 A/T 碱基优势。有研究表明,DNA 序列中 G/C 含量越高,微卫星分布越少。对于这个现象,倪守胜等(2018)通过分析虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组的微卫星分布特征,得出 DNA 复制滑动机制和重组机制使得 A/T 重复类型的产生几率更高的结论。Schorderet 等(1992)认为,由于基因组中 CpG 甲基化,胞嘧啶 C 容易在脱氨基作用下突变为胸腺嘧啶 T。这可能是二碱基中 CG 含量较少、TG (AC 类型)含量较多的原因。然而 Stallings (1992)的研究则表明,无论是否有 CpG 甲基化过程,基因组中的 CG 重复类别都是偏小的,他提出 CpG 结构是一种有害结构。

### 3.3 斑点叉尾鲷各碱基类型拷贝数特征分析

斑点叉尾鲷 6 种重复类型中,除二碱基在 10~11

拷贝数处有微小变动之外,基本上呈现随重复次数递增、微卫星数量逐渐递减的规律。这个规律与绝大部分物种的全基因组微卫星分布特征相符。Ellegren (2000)认为,在基因座上,微卫星序列的长度会维持在一定的范围内,因为长等位基因倾向于变短,从而抑制了微卫星长度的无限增长。另外,该现象可能和微卫星的突变率增大有关。有研究表明,同种类型的微卫星中拷贝次数多的要比次数少的具有更高的突变率,往往重复序列越长,突变的概率越大(Leopoldino *et al*, 2003)。因此,微卫星长度越长,其稳定性就越低,越容易发生碱基突变而成为不完整型微卫星或者非微卫星序列,使得重复数越多的完整型微卫星数量越少。长序列表现出更高的多态性,在进行遗传多样性研究时,可适当选择长度较大的微卫星位点作为遗传标记(王月月等, 2015)。

综上所述,本研究使用软件 MISA 对斑点叉尾鲷全基因组中完整型微卫星进行了搜索并分析,得出斑点叉尾鲷全基因组微卫星的分布特征如下:斑点叉尾鲷的染色体长度越长,所含微卫星的数量越多;各染色体上微卫星数量大致符合单碱基>二碱基>三碱基>四碱基>五碱基>六碱基的整体分布规律。各类型微卫星均表现出明显的 A/T 碱基优势。微卫星序列的拷贝数越大,其数量就越少。本研究为斑点叉尾鲷微卫星标记的开发、遗传多样性分析和分子标记育种等提供了数据支持。

## 参 考 文 献

- BACHTROG D, AGIS M, IMHOF M, *et al*. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs: Evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(9): 1277-1285
- BAI C C, LIU S F, ZHANG Z M. Characteristic analysis of microsatellite DNA in the genome of Gobiidae. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 9-15 [白翠翠, 柳淑芳, 庄志猛. 虾虎鱼科(Gobiidae)基因组微卫星 DNA 的分布特征. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 9-15]
- ELLEGREN H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*, 2000, 24(4): 400-402
- GAO H, KONG J. Distribution characteristics and biological function of tandem repeat sequences in the genomes of different organisms. *Zoological Research*, 2005, 26(5): 555-564 [高焕, 孔杰. 串联重复序列的物种差异及其生物功能. *动物学研究*, 2005, 26(5): 555-564]
- HANCOCK J M. Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*, 1996, 18(5): 421-425
- HE C B, CHEN S J, GAO X G, *et al*. Genetic diversity analysis

- of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) germplasms using EST-SSR markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(5): 815–823 [赫崇波, 陈姝君, 高祥刚, 等. EST-SSR 标记对我国斑点叉尾鲷种质资源的研究. *农业生物技术学报*, 2008, 16(5): 815–823]
- HUANG J, DU L M, LI Y Z, *et al.* Distribution regularities of microsatellites in the *Gallus gallus* genome. *Sichuan Journal of Zoology*, 2012, 31(3): 358–363 [黄杰, 杜联明, 李玉芝, 等. 红原鸡全基因组中微卫星分布规律研究. *四川动物*, 2012, 31(3): 358–363]
- HUANG J, ZHOU Y, LIU Y Z, *et al.* Characteristics of microsatellites in *Arborophila rufipectus* genome sequences using 454 GS FLX. *Sichuan Journal of Zoology*, 2015, 34(1): 8–14 [黄杰, 周瑜, 刘与之, 等. 基于 454 GS FLX 高通量测序的四川山鹧鸪基因组微卫星特征分析. *四川动物*, 2015, 34(1): 8–14]
- KATTI M V, RANJEKAR P K, GUPTA V S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, 18(7): 1161–1167
- KOVTUN I V, GOELLNER G, MCMURRAY C T. Structural features of trinucleotide repeats associated with DNA expansion. *Biochemistry and Cell Biology*, 2001, 79(3): 325–336
- LEOPOLDINO A M, PENSA S D. The mutational spectrum of human autosomal tetranucleotide microsatellites. *Human Mutation*, 2003, 21(1): 71–79
- LI W J, LI Y Z, DU L M, *et al.* Comparative analysis of microsatellite sequences distribution in the genome of giant panda and polar bear. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33(6): 874–878 [李午佼, 李玉芝, 杜联明, 等. 大熊猫和北极熊基因组微卫星分布特征比较分析. *四川动物*, 2014, 33(6): 874–878]
- LIU Z J, LI P, ARGUE B J, *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) × blue catfish (*I. furcatus*) and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross hybrids. *Animal Genetics*, 1998, 29: 58–62
- LIU Z J, LI P, ARGUE B, *et al.* Random amplified polymorphic DNA markers: Usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 1999, 174(1): 59–68
- LU T, WANG C, DU C, *et al.* Distribution regularity of microsatellites in *Moschus berezovskii* genome. *Sichuan Journal of Zoology*, 2017, 36(4): 420–424 [卢婷, 王晨, 杜超, 等. 林麝全基因组微卫星分布规律研究. *四川动物*, 2017, 36(4): 420–424]
- MICKETT K, MORTON C, FENG J, *et al.* Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, 2003, 228(1/2/3/4): 91–105
- MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 2001, 30: 194–200
- NARASIMHAMOORTHY B, SAHA M C, SWALLER T, *et al.* Genetic diversity in switch grass collections assessed by EST-SSR markers. *Bioenergy Research*, 2008, 1(2): 136–146
- NI S S, YANG Y, LIU S F, *et al.* Microsatellite analysis of *Patinopecten yessoensis* using next-generation sequencing method. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 107–113 [倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 等. 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 107–113]
- NIE H, CAO S S, ZHAO M L, *et al.* Comparative analysis of microsatellite distributions in genomes of *Boa constrictor* and *Protobothrops mucrosquamatus*. *Sichuan Journal of Zoology*, 2017, 36(6): 639–648 [聂虎, 曹莎莎, 赵明朗, 等. 红尾蚺和原矛头蝮基因组微卫星分布特征比较分析. *四川动物*, 2017, 36(6): 639–648]
- PEARSON C E, SINDEN R R. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry*, 1996, 35(15): 5041–5053
- QI W H, JIANG X M, XIAO G S, *et al.* Distribution regularities of microsatellites in the pig genome. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014, 46(8): 9–13 [戚文华, 蒋雪梅, 肖国生, 等. 猪全基因组中微卫星分布规律. *畜牧与兽医*, 2014, 46(8): 9–13]
- QI W H, JIANG X M, XIAO G S, *et al.* Seeking and bioinformatics analysis of microsatellite sequence in the genomes of cow and sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(11): 1724–1733 [戚文华, 蒋雪梅, 肖国生, 等. 牛和绵羊全基因组微卫星序列的搜索及其生物信息学分析. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(11): 1724–1733]
- QI W H, YAN C C, XIAO G S, *et al.* Distribution regularities and bioinformatics analysis of microsatellite in the whole genomes of goat and Tibetan antelope. *Journal of Sichuan University (Natural Science)*, 2016, 53(4): 937–944 [戚文华, 严超超, 肖国生, 等. 山羊和藏羚羊全基因组微卫星分布规律及其生物信息学分析. *四川大学学报(自然科学版)*, 2016, 53(4): 937–944]
- SCHLÖTTERER C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences. *Current Biology*, 1998, 8(4): 132–134
- SCHORDERET D F, GARTER S M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1992, 89(3): 957–961
- SHEN X, YANG G, LIU Y, *et al.* Construction of genetic linkage maps of guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 2007, 271(1):



- 178–187
- SIMMONS M, MICKETT K, KUCUKTAS H, *et al.* Comparison of domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no evidence for genetic impact. *Aquaculture*, 2006, 252(2/3/4): 133–146
- STALLINGS R L. CpG suppression in vertebrate genomes does not account for the rarity of (CpG)<sub>n</sub> microsatellite repeats. *Genomics*, 1992, 13(3): 890–891
- SUBRAMANIAN S, MISHRA R K, SINGH L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: Their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biology*, 2003, 4(2): 1–10
- TONG X L, DAI F Y, LI B, *et al.* Microsatellite repeats in mouse: Abundance, distribution and density. *Current Zoology*, 2006, 52(1): 138–152 [童晓玲, 代方银, 李斌, 等. 小鼠基因组中的微卫星重复序列的数量、分布和密度. *动物学报*, 2006, 52(1): 138–152]
- TU F Y, LIU J, HAN W J, *et al.* Analysis of microsatellite distribution characteristics in the entire genome of *Macaca fascicularis*. *Chinese Journal of Wildlife*, 2018, 39(2): 400–404 [涂飞云, 刘俊, 韩卫杰, 等. 食蟹猴全基因组微卫星分布特征分析. *野生动物学报*, 2018, 39(2): 400–404]
- TU F Y, LIU X H, DU L M, *et al.* Distribution characteristics of microsatellites in the rat genome. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2015, 37(4): 708–711 [涂飞云, 刘晓华, 杜联明, 等. 大鼠全基因组微卫星分布特征研究. *江西农业大学学报*, 2015, 37(4): 708–711]
- WANG C, DU L M, LI P, *et al.* Distribution patterns of microsatellites in the genome of the German cockroach (*Blattella germanica*). *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58(10): 1037–1045 [王晨, 杜联明, 李鹏, 等. 德国小蠊全基因组中微卫星分布规律. *昆虫学报*, 2015, 58(10): 1037–1045]
- WANG Y Y, LIU X X, DONG K Z, *et al.* Distribution difference of microsatellite in 7 domestic animals genomes. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 42(9): 2418–2426 [王月月, 刘雪雪, 董坤哲, 等. 7种家养动物全基因组微卫星分布的差异研究. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(9): 2418–2426]
- XIA J, LIU F, ZHU Z, *et al.* A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 135–151
- XIANG J G, ZHOU J, JIN H. A study on the biological and biochemical characteristics of the *Ictalurus punctatus*. *Hunan Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science)*, 2004, 30(4): 355–358 [向建国, 周进, 金宏. 斑点叉尾鲷的生物学与生理生化特性研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 30(4): 355–358]
- XU J J, ZHENG X, LI J, *et al.* Distribution characteristics of whole genome microsatellite of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5488–5498 [徐杰杰, 郑翔, 李杰, 等. 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 全基因组微卫星分布特征分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5488–5498]
- XU J J, ZHENG X, ZHANG X Y, *et al.* Analysis of distribution characteristics of microsatellites in the four genomes of puffer fish. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(4): 1441–1451 [徐杰杰, 郑翔, 张鑫宇, 等. 4种河鲀全基因组微卫星分布特征分析研究. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(4): 1441–1451]
- ZHANG L L, WEI Z M, LIAN Z M, *et al.* Abundance of microsatellites in the entire genome and EST of *Tribolium castaneum*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45(1): 38–42 [张琳琳, 魏朝明, 廉振民, 等. 赤拟谷盗全基因组和 EST 中微卫星的丰度. *昆虫知识*, 2008, 45(1): 38–42]
- ZHANG T, GAN J, CHEN J W, *et al.* Morphological characteristics and electrophoretic analysis of two kinds of isozymes from *Ictalurus punctatus*. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2019, 9(6): 57–64 [张涛, 甘金, 陈建武, 等. 斑点叉尾鲷形态观察及其两种同工酶的电泳分析. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(6): 57–64]
- ZHENG Y, JIN G L, WU W R. Relationship between sequence completeness and polymorphism of microsatellites. *Genomics and Applied Biology*, 2012, 31(6): 587–591 [郑燕, 金谷雷, 吴为人. 微卫星序列完整性与多态性的关系. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(6): 587–591]

(编辑 冯小花)

## Analysis of Microsatellite Distribution Characteristics in the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Genome

TANG Rongye, SU Mengyuan, YANG Wenshan, XU Jiejie, WANG Tao<sup>①</sup>, YIN Shaowu<sup>①</sup>

(College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University Nanjing, Jiangsu Province Engineering Research Center for Aquatic Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

**Abstract** To understand the distribution of perfect microsatellites in the genome of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*), we used MISA, a bioinformatics software package, to search and analyze the microsatellites. A total of 510 256 perfect microsatellites were isolated from 29 chromosomes of *I. punctatus*, with a total length of 11 036 941 bp. The chromosome containing the largest number of microsatellites was chromosome 2 (25 284), followed by chromosomes 3, 1, and 5. Chromosome 29 had the lowest number of microsatellites (11 591). The length of each chromosome was significantly correlated with the number of microsatellites it contained (SPSS,  $r = 0.98$ ,  $P < 0.01$ ). The highest relative abundance of microsatellites was found on chromosome 27 (785.03 ind./Mb), and the lowest was on chromosome 11 (615.89 ind./Mb). Among the six repeat types, mononucleotides were the most frequent, accounting for 45.31% of the total, followed by dinucleotides (38.53%), trinucleotides (8.73%), tetranucleotides (6.93%), pentanucleotides (0.46%), and hexanucleotides (0.04%). The predominantly repeated microsatellite sequences in the *I. punctatus* genome were A, AC, AG, AT, AAT, AAAT, C, AAC, AAAC, and AAG, showing an obvious inclination towards A and T bases. The results of this study provide a reference for the further study of *I. punctatus* genome characteristics and contribute basic data for future investigations into molecular marker-assisted breeding and genetic information assessment of *I. punctatus*.

**Key words** *Ictalurus punctatus*; Whole genome; Microsatellites; Distribution characteristics

<sup>①</sup> Corresponding author: WANG Tao, E-mail: seawater88@126.com; YIN Shaowu, E-mail: yinshaowu@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201218002

http://www.yykxjz.cn/

吴碧银, 许建, 曹顶臣, 徐鹏, 张瀚元, 朱优秀, 江炎亮, 赵紫霞. 鲤低氧适应性状的全基因组关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 98–106

WU B Y, XU J, CAO D C, XU P, ZHANG H Y, ZHU Y X, JIANG Y L, ZHAO Z X. Genome-wide association analysis of hypoxia adaptation traits in common carp (*Cyprinus carpio*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 98–106

## 鲤低氧适应性状的全基因组关联分析\*



吴碧银<sup>1,2#</sup> 许建<sup>2#</sup> 曹顶臣<sup>3</sup> 徐鹏<sup>4</sup> 张瀚元<sup>2</sup>  
朱优秀<sup>1,2</sup> 江炎亮<sup>2</sup> 赵紫霞<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 农业农村部水生动物基因组学重点实验室 北京 100141; 3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 4. 厦门大学海洋与地球学院 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心 福建 厦门 361102)

**摘要** 低氧适应是水产养殖物种的重要性状, 筛选用于改良低氧适应性状的分子标记及候选基因有助于鱼类耐低氧品种选育。在数量性状和质量性状的遗传研究中, 全基因组关联分析(GWAS)广泛应用于性状相关标记和基因的发掘。本研究对鲤(*Cyprinus carpio*)养殖群体开展了低氧胁迫实验, 选取了低氧敏感和低氧耐受的极端性状个体作为研究对象, 应用鲤鱼 250K 高通量分型芯片进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点分型, 经过数据质控后获得 90 个样本的 87 222 个多态性位点的分型结果。通过 GWAS, 筛选到 4 个低氧适应性状关联的位点: carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890, 在关联位点附近注释到 *traf4* 等 23 个可能与低氧适应性状关联的候选基因; 此外, 还筛选到 7 个潜在关联的 SNP 位点。本研究初步获得了鲤低氧适应性状相关联的基因组区间, 为后续效应基因精细定位奠定了基础。

**关键词** 鲤; 低氧适应; 单核苷酸多态性分型芯片; 全基因组关联分析

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0098-09

鲤(*Cyprinus carpio*)是驯化历史较为悠久的物种, 出土的新石器时代早期鱼骨比较分析显示, 我国鲤鱼养殖历史可追溯到距今 8000 年以前(Nakajima *et al.*, 2019)。如今, 鲤已成为世界性的养殖品种, 养殖地域遍布欧亚大陆, 年产量达 418.95 万 t (FAO, 2020), 为保障人类粮食安全和营养安全发挥了重要作用。在水生环境中, 氧饱和浓度仅为同体积空气中的 1/30, 且扩散速度缓慢, 空间分布不均匀, 为适应聚集性养殖条件下的氧供应不足, 低氧成为鱼类驯化

过程中的高强度选择压力之一, 如何从遗传角度解析鲤低氧适应驯化的机制, 对于基础研究和育种应用都有重要的意义。

近年来, 研究者对多种鱼类开展了低氧适应性状相关研究, 从表观遗传、基因表达差异等角度揭示了鱼类在低氧胁迫下的不同应答模式, 以及低氧对鱼类生长、发育、繁殖、免疫等生理过程的影响(肖武汉, 2014; Abdel-Tawwab *et al.*, 2019)。多种不同成因和程度的低氧均可导致摄食下降、生长停滞和疾病易感

\* 国家重点研发计划(2018YFD0900102)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD24; 2015C007)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program (2018YFD0900102), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD24; 2015C007)].

#共同第一作者: 吴碧银, E-mail: wuby1619@126.com; 许建, E-mail: xuj@cafs.ac.cn

① 通讯作者: 赵紫霞, 副研究员, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

收稿日期: 2020-12-18, 收修改稿日期: 2021-01-25

(Fitzgibbon *et al.*, 2007; Portner, 2010; Abdel-Tawwab *et al.*, 2014; Araújo-Luna *et al.*, 2018)。以海洋青鳉 (*Oryzias melastigma*) 为对象的研究显示, 低氧通过甲基化调控造成跨世代的生殖损伤, 即使子代及其生殖细胞从未暴露于低氧环境下, 也会因亲代的低氧暴露史而出现性腺发育迟缓(Wang *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2019)。在低氧胁迫下, 鱼类鳃丝原有的规则形态发生改变, 板层排列紊乱和扭曲, 细胞异常增生和坏死并存, 同时, 伴随着渗透压调节的紊乱, 离子平衡和酸碱平衡均被打破, 进而导致一系列血液生化指标的波动(Cadiz *et al.*, 2017; Araújo-Luna *et al.*, 2018; Abdel-Tawwab *et al.*, 2019)。大量转录组研究(Zhang *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2020; Qi *et al.*, 2020)表明, 低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, *hif*)通路是最主要的低氧应答信号通路, 典型的差异表达基因还包括促红细胞生成素(erythropoietin, *epo*), 血红素加氧酶(heme oxygenase, *ho*)属于负责氧分子转运的珠蛋白家族, 参与糖酵解/糖异生、乳酸代谢、丙酮酸代谢、三羧酸循环以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除等。

为将低氧适应的研究结果应用于分子辅助育种, 需要在全基因组层面筛选性状差异群体的特异性分子标记和基因。全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)是近年来对性状的遗传机制进行解析的重要方法, 其基本原理是利用逻辑或线性回归方法, 筛选出与目标性状关联的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP), 并对这些遗传变异和目标性状的关系进行验证及相关功能研究。近年来, 已有许多水生生物的 GWAS 研究报道, 刘占江团队应用斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 250K SNP 芯片开展抗病(Geng *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017)和耐低氧(Zhong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)性状的 GWAS 分析。鲤 250K SNP 芯片被应用于头长(Chen *et al.*, 2018)、脂肪酸含量(Zheng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019)性状的 GWAS 分析。Zhou 等(2019)采用基因组重测序数据对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)抗病性状进行 GWAS 分析, 并结合基因表达和甲基化分析, 筛选出疾病抗性相关候选基因。基于简化基因组测序技术, 高进等(2021)对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体重和体尺性状开展了联合 GWAS 分析。崔爱君等(2020)对黄条鲷(*Seriola lalandi*)体重和全长等生长性状进行了 GWAS 分析, 为鱼类种质资源可持续利用和良种培育提供了参考。

本研究聚焦于解析鲤低氧适应性性状驯化的遗传机制, 应用鲤 250K 高通量 SNP 芯片(Xu J *et al.*, 2014;

Xu P *et al.*, 2014), 对鲤养殖群体低氧适应性性状开展 GWAS 分析, 定位性状关联位点及其效应基因, 旨在为培育鱼类耐低氧品种提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用 鱼

松荷鲤(*C. carpio Songhe*)实验群体来源于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验场。实验个体同批孵化、同池饲养至 3 月龄[平均体重( $107\pm 20$ ) g, 平均体长( $16.5\pm 2.3$ ) cm], 移入室内暂养缸中, 25℃暂养 7 d 使之适应环境。暂养期间, 气泵充氧, 控制溶解氧浓度 $>6.0$  mg/L, 每天早、中、晚各投饵 1 次。

### 1.2 低氧胁迫实验

暂养结束后, 选取体质健康、体重相近、无外伤、无感染、能够正常游泳和摄食的个体用于低氧胁迫实验。实验鱼分 5 组, 分别置于 500 L 的塑料缸中, 每组 260 尾个体。实验开始前使用气泵充氧, 控制溶解氧浓度 $>6.0$  mg/L, 禁食 24 h 后停止充氧, 使溶解氧浓度持续自然下降。使用 ORION STAR A223 型溶解氧测量仪(Thermo Scientific, 美国), 每隔 15 min 记录溶解氧浓度值, 实验开始 3 h 后, 溶解氧浓度降至 0.43 mg/L, 个体陆续缺氧昏迷, 按昏迷顺序对实验个体进行编号, 移出实验缸。实验开始 5 h 后, 溶解氧浓度稳定在 0.27 mg/L, 将剩余个体移入 50 L 封闭玻璃缸, 通过调节水量控制溶解氧浓度继续缓慢下降。实验开始 10 h 后, 实验鱼全部昏迷, 溶解氧浓度降至 0.12 mg/L。

### 1.3 样本采集与处理

实验鱼按缺氧昏迷顺序编号, 记录个体信息并采集静脉血样本, 剔除出现外伤或感染的个体, 共采集到 1243 尾有效个体样本。使用动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP324-03, 中国), 提取 100 尾极端性状个体的血液 DNA。其中, 每组最早昏迷的 10 尾个体归为低氧敏感组, 5 组共计 50 尾; 最晚昏迷的 10 尾个体归为低氧耐受组, 5 组共计 50 尾。

### 1.4 基因分型和数据质控

挑选电泳条带清晰无拖尾、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.0 之间、浓度大于 100 ng/ $\mu\text{L}$  的高质量 DNA 样本用于 SNP 分型, 满足要求的样本共 91 个, 包括低氧敏感样本 43 个, 低氧耐受样本 48 个。使用鲤 250K 高通量 SNP 芯片(赛默飞世尔 Axiom™ carp genotyping array, 美国)进行分型检测, 分型实验由纽

勤生物科技(上海)有限公司完成,使用 Affymetrix Power Tools 和 SNPolisher 软件读取分型数据。分型数据质控标准设置为探针质量 $\geq 0.85$ , SNP 分型成功率 $\geq 95\%$ , 样本分型成功率 $\geq 90\%$ , 最小等位基因频率 $\geq 5\%$ 。

### 1.5 全基因组关联分析

使用 PLINK 软件进行鲤低氧适应性状 GWAS 分析,使用“--logistic”和“--adjust”参数,显著性关联位点标准为 FDR 校正后的  $P < 0.05$ , 提示性关联位点标准为  $0.05 \leq \text{FDR}$  校正后  $P < 0.1$ 。对相关 SNP 位点的 50 kb 侧翼区域进行基因注释。使用 R 语言的 CMplot 软件包绘制曼哈顿图和 Q-Q 图。

## 2 结果

### 2.1 SNP 分型

应用鲤鱼 250K 高通量分型芯片进行 SNP 分型,分型及质控结果见表 1。基因分型结果显示,91 个样本中共获得 199 577 个 SNPs 原始分型数据,通过质控的样本共 90 个,包括低氧耐受样本 48 个,低氧敏感样本 42 个。质控后得到 90 个样本的 87 222 个 SNPs 位点的分型数据进行后续 GWAS 分析。

表 1 基因分型和数据质控结果  
Tab.1 Genotyping and data quality control

项目 Items	质控前 Before quality control	质控后 After quality control
低氧耐受样本 Hypoxia-tolerant samples	48	48
低氧敏感样本 Hypoxia-sensitive samples	43	42
SNPs 位点 SNPs loci	199 577	87 222

### 2.2 全基因组关联分析

考虑到群体分层因素对 GWAS 的影响,首先对低氧敏感和耐受样本进行主成分分析(图 1),可以看出,实验样本中不存在显著的群体分层,群体分层对本研究的影响很小,并在后续关联分析中引入了主成分分析结果进行校正。通过 PLINK 进行 GWAS 分析,关联分析结果见表 2 和表 3,包括 4 个关联位点(carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890)和 7 个提示性关联位点(carp000442、carp088568、carp195897、carp188137、carp110811、carp001038

和 carp051623)。使用 R 语言的 CMplot 软件包生成鲤低氧适应性状 GWAS 分析的 Q-Q 图和曼哈顿图(图 2 和图 3),比较 Q-Q 图观测值和期望值的一致性,散点分布与趋势线吻合度较高,可以推测关联分析结果较可靠。从图 3 可以看出,4 个显著性关联位点与 7 个提示性关联位点成簇分布,大部分位于 41 号染色体上,表明该基因组区域可能存在与低氧适应性状密切关联的基因。

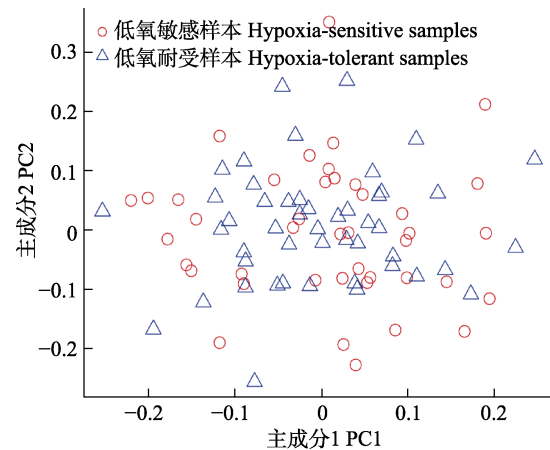


图 1 鲤实验群体主成分分析

Fig.1 Principal component analysis of experimental population of common carp

### 2.3 低氧适应性状关联基因注释

为了定位低氧适应性状相关的基因,针对筛选的 4 个显著关联的 SNP 位点 carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890,在每个 SNP 位点的 50 kb 上下游区域进行基因注释,筛选出 23 个候选基因(*prdx5*、*tsc1*、*nxfl*、*vtn*、*gtf3c4*、*barhl1*、*cpd*、*cryba1*、*unc119*、*slc13a2*、*aldh3a2*、*traf4*、*kcnk4*、*hcea*、*esrrg*、*bscl2*、*gng3*、*banf1*、*slc3a2*、*calm1*、*pyc*、*tapbp* 和 *la36*)。

## 3 讨论

本研究应用鲤 250K 高通量 SNP 芯片对鲤养殖群体低氧适应性状开展 GWAS 分析,筛查低氧适应性状的显著性关联 SNP 位点,定位低氧适应性状的关联基因。该芯片是本课题组于 2014 年开发完成的,是鲤的第一个高通量基因分型平台。经过鲤的多个品系的评估,25 万个 SNP 位点中有近 3/4 (199 577 个)被证明在鲤中是多态性的。此外,鲤 SNP 芯片还在近缘物种中进行了验证,获得了 2 万~5 万个多态性位点。该 SNP 芯片对鲤及其近缘物种的性状解析和多态性评估等研究具有重要价值(Xu J *et al*, 2014)。



表 2 低氧性状关联位点与基因  
Tab.2 Associated SNPs and genes for hypoxia adaptation

SNP	P 值 P-value	染色体 Chromosome	位置 Location	等位基因 1 Allele 1	等位基因 2 Allele 2	基因 ID Gene ID	起始位置 Start	结束位置 End	基因名称 Gene Name	基因缩写 Gene Symbol
carp229220	$1.95 \times 10^{-8}$	LG41	7915847	A	G	HHLG41g0287	7860648	7872600	Hamartin	<i>tsc1</i>
						HHLG41g0288	7912434	7918480	General transcription factor 3C polypeptide 4	<i>gff3c4</i>
						HHLG41g0290	7945752	7949342	BarH-like 1 homeobox protein	<i>barhl1</i>
carp195901	$2.26 \times 10^{-7}$	LG41	17933797	T	C	HHLG41g0685	17875830	17884815	Carboxypeptidase D	<i>cpd</i>
						HHLG41g0686	17885916	17888266	Beta-crystallin A3	<i>cryba1</i>
						HHLG41g0687	17890980	17912330	Protein unc-119 homolog A	<i>unc119</i>
						HHLG41g0688	17915005	17922373	Solute carrier family 13 member 2	<i>slc13a2</i>
						HHLG41g0689	17927332	17938557	Vitronectin	<i>vtn</i>
						HHLG41g0690	17945892	17950523	Fatty aldehyde dehydrogenase	<i>aldh3a2</i>
carp001519	$7.67 \times 10^{-7}$	LG41	12631805	T	C	HHLG41g0691	17953946	17963151	TNF receptor-associated factor 4	<i>traf4</i>
						HHLG41g0490	12586361	12592441	Potassium channel subfamily K member 4	<i>kanak4</i>
						HHLG41g0491	12594057	12596710	High choriolytic enzyme 1	<i>hcea</i>
						HHLG41g0492	12605138	12615582	Estrogen-related receptor gamma	<i>esrrg</i>
						HHLG41g0493	12620783	12623805	Peroxiredoxin-5	<i>prdx5</i>
						HHLG41g0494	12624695	12637453	Nuclear RNA export factor 1	<i>nxp1</i>
						HHLG41g0495	12638608	12646851	Seipin	<i>bssl2</i>
						HHLG41g0496	12650917	12651845	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	<i>gng3</i>
						HHLG41g0497	12653566	12653926	Barrier-to-autointegration factor	<i>banf1</i>
						HHLG41g0498	12658801	12661808	4F2 cell-surface antigen heavy chain	<i>slc3a2</i>
						HHLG41g0499	12663470	12665151	Calmodulin	<i>calm1</i>
						HHLG41g0500	12672232	12780186	Pyruvate carboxylase	<i>pyc</i>
carp063890	$1.77 \times 10^{-6}$	scaffold1133	18816	T	C	HHUNg0128	18011	20303	Tapasin	<i>tapbp</i>
						HHUNg0129	29178	38440	HLA class I histocompatibility antigen	<i>la36</i>

表3 低氧性状提示性关联位点与基因

SNP	P-value	染色体	位置	等位基因1	等位基因2	基因ID	起始位置	结束位置	基因名称	基因缩写
		hromosome	Location	Allele 1	Allele 2	Gene ID	Start	End	Gene Name	Gene Symbol
carp000442	$3.65 \times 10^{-6}$	LG41	18972216	T	C	HHLG41g0714	18963646	18991306	Clathrin interactor 1	<i>clint1</i>
						HHLG41g0715	18995257	18998033	Transcription factor SOX-30	<i>sox30</i>
						HHLG41g0716	19001830	19023074	Transcription elongation regulator 1-like protein	<i>tcerg11</i>
carp088568	$3.75 \times 10^{-6}$	LG5	4248461	T	C	HHLG5g0116	4186392	4205144	Voltage-dependent calcium channel gamma-4 subunit	<i>cacng4</i>
						HHLG5g0117	4210275	4212553	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	<i>aimp2</i>
						HHLG5g0118	4228241	4229723	Parvalbumin	<i>prvu</i>
						HHLG5g0119	4233776	4234412	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0120	4236748	4239027	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0121	4241556	4244905	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0122	4247978	4275395	Serine/threonine-protein kinase LMTK2	<i>lmtk2</i>
						HHLG5g0123	4278059	4301670	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	<i>tecp1</i>
carp195897	$6.17 \times 10^{-6}$	LG41	17927247	G	A	HHLG41g0685	17875830	17884815	Carboxypeptidase D	<i>cpd</i>
						HHLG41g0686	17885916	17888266	Beta-crystallin A3	<i>cryba1</i>
						HHLG41g0687	17890980	17912330	Protein unc-119 homolog A	<i>unc119</i>
						HHLG41g0688	17915005	17922373	Solute carrier family 13 member 2	<i>slc13a2</i>
						HHLG41g0689	17927332	17938557	Vitronectin	<i>vtu</i>
						HHLG41g0690	17945892	17950523	Fatty aldehyde dehydrogenase	<i>aldh3a2</i>
						HHLG41g0691	17953946	17963151	TNF receptor-associated factor 4	<i>traf4</i>
carp188137	$8.60 \times 10^{-6}$	LG41	19624104	T	C	HHLG41g0732	19577486	19593597	RNA-binding protein 27	<i>rbm27</i>
						HHLG41g0733	19594591	19620960	Leucine--tRNA ligase	<i>sylc</i>
						HHLG41g0734	19623709	19628553	PLA8-like protein 1	<i>plac8l1</i>
						HHLG41g0735	19647903	19653880	Glutaredoxin domain-containing cysteine-rich protein 2	<i>grxcr2</i>
carp110811	$9.41 \times 10^{-6}$	LG41	9710319	A	G	HHLG41g0356	9650026	9720162	Ankyrin-1	<i>ank1</i>
						HHLG41g0357	9729836	9733173	Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase	<i>fts1</i>
						HHLG41g0358	9734679	9758775	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	<i>riCTOR</i>
carp001038	$9.87 \times 10^{-6}$	LG41	14441570	A	G	HHLG41g0575	14394024	14490911	Collagen alpha-1(XXIII) chain	<i>col23a1</i>
carp051623	$9.94 \times 10^{-6}$	LG41	20892648	G	A	HHLG41g0763	20844695	20848673	5-hydroxytryptamine receptor 2A	<i>htr2a</i>
						HHLG41g0764	20857611	20869927	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3	<i>wasf3</i>
						HHLG41g0765	20879201	20889480	G-protein coupled receptor 12	<i>gpr12</i>
						HHLG41g0766	20889822	20892857	NHS-like protein 2	<i>nhs12</i>
						HHLG41g0767	20897560	20902481	Insulin receptor substrate 2-A	<i>irs2-a</i>
						HHLG41g0768	20906412	20914371	Cysteine protease ATG4A	<i>atg4a</i>
						HHLG41g0769	20915184	20917402	Ankyrin repeat domain-containing protein 46	<i>ankrd46</i>
						HHLG41g0770	20918768	20927537	Transmembrane protein 185-like	<i>t185l</i>
						HHLG41g0771	20931575	20950880	Serine/threonine-protein kinase 26	<i>stk26</i>

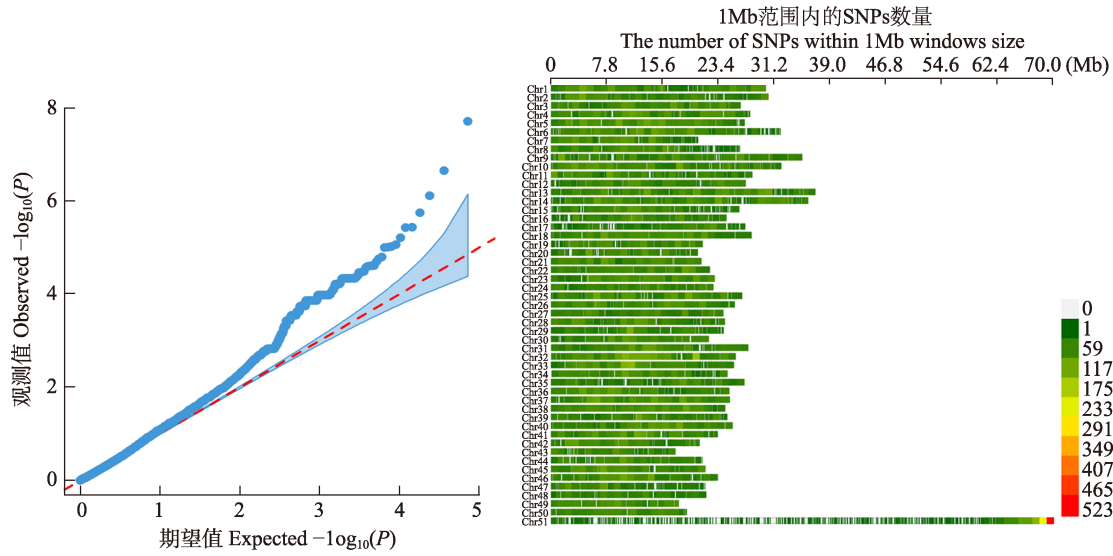


图 2 鲤低氧适应性状 GWAS 关联分析的 Q-Q 图和密度图

Fig.2 Q-Q plot and SNP-density plot of genome-wide association of hypoxia adaptation trait of common carp

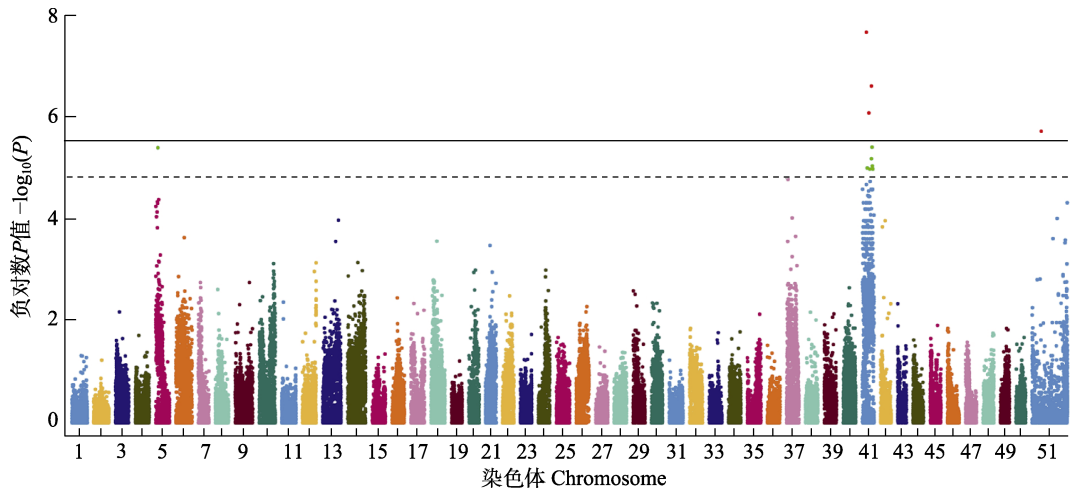


图 3 鲤低氧适应性状 GWAS 关联分析的曼哈顿图

Fig.3 Manhattan plot of the genome-wide association analysis for hypoxia adaptation trait of common carp

在 GWAS 分析中，如果样本中存在不同的群体分层结构，会对关联分析的结果产生显著影响，造成基因组膨胀系数(genomic inflation factor, GIF)的增加和假阳性的出现。主成分分析可以通过对群体的基因分型结果降维，提取主要的几个主成分，并直观地观察到群体内部的分层现象。本研究中主成分分析结果显示，群体分层对关联分析结果影响很小。使用 PLINK 软件进行 GWAS 分析时，由于本研究的低氧适应性状为二项式性状(敏感和耐受)，所以，采用逻辑(logistic)回归分析，并将主成分分析的结果(前 5 个主成分)作为辅因子，进行结果的校正。对于 GWAS 分析后原始  $P$  值的分布，通过绘制 Q-Q 图分析  $P$  值的观测值和期望值的一致性，如果偏离趋势线太多，则提示可能有群体分层等因素影响分析的准确性，本

研究的 Q-Q 图提示研究的可靠性较高，SNP 密度图也显示分析用的 8 万多个位点较均匀地分布在 50 个染色体上。

在自然群体数量性状 GWAS 的研究报道中，通常会筛选到几十个到数百个关联位点，而本研究只定位到 4 个 SNP 位点，这与所采用的实验群体有关。实验用鱼为松荷鲤养殖群体，这一品种是利用多元杂交选育技术培育的鲤鱼品种，选育亲本来源包括镜鲤(*C. carpio var. specularis*)、荷包红鲤(*C. carpio Red var vuyuanensis*)和黑龙江野鲤(*C. carpio haematopterus Tem.etSchl*)，主要选育目标为抗寒和生长(石连玉等, 2012)。由于其亲本品种间存在低氧适应性状的明显差异，特别是历经长期高强度驯化的镜鲤为低氧耐受品种，而荷包红鲤为地方原种，低氧耐受能力相对较

弱(赵紫霞等, 2014), 在新品种松荷鲤个体间存在低氧适应性状的显著差异, 其遗传基础为来源于镜鲤基因组的少量低氧适应驯化位点。

在已发表的有限几项养殖鱼类低氧 GWAS 研究结果中, 也呈现出类似的特点, 即显著性关联位点较少, 可能起源于家养驯化选择。Wang 等(2017)利用斑点叉尾鲷 250K SNP 芯片对来自 6 个品系的斑点叉尾鲷群体进行全基因组关联研究, 鉴定出 1 个品系间显著 QTL, 在品系内鉴定到 6 个显著的 QTL。6 个品系的 QTL 之间重叠很少, 证实了斑点叉尾鲷低氧适应遗传机制的复杂性, 这些 QTL 中的许多基因具有调节氧代谢和参与低氧应答的功能(Zhong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)。Li 等(2017)应用双酶切限制性位点测序技术, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中鉴定出低氧适应性状的 4 个显著 QTL, 并得到 2 个基因表达结果的验证。

通过全基因组关联分析筛查到的 4 个显著性关联位点中, carp229220 和 carp001519 为同义突变, carp195901 为非编码区突变, carp063890 位于一个抗原提呈相关转运蛋白 Tapasin 编码序列内, 可能并非真正的效应位点。目前, 在显著性关联位点附近注释到 23 个功能基因, 肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factors, *trafs*)编码一类具有胞内信号转导功能的蛋白, 它们介导了多种生物学功能, 包括先天性和获得性免疫应答、胚胎发育、应激反应和骨代谢(胡宸曦, 2020)。肿瘤坏死因子受体相关因子 4 (TNF receptor associated factor 4, *traf4*)是 *trafs* 家族中比较特殊的一员, 生物学功能多且复杂, 参与调控 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)等低氧相关信号通路(王沂等, 2015)。韩雪晴等(2019)通过亚细胞定位和双荧光素酶报告基因研究发现, *traf4* 在 293T 细胞中主要定位于细胞质, 可增强 NF- $\kappa$ B 活性。过氧化物氧化还原酶(peroxiredoxin, *prdx*)基因家族编码具有过氧化氢酶活性的抗氧化蛋白, 在生物体中参与多个与活性氧相关的信号通路, 参与氧活性物质清除和细胞保护(丁婷婷等, 2020)。朱珍珍(2017)利用 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼(*Danio rerio*) *prdx* 家族进行敲除, 分别获得 *prdx1*、*prdx5* 和 *prdx6* 缺陷突变体, 使用 15 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理发现, 斑马鱼 *prdx5* 缺陷的胚胎耐受胁迫能力降低。此外, 脂肪醛脱氢酶(fatty aldehyde dehydrogenase, *aldh3a2*)基因产物参与无氧代谢, 候选基因中还包含多个具体功能未知的信号转导分子(如 *esrrg*、*eng3* 和 *gpr12*)和转录调控因子

(如 *gtf3c4*、*sox30* 和 *tcerg11*), 均与低氧应答或低氧损伤修复相关, 可能贡献于低氧适应表型。此外, 除了 carp063890 位于 scaffold1133, 未能装配至特定染色体, 其余 3 个位点均定位于 41 号染色体, 表明该染色体区域存在与低氧适应性状密切关联的基因。

本研究初步筛选了低氧适应性状的关联位点, 注释了这些位点附近可能参与低氧适应调控通路的基因, 为下一步开展区域内效应基因精细定位、基因表达和功能分析等研究奠定了基础, 后续将通过低氧转录组分析、QTL 定位等手段, 筛查导致性状差异的效应基因及基因型, 开展深入功能分析, 为探索鲤低氧适应性状的分子机理和鱼类耐低氧品种选育提供借鉴。

## 参 考 文 献

- ABDEL-TAWWAB M, HAGRAS A E, ELBAGHDADY H M, *et al.* Dissolved oxygen level and stocking density effects on growth, feed utilization, physiology, and innate immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 2014, 26(4): 340–355
- ABDEL-TAWWAB M, MONIER M N, HOSEINIFAR S H, *et al.* Fish response to hypoxia stress: Growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(3): 997–1013
- ARAÚJO-LUNA R, RIBEIRO L, BERGHEIM A, *et al.* The impact of different rearing condition on gilthead seabream welfare: Dissolved oxygen levels and stocking densities. *Aquaculture Research*, 2018, 49(12): 3845–3855
- CADIZ L, ZAMBONINO-INFANTE J L, QUAZUGUEL P, *et al.* Metabolic response to hypoxia in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) displays developmental plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 215: 1–9
- CHEN L, PENG W Z, KONG S N, *et al.* Genetic mapping of head size related traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 448
- CUI A J, XU Y J, WANG B, *et al.* Genome-wide association analysis of growth traits in yellow tail kingfish (*Seriola lalandi*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 71–79 [崔爱君, 徐永江, 王滨, 等. 黄条鲷生长性状全基因组关联分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 71–79]
- DING J, LIU C, LUO S, *et al.* Transcriptome and physiology analysis identify key metabolic changes in the liver of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to acute hypoxia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 189: 109957
- DING T T, ZHANG H, FENG J H, *et al.* Advances in research on mechanism of action of PRDXs family in colorectal cancer. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(23): 2938–2942 [丁婷婷, 张红, 冯继红, 等. PRDXs 家族在结



- 直肠癌中作用机制的研究进展. 中国免疫学杂志, 2020, 36(23): 2938–2942]
- FITZGIBBON Q P, STRAWBRIDGE A, SEYMOUR R S. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mullet, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, 2007, 270(1): 358–368
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture, 2020
- GAO J, YANG R Q. Joint genome-wide association study of body mass and morphological traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 63–70 [高进, 杨润清. 大菱鲆体重和体尺性状联合 GWAS 分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 63–70]
- GENG X, SHA J, LIU S K, *et al.* A genome-wide association study in catfish reveals the presence of functional hubs of related genes within QTLs for columnaris disease resistance. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 196
- HAN X Q, GAO F Y, LU M X, *et al.* Cloning, expression and functional analysis of TRAF4 gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(3): 381–392 [韩雪晴, 高风英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 TRAF4 基因的克隆、表达及功能分析. 农业生物技术学报, 2019, 27(3): 381–392]
- HU C X. Cloning of TRAF gene family in *Hyriopsis cumingii* and their interaction with  $\beta$ -Arrestin. Master's Thesis of Nanchang University, 2020, 99 [胡宸曦. 三角帆蚌 TRAF 家族基因的克隆及与  $\beta$ -arrestin 蛋白互作. 南昌大学硕士研究生学位论文, 2020, 99]
- LAI K P, WANG S Y, LI J W, *et al.* Hypoxia causes transgenerational impairment of ovarian development and hatching success in fish. *Environmental Science and Technology*, 2019, 53(7): 3917–3928
- LI H L, GU X H, LI B J, *et al.* Genome-wide QTL analysis identified significant associations between hypoxia tolerance and mutations in the GPR132 and ABCG4 genes in Nile tilapia. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(5): 441–453
- NAKAJIMA T, HUDSON M J, UCHIYAMA J, *et al.* Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nature Ecology and Evolution*, 2019, 3(10): 1415–1418
- PORTNER H O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(6): 881–893
- QI D, CHAO Y, WU R, *et al.* Transcriptome analysis provides insights into the adaptive responses to hypoxia of a schizothoracine fish (*Gymnocypris eckloni*). *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1326
- QI M, WU Q, LIU T, *et al.* Hepatopancreas transcriptome profiling analysis reveals physiological responses to acute hypoxia and reoxygenation in juvenile qingtian paddy field carp *Cyprinus carpio var qingtianensis*. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 1110
- SHI L Y, LI F, JIA Z Y, *et al.* Study on genetic diversity and structure in songhe carp. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2012(4): 104–112 [石连玉, 李飞, 贾智英, 等. 选育品种松荷鲤遗传结构研究. 海洋湖沼通报, 2012(4): 104–112]
- WANG S Y, LAU K, LAI K P, *et al.* Hypoxia causes transgenerational impairments in reproduction of fish. *Nature Communications*, 2016, 7: 12114
- WANG X Z, LIU S K, JIANG C, *et al.* Multiple across-strain and within-strain QTLs suggest highly complex genetic architecture for hypoxia tolerance in channel catfish. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, 292(1): 63–76
- WANG Y, ZHAO J J, HAN X Y, *et al.* Structure and biological function of TRAF4. *Life Science Research*, 2015, 19(2): 169–175 [王沂, 赵俊曦, 韩晓燕, 等. TRAF4 的结构与生物学功能. 生命科学研究, 2015, 19(2): 169–175]
- XIAO W H. Hypoxia signal transduction pathway and fish adaptation to hypoxia. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2014, 44(12): 1227–1235 [肖武汉. 低氧信号传导途径与鱼类低氧适应. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1227–1235]
- XU J, ZHAO Z X, ZHANG X F, *et al.* Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics*, 2014, 15: 307
- XU P, ZHANG X F, WANG X M, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212–1219
- ZHANG G S, ZHAO C, WANG Q T, *et al.* Identification of HIF-1 signaling pathway in *Pelteobagrus vachelli* using RNA-Seq: Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, and hematology indices. *Journal of Comparative Physiology B*, 2017, 187(7): 921–943
- ZHANG H Y, XU P, JIANG Y L, *et al.* Genomic, transcriptomic, and epigenomic features differentiate genes that are relevant for muscular polyunsaturated fatty acids in the common carp. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 217
- ZHAO Z X, CAO D C, KUANG Y Y, *et al.* Analysis of common carp neuroglobin gene sequence and hypoxia expression. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 325–332 [赵紫霞, 曹顶臣, 匡友谊, 等. 鲤神经球蛋白基因序列与低氧表达分析. 水产学报, 2014, 38(3): 325–332]
- ZHENG X H, KUANG Y Y, LÜ W H, *et al.* Genome-wide association study for muscle fat content and abdominal fat traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One*, 2016, 11(12): e0169127
- ZHONG X X, WANG X Z, ZHOU T, *et al.* Genome-wide association study reveals multiple novel QTL associated with low oxygen tolerance in hybrid catfish. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(4): 379–390
- ZHOU Q, SU Z C, LI Y Z, *et al.* Genome-wide association mapping and gene expression analyses reveal genetic



mechanisms of disease resistance variations in *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1167

ZHOU T, LIU S K, GENG X, *et al.* GWAS analysis of QTL for enteric septicemia of catfish and their involved genes suggest evolutionary conservation of a molecular mechanism of disease resistance. *Molecular Genetics and Genomics*,

2017, 292(1): 231–242

ZHU Z Z. Study on zebrafish *rsph3* gene in early development and preparation of zebrafish *prdx* mutants. Master's Thesis of Shandong University, 2017, 87 [朱珍珍. 斑马鱼 *rsph3* 基因在早期发育中的研究及斑马鱼 *prdx* 突变体的制备. 山东大学硕士研究生学位论文, 2017, 87]

(编辑 冯小花)

## Genome-Wide Association Analysis of Hypoxia Adaptation Traits in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

WU Biyin<sup>1,2#</sup>, XU Jian<sup>2#</sup>, CAO Dingchen<sup>3</sup>, XU Peng<sup>4</sup>, ZHANG Hanyuan<sup>2</sup>, ZHU Youxiu<sup>1,2</sup>, JIANG Yanliang<sup>2</sup>, ZHAO Zixia<sup>2①</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070, China; 4. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen, Fujian 361102, China)

**Abstract** To reveal the genetic mechanism underlying hypoxia adaptation, it is important to identify the molecular markers and candidate genes associated with hypoxia adaptation traits. Genome-wide association studies (GWSA) are frequently used in the genetic dissection of both quantitative traits and qualitative traits, while a large number of molecular markers and samples are needed. In this study, the GWSA of the hypoxia adaptation traits of common carp (*Cyprinus carpio*) was conducted. A total of 1243 samples were collected for the hypoxia stress experiment, and individuals with extreme traits in the hypoxia experiment were selected as the preliminary screening samples. The Carp 250 K single nucleotide polymorphism (SNP) array was used for genotyping, generating genotypes of 199 577 SNPs for 91 samples. After quality control with a genotyping call rate of over 95% and a sample call rate of 90%, a total of 87 222 SNPs and 90 samples were obtained for the association analysis. A principal component analysis (PCA) showed no population stratification in the samples from both the sensitive and tolerant groups. Taking the PCA results as a covariance, a logistic regression was used for the association test with a threshold of the false discovery rate value of 0.05. Four associated SNPs for hypoxia adaptation traits (carp229220, carp195901, carp001519, and carp063890) were identified, and 23 genes were found in the neighboring regions of the four SNPs, including TNF receptor-associated factor 4 (*traf4*), fatty aldehyde dehydrogenase (*aldh3a2*), peroxiredoxin 5 (*prdx5*), estrogen-related receptor gamma (*esrrg*), guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-3 (*eng3*), G-protein coupled receptor 12 (*gpr12*), general transcription factor 3C polypeptide 4 (*gtf3c4*), transcription factor SOX-30 (*sox30*), and transcription elongation (*tcerg1l*). Additionally, seven SNPs passed the suggestive line, which could be validated in future research with larger samples. Putative genomic regions related to hypoxia adaptation for domesticated common carp were obtained in this study, which shed new light on the fine mapping and identification of causative genes and the underlying mechanisms of hypoxia adaptation.

**Key words** Common carp *Cyprinus carpio*; Hypoxia adaptation; SNP array; Genome-wide association study

① Corresponding author: ZHAO Zixia, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201215004

http://www.yykxjz.cn/

陈旭东, 邬国强, 宋红梅, 汪学杰, 牟希东, 刘奕, 刘超, 胡隐昌. 橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mitf* 的结构及表达调控特性. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 107–118

CHEN X D, WU G Q, SONG H M, WANG X J, MU X D, LIU Y, LIU C, HU Y C. Structure and expression analysis of body color-related *mitf* gene in *Amphilophus citrinellus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 107–118

# 橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mitf* 的结构及表达调控特性\*



陈旭东<sup>1,2</sup> 邬国强<sup>1,2</sup> 宋红梅<sup>2①</sup> 汪学杰<sup>2</sup> 牟希东<sup>2</sup>  
刘奕<sup>2</sup> 刘超<sup>2</sup> 胡隐昌<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部休闲渔业重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室 广东 广州 510380)

**摘要** 为了解小眼畸形相关转录因子 *mitf* 基因在鱼类早期体色褪黑过程中的调控作用,本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*) *mitf* 基因 cDNA 序列全长,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测其在橘色双冠丽鱼胚胎不同发育时期、体色褪黑不同时期和各个组织中的表达规律。获得 *mitf* 基因 2 个亚型,其中, *mitf1* 的 cDNA 全长为 1816 bp,包括 5'非编码区(UTR) 158 bp、3'UTR 428 bp、开放阅读框(ORF) 1230 bp,共编码 409 个氨基酸; *mitf2* 的 cDNA 全长为 1638 bp,包括 5'UTR 160 bp、3'UTR 428 bp 和 ORF 1050 bp,共编码 349 个氨基酸。同源性和系统进化分析显示, *mitf1* 和 *mitf2* 聚在一小支,与慈鲷科(Cichlidae)鱼类同源性最高,与哺乳类动物同源性较低。qRT-PCR 结果显示,在成鱼各个组织中, *mitf1* 和 *mitf2* 均有不同程度表达,其中,眼部表达量最高且显著高于其他组织( $P<0.05$ ),肌肉、脑和肾脏也有较高表达; *mitf1* 和 *mitf2* 在胚胎各个发育时期均有表达,在受精卵时期表达量最高,显著高于其他胚胎期;随着橘色双冠丽鱼体色由黑色过渡到橘黄色, *mitf1* 和 *mitf2* 在鱼皮肤、鳞片、尾鳍中的表达均呈逐渐下降的趋势,表明 *mitf* 基因表达与鱼体色由黑到黄转变的表型间存在关联性,推测与鱼体色发育阶段色素细胞的分化和分布比例的动态变化相关。本研究通过了解鱼类体色发育和变异的分子基础,可为鱼类色素细胞发育和体色人工改良积累资料。

**关键词** 橘色双冠丽鱼; 小眼畸形相关转录因子(MITF); qRT-PCR; 黑色素细胞

中图分类号 S91 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0107-12

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 即小眼畸形相关转录因子,于放射诱导的突变小鼠中

发现(Hertwig, 1942),突变体的后代会出现小眼畸形、早发性耳聋、皮毛和虹膜色素减退等症状。MITF 是

\* 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010304)、中国东盟海上合作基金(CAMC-2020F)和国家水产种质资源共享服务平台(NFGR-2020)共同资助 [This work was supported by Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2020A1515010304), China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2020F), and National Freshwater Genetic Resource Center (NFGR-2020)]. 陈旭东, E-mail: 979926926@qq.com

① 通讯作者: 宋红梅, 副研究员, E-mail: shm1227@126.com

收稿日期: 2020-12-15, 收修改稿日期: 2021-01-26

动物皮肤、眼睛和羽毛色素中黑色素细胞发育的关键调控因子(Lin *et al.*, 2019), 具有基本-螺旋-环-亮氨酸拉链(basic helix-loop-helix-leucine zipper, bHLHZip)结构, 以二聚体的形式与酪氨酸家族启动子 Mbox 高度结合, 通过直接调控 *dct*、*tyr*、*tyrp1*、*c-kit* 和 *bcl2* 等基因的表达, 从而在黑色素细胞的发育、存活、迁移、增殖和分化过程中发挥重要作用(Steingrimsson *et al.*, 2004)。在哺乳动物中, *mitf* 基因的突变或缺失可能会导致动物耳朵、眼睛、毛发、体色等表型发生改变, 如鹌鹑(*Coturnix*)白色羽毛的产生(Minvielle *et al.*, 2010)、马(*Equus caballus*) (Hauswirth *et al.*, 2019)和犬(*Canis lupus familiaris*) (Korberg *et al.*, 2014)皮毛白色斑点的出现等。在鱼类中, *mitf* 作为治疗黑色素瘤潜在的靶基因, 已在斑马鱼(*Danio rerio*)中开展了大量研究(Lister *et al.*, 2014), 在青鳉(*Oryzias latipes*) (Li *et al.*, 2013)、锦鲤(*Cyprinus carpio*) (Liu *et al.*, 2015)、鲫鱼(*Carassius auratus*, red var.) (Zhang *et al.*, 2017)等鱼类中也开展了 *mitfa* 在胚胎和各个成鱼组织中表达情况的研究, 初步探索了 *mitfa* 在鱼类体色形成过程中的作用, 但其具体的调控机制及与其他体色相关基因的联级作用仍未被阐明。

橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*), 俗称红魔鬼, 原产于中南美洲的尼加拉瓜、哥斯达黎加等地, 是一种既可食用又可观赏的大型热带鱼类(Barluenga *et al.*, 2010; Kautt *et al.*, 2012)。通常 1 龄可达性成熟, 成熟后的丽鱼体色为橘红色或橘色, 生产上常将其作为父本与红头丽鱼(*Cichlasoma synspilum*)杂交, 产生更具观赏性的子一代血鸚鵡鱼(*A. citrinellus*♂×*C. synspilum*♀)。橘色双冠丽鱼在发育过程中会出现体色过渡的现象, 体色由最初黑色过渡至灰色, 灰色再过渡至亮黄色, 这一现象称为体色褪黑(蒋燕玲, 2016), 主要是由于色素细胞的形成、增殖、迁移和分化所致。橘色双冠丽鱼含 4 种色素细胞, 包括黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞和虹彩细胞, 其中, 红色素细胞和虹彩细胞只在特定部位分布且数量较少, 黑色素细胞和黄色素细胞在“黑色-灰色-黄色”3 个时期均有分布, 孵化后至体色由黑到黄的转变过程中, 黑色素细胞数量呈逐渐增加而后又减少的趋势, 黄色素细胞数量则呈一直增加趋势(韦敏侠等, 2015)。目前, 国内外对鱼类早期体色褪黑这一复杂生物学过程的研究相对较少, 其调控机制仍不明确。

鱼类体色的形成和分布主要是由其体表鳞片和皮肤中色素细胞的类型、分布和数量所决定(Shi *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2012), 目前, 已在鱼类中鉴定出 6 种

色素细胞, 包括黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞、虹彩细胞、白色素细胞和蓝色素细胞(Volkening *et al.*, 2018)。其中, 黑色素细胞分布最为广泛, 含有大量的黑色素颗粒, 能够吸收特定波长的入射光, 使鱼的颜色呈现黑色/灰色(Zhang *et al.*, 2017)。黑色素细胞起源于外胚层神经嵴细胞, 由神经嵴细胞经黑素母细胞、黑素干细胞发育成黑色素细胞(Cohen *et al.*, 2016), 黑色素细胞的形成受一系列通路和基因的严格调控(Hou *et al.*, 2008), 其中, MC1R/ $\alpha$ -MSH 信号通路(Newton *et al.*, 2007)、PI3K/Akt 信号通路(Khaled *et al.*, 2002)、MAPK 信号通路(Wang *et al.*, 2017)、WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路(Yamada *et al.*, 2010)、NO 信号通路(Park *et al.*, 2009)为最常见的 5 条信号通路, *mitf* 作为这 5 条通路共有的靶向基因, 直接关联黑色素细胞发育所必需的多个基因的表达, 包括 *dct*、*tyr*、*c-kit* 和 *bcl2* 等, 对黑色素细胞存活、迁移、增殖和分化起着关键性作用(Steingrimsson *et al.*, 2004)。本研究拟聚焦黑色素合成关键基因 *mitf*, 检测其在橘色双冠丽鱼各组织、胚胎发育各时期和体色褪黑转换期的表达模式, 了解其在鱼类体色褪黑调控中的作用规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

橘色双冠丽鱼取自中国水产科学研究院珠江水产研究所。选取性成熟且体色为橘色的健康双亲进行配对, 获取不同发育时期的胚胎, 包括受精卵、卵裂期、原肠期、神经期、视泡期、听泡期、心脏形成期、血液循环期等 8 个时期胚胎(蒋燕玲, 2016)。在体色发育的 3 个褪色阶段“黑色、灰白、黄色”各取 3 尾鱼, 剥离鳞片、皮肤和尾鳍。同样选取性成熟且体色为淡黄色的橘色双冠丽鱼 3 尾, 分离鳃、脑、肌肉、性腺、眼、肾和心脏 7 个组织, 均用 Trizol 处理, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 用于 RNA 提取和荧光定量分析。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 *mitf* 基因 cDNA 全长克隆** 取性成熟橘色双冠丽鱼皮肤、鳞片、尾鳍于 Trizol 中, 按 Tissue RNA kit (OMEGA)操作步骤提取总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 Synergy<sup>TM</sup> NEO HTS 多功能酶标仪检测 RNA 的完整性、纯度及浓度。利用 Prime Script<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa)反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

根据已知慈鲷科(Cichlidae)鱼类保守序列, 利用 Primer 5.0 软件设计扩增引物 *mitf*-F 和 *mitf*-R (表 1),

以 cDNA 第一链为模板, 扩增目的基因片段。25  $\mu\text{L}$  扩增体系: 16.75  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 4  $\mu\text{L}$  dNTP mix, 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  模板, 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 0.25  $\mu\text{L}$  *rTaq* 酶。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  后延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送广州艾基生物有限公司测序。根据测序结果设计 *mitf* 5'和 3'巢氏引物(表 1), 通过 Smarter Race 5'/3' kit components (TaKaRa) 进行 5'末端和 3'末端序列扩增。扩增后 PCR 产物进行胶回收、连菌、37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 挑选阳性克隆进行测序。利用软件 Vector NTI 将 *mitf* 5'端、3'端及其中间序列拼接, 从而获得橘色双冠丽鱼完整 *mitf* cDNA 序列(图 1 和图 2)。

**1.2.2 生物信息学分析** 将拼接好的橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因在 NCBI 数据库中通过 blast 功能进行同源性分析, 利用 ORF finder 查找开放阅读框; 采用 ExPASy ProtParam 分析 MITF 蛋白的理化性质, 包括蛋白质分子量、理论等电点、亲水系数等; 借助 Signal IP 4.1 进行信号肽预测; 利用 TMHMM 2.0 查找跨膜结构域; 使用 NetPhos 3.1 工具进行磷酸化位点的查找; 通过 NetNGlyc 4.0 查找糖基化位点, 借助 InterPro 进行氨基酸结构域的分析; 使用 SOPAMA 预测蛋白质二级结构; 利用 MEGA 7 软件构建系统进化树。

**1.2.3 *mitf* 基因荧光定量分析** 通过 RNA 提取试剂盒提取各胚胎、组织样品 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和酶标仪检测其完整性及浓度。取 1 ng RNA 用 EVOM-MLV 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 存于

-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。根据 *mitf1*、*mitf2* 基因全长设计特异性引物(表 1), 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用 Real-Time PCR 方法在 QuantStudio6 Flex 仪器上对橘色双冠丽鱼各时期胚胎和不同组织进行荧光定量分析。20  $\mu\text{L}$  反应体系: SYBR Green master mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环, 每个样品 3 个重复。*mitf* 基因相对表达量的具体计算公式参考蒋燕玲等(2016)。利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。

## 2 结果

### 2.1 *mitf* 基因 cDNA 全长和氨基酸序列分析

获得橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因 2 个亚型 *mitf1* 和 *mitf2*, 其中, *mitf1* cDNA 全长为 1816 bp, 5'UTR 长 158 bp, 3'UTR 长 428 bp, 开放阅读框(ORF)为 1230 bp, 共编码 409 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 39.1 kDa, 理论等电点为 5.23, 亲水性系数为-0.603。TMHMM2.0 查找发现无跨膜结构。磷酸化位点分析显示, 该蛋白包含 27 个丝氨酸(S)磷酸化位点、9 个苏氨酸(T)磷酸化位点、5 个酪氨酸(Y)磷酸化位点。使用 SOPAMA 预测蛋白二级结构, 其中,  $\alpha$  螺旋结构 131 个(占 37.01%),  $\beta$  折叠 22 个(占 6.21%), 无规则卷曲结构 177 个(占 50%), 延展链结构 24 个(占 6.78%)。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>mitf</i> -F	CAGCAGGTGAGGCAGTATC	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因核心片段扩增
<i>mitf</i> -R	TCTGTAGGTATCTGGTCAAAGG	
<i>mitf1</i> -5'-R	ACTGGTGGGTCGCTATAAATC	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因 5'端扩增
<i>mitf1</i> -5'-R1	AAGGTGATGGTGCCGTTGTTGAG	
<i>mitf2</i> --5'-R	GGAAACATCTGGAGACATTGAG	
<i>mitf</i> -3'-F	TTCTTGGTGA CTGCCATCCGAG	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因 3'端扩增
<i>mitf</i> -3'-F1	CCTCAACAACGGCACCATCACCTT	
<i>mitf1</i> -RT-F	ACGGCAAGAAGAAAACC	qRT-PCR
<i>mitf1</i> -RT-R	TTCTCGCAGTTGGAGCTAAGG	
<i>mitf2</i> -RT-F	ACAGTCATTATCAGGTGC	
<i>mitf2</i> -RT-R	TCTCTTCTCACAGTTGG	
$\beta$ -actin-F	TTGTTTCAGCCAGTTCCC	参照基因
$\beta$ -actin-R	AACCAAACCTGCATTCGC	Reference gene

```

1 ACATGGGCAGATCCAGTGCAGAGATGCCAGTGTGGCCACTGGCAGGTCGAGCATGTAGGAAAGCGGCAAGAAAAACCAGC
91 GACCCCTGCACCACAGCACCACACAGTGTCTCAACCCTGACGCTCCACCTGGCCAGGTCGCATGAGCCAGCCGTCCATAAAA
V Q K V Q S H L E S P T K Y H I Q Q A Q R Q Q V R Q Y L S T
181 GTCCAGAAAGTGCAGTCCACCTGGAAAGTCCACCAAAATACCACATCCAGCAGGCTCAGCGGCAGCAGGTGAGGCAGTATCTGCCACC
T L G G K A G S Q C S S Q P P E H S M P P G P G S S A P N S
271 ACCCTGGGTGGTAAAGCTGGCAGCCAGTGTCTGAGCCAGCCCCGAGCAGCATGCCACCTGGGCTGGCAGCAGTGCACCCCAACAGT
P M A L L T L S S N C E K E L C V I Q M D D V I D D I I S L
361 CCTATGGCTTGTCTTACCCTTAGCTCCAACCTGCGAAGAAAGCTTTGTGTTATACAGATGGATGATGCATTGATGATATTATTAGCTTG
E S S Y N E D V L G L M D P G L Q M N N Q L P V S G N L L D
451 GAGTCAAGTACAATGAAGATGTTCTGGACTGATGGACCCGGGACTTCAAATGAACAACCAGCTTCTGTGTCTGGAATTTACTGGAT
V Y S N Q G L P L P G L A I N N C P P N I K R E F T A P G M
541 GTGACTCCAACCAAGGACTTCGCTACCAGGCTTGCATCAACAATGCCACCCCAACATAAAAGGGAATTTACAGCTCCTGGCATG
K Q V L D K P G S C G Q Y E N Y Q R P E S F P V E A E V R A
631 AAGCAACTACTGGACAAGCCTGGATCCTGTGGCCAGTATGAAAATATCAAAGCCAGAGAGCTTCCAGTAGAGCCGAGTTCCTGCT
L A K E R Q K K D N H N L I E R R R R F N I N D R I K E L G
721 CTGGCCAAAGAGAGACAGAAGAGGATAACCAACTTAATGAAAGAGCAGGAGATTCAACATCAATGATCGCATTAAGAGCTGGGA
T L I P K S N D P D M R W N K G T I L K A S V D Y I R K L Q
811 ACCCTAATACCCAAGTCAAATGATCCAGACATGCGCTGGAATAAGGGCACTATTCTGAAAGCCTCAGTGGACTATATCAGGAAATACAG
R E Q Q R A K E L E C R Q R K L E H A N R H L M L R I Q E L
901 CGGGAGCAGCAGAGAGCAAGGAGCTTGAGTGCAGACAACGGAAGCTGGAACATGCAATCGCCACCTGATGCTGCTATACAGGAGCTG
E I Q A R A H G L T V V S S T S V C A S E L M A R A I K Q
991 GATCCAAAGCCGCTCATGGTCTTACAGTGTCTCCACATCTGTCTGCGCATCAGAGCTGATGGCCGAGCCATCAAACAGGAG
P V L G D C P S E L Y Q H S S A P D M S P P T T L D L N N G
1081 CCCGTTCTTGGTGTACTGCCATCCGAGCTTACCAGCATAGCTCCGCCCCGACATGTCCCTCCACCACTGGACCTCAACAACGGC
T I T F D Q I P T D A G E P G P Y G S S S A C K M K E L V R
1171 ACCATCACCTTTGACCAGATACCTACAGATGCAGGGGAACCTGGACCCATGGCAGCTCCAGTGCCTGTAATGAAGGAGCTGGTAAGA
D N T L G P I S P S D P L L S S M S P D V S S S I D S H H T
1261 GACAACACCCTAGGGCCAATTTCCCCAGTGTATCCCTGCTCTCAATGTCTCCAGATGTTCCAGCAGCATGCAGACCCACCATACC
S S S S L D D E E R G C *
1351 TCCAGCTCAAGTCTGGATGACGAAGAGCGTGGCTGTAGCCCAACGGCATGATCTACGTTGACACTTAGATTTATAGCGACCACCAGTG
1441 AGACACCAACATTACAGATATCATGTGAGTCAATAAAAATAACTCATGAATGCATATTTTCTTACTTTTGTCCATACTGCTGTAGAAAT
1531 TFGAGTGTACATAGTCGGACAGCTCAGAATTCATATAAATCCACAGTGTCTGGGAAACATAATACAGCTCATTTTGGGGCTTTAAA
1621 ATCTGTTTATTTTAAATATACTTTAAACATTTTCATATTTTCTAAATACACAGTGGATTGGGAAGTAATGTCAAAGATATATGGTG
1711 CATGTGTGAAATGCATTTGTGATAATAGCACATGTAATTTAGAAATAATAATAATATTTAGAAATTCAAAAAATAAAAAAAAAAAAA
2081 GAAAAAATAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 橘色双冠丽鱼 *mitf1* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.1 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *mitf1* in *A. citrinellus*

方框为起始密码子 ATG; \*代表终止密码子; 灰色阴影区域代表 bHLHzip 结构域。下同  
Grey box is the initiation codon; "\*" is the termination codon; Grey shade is bHLHzip domain. The same as below

```

1 ACATGGGGAATACAGTCAATATCAGGTGCAGTCCACCTGGAAAGTCCACCAAAATACCACATCCAGCAGGCTCAGCGGCAGCAGGTG
91 AGGCAGTATCTGTCCACCACCTGGGTGGTAAAGCTGGCAGCCAGTGTCTGAGCCAGCCCCGAGCAGAGCATCCACCTGGGCTGGC
S S A P N S P M A L L T L S S N C E K E M D D V I D D I I S
181 AGCAGTGCACCCAAACAGTCCATGGCTTGTCTTACCCTTAGCTCCAACCTGTGAGAAAGAGATGGATGATGCATTGATGATNTTAGC
L E S Y N E D V L G L M D P G L Q M N N Q L P V S G N L L
271 TTGGAGTCAAGTACAATGAAGATGTTCTGGACTGATGGACCCGGGACTTCAAATGAACAACCAGCTTCTGTGTCTGGAATTTACTG
D V Y S N Q G L P L P G L A I N N C P P N I K R E F T A P G
361 GATGTGTACTCCAACCAAGGACTTCGCTACCAGGCTTGCATCAACAATGCCACCCCAACATAAAAGGGAATTTACAGCTCCTGGC
M K Q V L D K P G S C G Q Y E N Y Q R P E S F P V E A E V R
451 ATGAAGCAAGTACTGGACAAGCCTGGATCCTGTGGCCAGTATGAAAATATCAAAGCCAGAGAGCTTCCAGTAGAGCCGAGTTCCTG
A L A K E R Q K K D N H N L I E R R R R F N I N D R I K E L G
541 GCTTGGCCAAAGAGAGACAGAAGGATAACCAACTTAATGAAAGAGCAGGAGATTCAACATCAATGATCGCATTAAGAGCTG
G T L I P K S N D P D M R W N K G T I L K A S V D Y I R K L
631 GGAACCTTAATACCCAAGTCAAATGATCCAGACATGCGCTGGAATAAGGGCACTATTCTGAAAGCCTCAGTGGACTATATCAGGAAATTA
Q R E Q Q R A K E L E C R Q R K L E H A N R H L M L R I Q E
721 CAGCGGGAGCAGCAGAGAGCAAGGAGCTTGAGTGCAGACAACGGAAGCTGGAACATGCAATCGCCACCTGATGCTGCGTATACAGGAG
L E I Q A R A H G L T V V S S T S V C A S E L M A R A I K Q
811 CTGGAGATCCAAGCCGCTCATGGTCTTACAGTGTCTCCACATCTGTCTGCGCATCAGAGCTGATGGCCGAGCCATCAAACAG
E P V L G D C P S E L Y Q H S S A P D M S P P T T L D L N N
901 GAGCCGTTCTTGGTGTACTGCCATCCGAGCTTACCAGCATAGCTCCGCCCCGACATGTCCCTCCACCACTGGACCTCAACAAC
G T I T F D Q I P T D A G E P G P Y G S S S A C K M K E L V
991 GGCACCATCACCTTTGACCAGATACCTACAGATGCAGGGGAACCTGGACCCATGGCAGCTCCAGTGCCTGTAATGAAGGAGCTGGTA
D N T L G P I S P S D P L L S S M S P D V S S S I D S H H T
1081 AGAGACAACACCCTAGGGCCAATTTCCCCAGTGTATCCCTGCTCTCAATGTCTCCAGATGTTCCAGCAGCATGCAGACCCACCAT
T S S S L D D E E R G C *
1171 ACCTCAGCTCAAGTCTGGATGACGAAGAGCGTGGCTGTAGCCCAACGGCATGATCTACGTTGACACTTAGATTTATAGCGACCACCA
1261 GTGAGACCAACATTACAGATATCATGTGAGTCAATAAAAATAACTCATGAATGCATATTTTCTTACTTTTGTCCATACTGCTGTAGAA
1351 ACTTTGAGTGTACATAGTCGGACAGCTCAGAATTCATATAAATCCACAGTGTCTGGGAAACATAATACAGCTCATTTTGGGGCTTT
1441 AAAATCTGTTTATTTTAAATATACTTTAAACATTTTCATATTTTCTAAATACACAGTGGATTGGGAAGTAATGTCAAAGATATATG
1531 GTGCATGTGAAATGCATTTGTGATAATAGCACATGTAATTTAGAAATAATAATAATATTTAGAAATTCAAAAAATAAAAAAAAAAAAA
2081 AAAAATAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 橘色双冠丽鱼 *mitf2* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.2 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *mitf2* in *A. citrinellus*



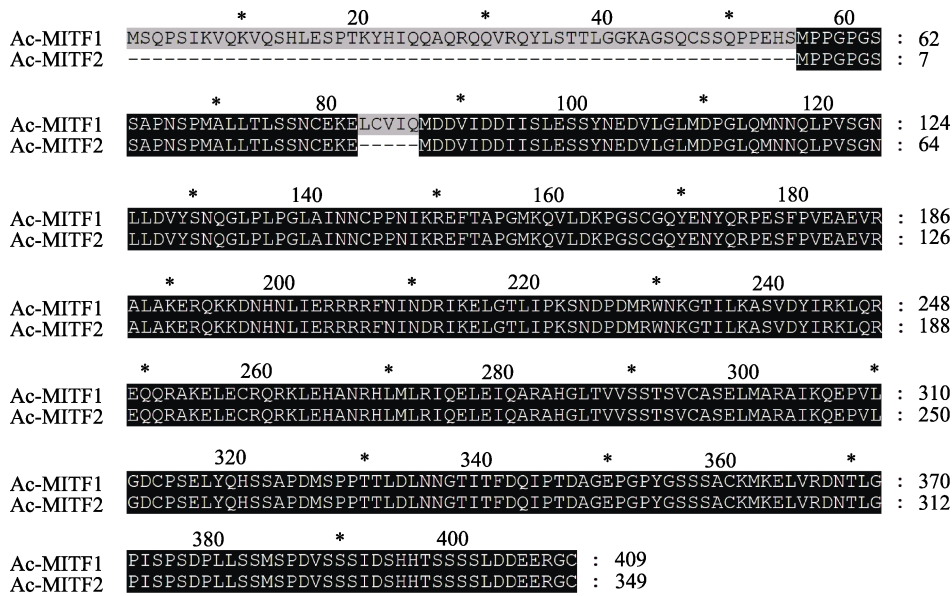


图 3 橘色双冠丽鱼 *mitf1*、*mitf2* 基因的氨基酸序列比对  
Fig.3 Amino acid sequence alignment of *mitf1* and *mitf2* genes in *A. citrinellus*

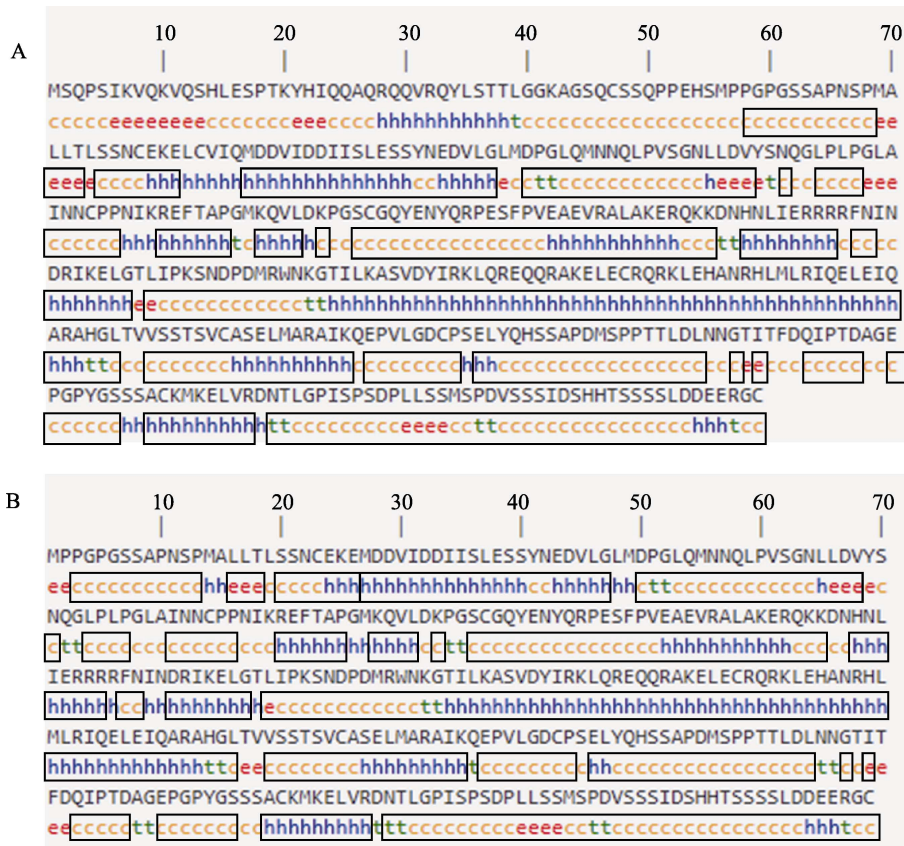


图 4 橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 蛋白二级结构预测  
Fig.4 Prediction of the secondary structure of MITF1 and MITF2 proteins in *A. citrinellus*

A: MITF1; B: MITF2; h:  $\alpha$ 螺旋; e: 延展链; c: 无规则卷曲; t:  $\beta$ 折叠;

灰色方框为 MITF1、MITF2 蛋白二级结构的相同部分

A: MITF1; B: MITF2; h: Alpha helix; e: Extended strand; c: Random coil; t: Beta turn;  
Grey boxed are the consensus of the secondary structure of MITF1 and MITF2 proteins

*mitf2* 的 cDNA 全长为 1638 bp, 5'UTR 长 160 bp, 3'UTR 长 428 bp, ORF 为 1050 bp, 共编码 349 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 38.5 kDa, 理论等电点为 5.23, 亲水系数为 -0.645。*mitf1* 和 *mitf2* 氨基酸序列比对结果显示(图 3), *mitf1* 亚型氨基酸序列与 *mitf2* 亚型相比, 在 0~53 的位置多 53 个氨基酸, 82~86 的位置多 5 个氨基酸, 其余位置完全相同。TMHMM 2.0 查找发现无跨膜结构。磷酸化位点分析显示, 该蛋白包含 27 丝氨酸(S)磷酸化位点、9 个苏氨酸(T)磷酸化位点、5 个酪氨酸(Y)磷酸化位点。使用 SOPAMA 预测蛋白二级结构(图 4), 其中,  $\alpha$  螺旋结构 142 个(占 40.69%),  $\beta$  折叠 14 个(占 4.01%), 无规则卷曲结构 174 个(占 49.86%), 延展链结构 19 个(占 5.44%)。与 *mitf1* 蛋白二级结构相比, 除 0~53 和 82~86 位置多出氨基酸及个别位点结构不同外, 二级结构基本一致。

## 2.2 *mitf* 基因同源比对和系统进化树分析

橘色双冠丽鱼 2 个亚型 *mitf1* 和 *mitf2* 的 bHLHzip 结构氨基酸序列与大多数物种高度一致, 表明 bHLHzip 结构在进化过程中较为保守。利用 MegAlign 软件分析橘色双冠丽鱼 *mitf* 氨基酸序列与其他物种的同源性(表 2), 结果显示, 橘色双冠丽鱼 *mitf1* 氨基酸序列与斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和萨伊蓝六间(*Cyphotilapia frontosa*)等鱼类同源性最高, 分别为 90.7%、91.9%和 93%, 与其他硬骨鱼类如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、斑鱼(*Channa argus*)和孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)也有较高的同源性, 分别达到了 85.6%、87.4%和 82.1%, 而与人(*Homo sapiens*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、鸡(*Gallus gallus*)和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)则相对较低, 只有 60%、60.9%、58.9%和 63.1%。

表 2 *mitf1*、*mitf2* 氨基酸序列的同源性

Tab.2 GenBank accession number and the identity of *mitf1* and *mitf2*

物种(登录号) Species (Accession No.)	<i>mitf1</i> 同源性 <i>mitf1</i> identity /%	<i>mitf2</i> 同源性 <i>mitf2</i> identity /%
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i> (XP_009444117.2)	60.9	60.9
人 <i>Homo sapiens</i> (NP_001171896.1)	60.0	59.8
鼠 <i>Mus musculus</i> (NP_032627.1)	60.0	59.3
牛 <i>Bos taurus</i> (XP_015314994.1)	60.4	60.3
野猪 <i>Sus scrofa</i> (XP_013837338.2)	61.3	60.9
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> (XP_016891652.1)	60.8	63.2
犬 <i>Canis lupus familiaris</i> (AAQ74413.1)	61.0	60.3
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> (BBA54891.1)	63.1	64.4
鸡 <i>Gallus gallus</i> (BAA25648.1)	58.9	58.5
斑马拟丽鱼 <i>Maylandia zebra</i> (XP_024658401.1)	90.7	94.8
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> (XP_005450213.1)	91.9	94.5
萨伊蓝六间 <i>Cyphotilapia frontosa</i> (ABD48780.1)	93.0	95.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> (XP_027138861.1)	85.6	87.1
斑鱼 <i>Channa argus</i> (AMA02077.1)	87.4	88.1
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i> (ABI64148.1)	82.1	83.5
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> (XP_021332449.1)	68.8	67.8
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (XP_021425474.1)	77.7	77.9
大马哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (XP_024237694.1)	76.3	77.6
尼加拉瓜始丽鱼 <i>Archocentrus centrarchus</i> (XP_030584900.1)	98.0	99.4
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i> (XP_014184787.1)	93.0	95.1
布氏新亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i> (XP_006784801.1)	91.5	93.7
盲曹鱼 <i>Lates calcarifer</i> (XP_018554530.1)	87.8	90.8
大西洋玛丽鱼 <i>Poecilia mexicana</i> (XP_014858201.1)	83.1	84.2

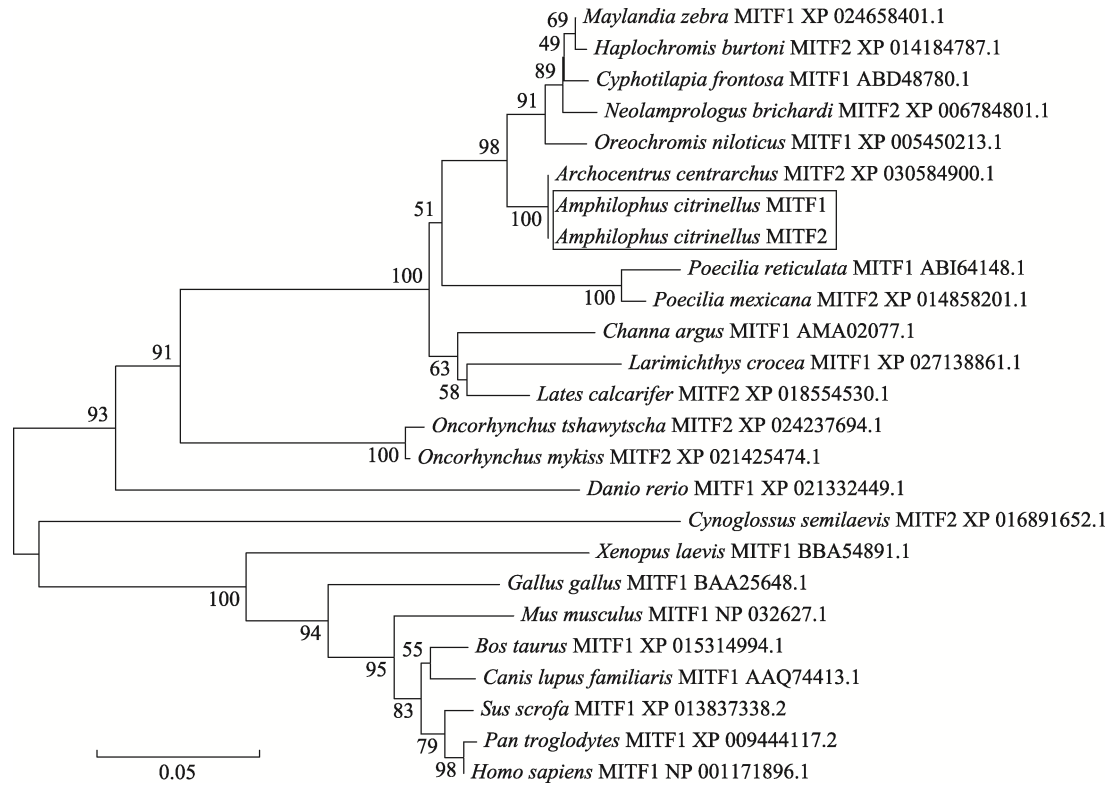


图 5 MITF1、MITF2 蛋白质序列系统进化树

Fig.5 The phylogenetic tree of protein sequences of MITF1 and MITF2

橘色双冠丽鱼 *mitf2* 氨基酸序列与人、黑猩猩、鸡和非洲爪蟾同源性同源也相对较低, 分别为 59.8%、60.9%、58.5%和 64.4%, 而与尼加拉瓜湖始丽鱼 (*Archocentrus centrarchus*)、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*)、布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*)和盲曹鱼(*Lates calcarifer*)同源性则相对较高, 都达到了 90%以上。

以邻接法(Neighbor-joining)构建橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 系统进化树(图 5)。进化树分为两大支, 哺乳类、鸟类、爬行类聚为一大支, 橘色双冠丽鱼与其他慈鲷科、鲑科、鲤科鱼类聚为另一大支。其中, 橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 和尼加拉瓜湖始丽鱼聚为一小支, 与斑马拟丽鱼、布氏新亮丽鲷、伯氏朴丽鱼、萨伊蓝六间、尼罗罗非鱼等鱼类亲缘关系最近; 而与人、黑猩猩、小鼠、原鸡、非洲爪蟾等亲缘关系则相对较远。

### 2.3 *mitf* 基因的表达差异分析

**2.3.1 胚胎不同发育时期中的 *mitf* 基因表达** *mitf1* 在 8 个胚胎发育时期均有不同程度的表达, 其中, 受精卵时期表达量最高, 显著高于其他 7 个时期( $P < 0.05$ ), 随着胚胎的发育, 表达量逐渐下降, 在神经期和视泡期只有微量表达。胚胎在发育至听泡期时表达量骤然

上升( $P < 0.05$ ), 随后在心脏形成期和血液循环期又呈现下降趋势(图 6); *mitf2* 在橘色双冠丽鱼胚胎发育的

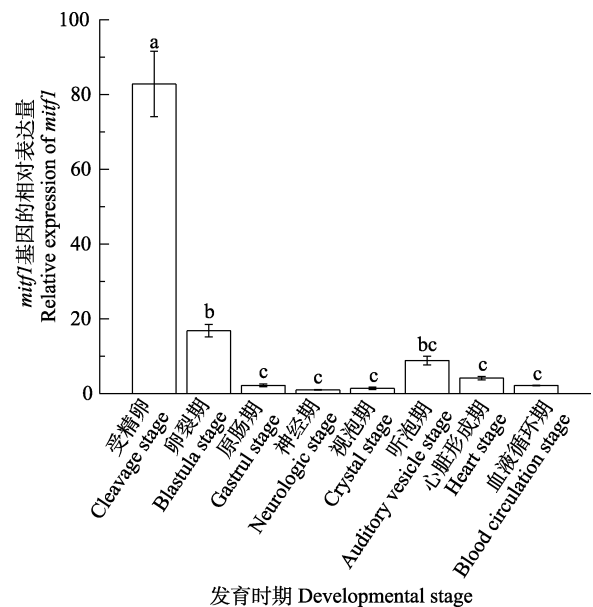


图 6 *mitf1* 在胚胎 8 个发育时期的表达差异分析

Fig.6 Analysis of *mitf1* gene expression at eight developmental stages

不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
Different letters show significant difference ( $P < 0.05$ ).  
The same as below

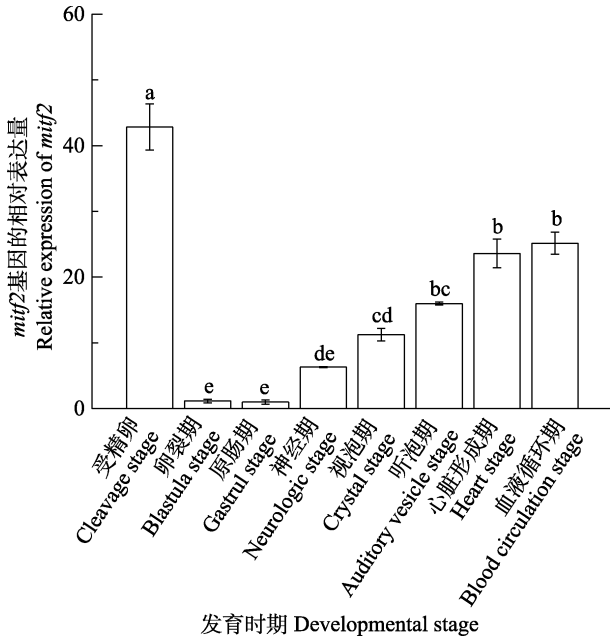


图7 *mitf2* 在胚胎8个发育时期的表达差异分析  
Fig.7 Analysis of *mitf2* gene expression at eight developmental stages

8个时期也均有表达,在受精卵时期表达量最高,显著高于其他发育时期( $P < 0.05$ )。在卵裂期、原肠期表达量骤然降低,只有微量表达。发育至神经期时表达量升高,直至血液循环期均呈上升趋势,表达量不断增加(图7)。

**2.3.2 体色过渡3个时期 *mitf* 基因的表达模式** 橘色双冠丽鱼在“黑色-灰色-黄色”3个典型的体色过渡时期,在皮肤、鳞片、尾鳍, *mitf1*、*mitf2* 均有不同程度的表达(图8和图9)。其中,在黑色过渡期皮肤中 *mitf1* 表达量最高,显著高于灰色和黄色过渡期( $P < 0.05$ ),灰色过渡期表达量略高于黑色过渡期,但无显著差异,整体呈逐渐下降的趋势,在鳞片和尾鳍中, *mitf1* 的表达趋势与在皮肤中基本一致;在皮肤中, *mitf2* 在黑色过渡期表达量最高,随着橘色双冠丽鱼发育,表达量逐渐降低,但无显著差异( $P > 0.05$ ),在鳞片和尾鳍中, *mitf2* 在3个过渡时期的表达量同样呈现下降的趋势,黑色过渡期表达量最高,显著高于灰色过渡期和黄色过渡期( $P < 0.05$ ),灰色过渡期表达量高于黄色过渡期,但无显著差异( $P > 0.05$ )。

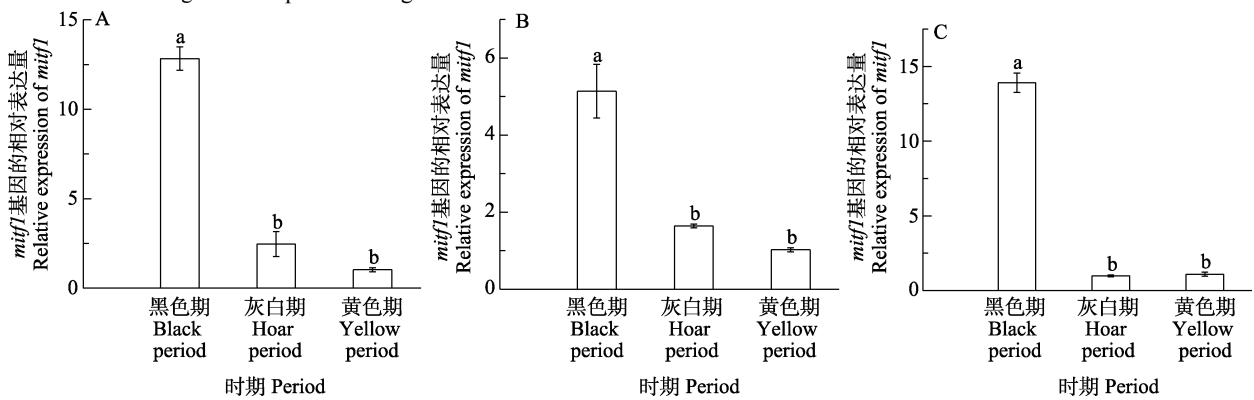


图8 *mitf1* 在不同体色过渡时期的表达差异分析  
Fig.8 Analysis of *mitf1* gene expression at different periods of color transition

A: 皮肤; B: 鳞片; C: 尾鳍  
A: Skin; B: Scale; C: Tail fin

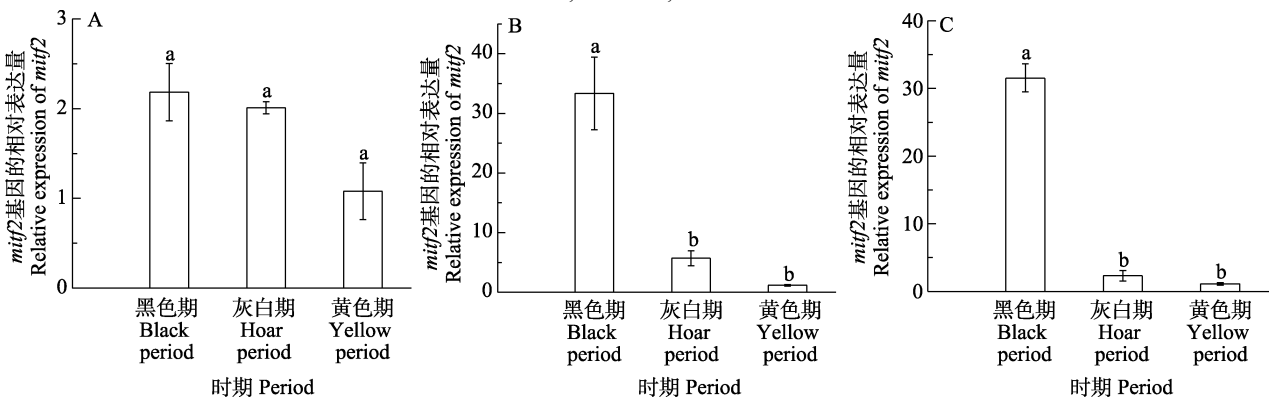


图9 *mitf2* 在不同体色过渡时期的表达差异分析  
Fig.9 Analysis of *mitf2* gene expression at different periods of color transition

A: 皮肤; B: 鳞片; C: 尾鳍  
A: Skin; B: Scale; C: Tail fin

**2.3.3 成鱼不同组织中的 *mitf* 基因表达差异** 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *mitf1* 和 *mitf2* 在橘色双冠丽鱼不同组织中的表达差异(图 10)。结果显示, *mitf1* 在各个组织中均有表达, 眼部表达量最高, 显著高于其他 6 个组织( $P < 0.05$ ), 肌肉、肾、心脏、脑表达量也相对较高, 性腺和鳃表达量则相对低一些。*mitf2* 在 7 个组织中也均有表达, 眼部表达量同样显著高于其他组织( $P < 0.05$ ), 在鳃、脑、性腺、心脏组织中的表达量极低, 只有微量的表达, 肾和肌肉中的表达量也相对较低(图 11)。

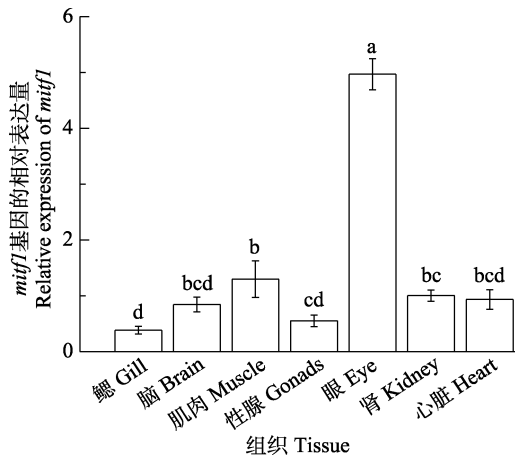


图 10 *mitf1* 在 7 种组织中的表达差异分析

Fig.10 Analysis of *mitf1* gene expression in seven tissues

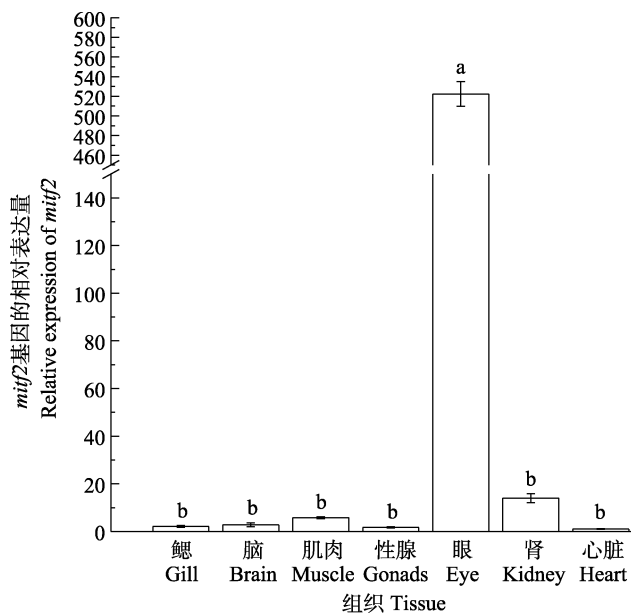


图 11 *mitf2* 在 7 种组织中的表达差异分析

Fig.11 Analysis of *mitf2* gene expression in seven tissues

## 3 讨论

### 3.1 *mitf* 基因的 cDNA 全长和氨基酸序列分析

通过 RACE 技术获得橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因 cDNA 全长, 2 个亚型 MITF1 和 MITF2 均具有 3 个结构域: 靠近 N 末端的 MITF\_TFEB\_C\_3\_N 结构域、bHLHZip 结构域和一个未知功能结构域(DUF3371)。bHLHZip 结构域作为 MITF 蛋白的功能区域, 在进化过程中高度保守, 其中, HLHZip 区域能够与自身或转录因子 TFEB (transcription factor EB)、TFEC、TFE3 形成同源或异源二聚体, 通过 Basic 区域与特异的 DNA 结合行使蛋白功能, 特异性 DNA 指包含 5'-CACGTG-3'或 5'-TCATGTG-3'结构的 DNA 序列, 即 E-box 或 M-box (Bentley *et al*, 1994; Hemesath *et al*, 1994)。在哺乳动物中, 受不同启动子调控, *mitf* 编码多个蛋白质异聚体, 包括 MITF-A、B、C、D、E、H、J、M、MC、CM 等(Hershey *et al*, 2005; Shiohara *et al*, 2008), 在鱼类中, 从斑马鱼、青鳉分离得到 *mitf* 的 2 种亚型 *mitfa* 和 *mitfb* (Altschmied *et al*, 2002), 这 2 种亚型在功能上发生了分化, *mitfa* 对黑色素细胞的形成、增殖、迁移和分化起着重要的调控作用, 而 *mitfb* 不参与黑色素细胞的发育, 只在眼色素上皮细胞中表达, 参与眼调控的发育(Lister *et al*, 2014), 本研究克隆的 *mitf1* 和 *mitf2* 为 *mitf* 基因 2 个亚型, 均属于 *mitfa* 亚型, 理化性质分析结果显示, *mitf1* 和 *mitf2* 的蛋白质二级结构极为相似, 荧光定量结果显示, *mitf1* 和 *mitf2* 除了在胚胎期表达量有差异外, 在各个组织和各转换时期表达量变化趋势基本一致, 因此, 推测 *mitf1* 和 *mitf2* 更多保留了 *mitfa* 基因功能, 未出现明显基因功能分化。同源比对发现, 橘色双冠丽鱼 *mitf1*、*mitf2* 与尼加拉瓜湖始丽鱼、萨伊蓝六间、斑鱼等鱼类具有较高的同源性, 与哺乳类、鸟类、爬行类等同源性较低, 符合橘色双冠丽鱼传统进化地位。

### 3.2 *mitf* 基因表达差异分析

**3.2.1 *mitf* 基因在胚胎发育时期的表达** *mitf1* 和 *mitf2* 在橘色双冠丽鱼 8 个胚胎发育时期均有表达, 其中, 在受精卵时期表达量最高, 显著高于其他发育期( $P < 0.05$ ), 表现出明显的时期特异性。研究发现, *mitf* 基因也在其他动物胚胎发育期开始表达, 但表达的时期较晚, 如非洲爪蟾胚胎在 21/22 期开始表达 (Kumasaka *et al*, 2010), 鸡(Mochii *et al*, 1998)和鼠 (*Mus musculus*)(Nakayama *et al*, 1998)胚胎则在 5 日龄



和 9.5 日龄开始表达。在青鳉中, *mitf* 基因在胚胎整个发育过程中最早表达于 2 细胞期(Li *et al.*, 2013a、b), 这与橘色双冠丽鱼表达模式相类似。蒋燕玲等(2016)对橘色双冠丽鱼胚胎组织学观察发现, 黑色素细胞在血液循环期才开始出现, 而 *mitf* 在受精卵时期即出现高表达现象, 结合前人报道, 推测鱼类发育早期 *mitf* 不仅调节黑色素细胞分化和发育, 对视网膜色素上皮细胞、破骨细胞和肥大细胞也有不同程度的调控作用(Bauer *et al.*, 2009)。在卵裂期, *mitf1*、*mitf2* 基因表达量骤减, *mitf1* 随胚胎发育表达量继续降低直至听泡期骤升后又继续下降, 而 *mitf2* 随胚胎发育表达量逐渐升高直至血液循环期, 仍呈现上升趋势, 预示 *mitf* 基因可能在黑色素细胞的发育过程中扮演着十分重要的角色。

**3.2.2 *mitf* 基因在不同褪色时期表达模式** 在 3 个体色过渡时期中, 皮肤、鳞片、尾鳍的 *mitf1* 和 *mitf2* 的表达量均呈逐渐下降的趋势, 其中, 黑色时期表达量最高, 除皮肤的 *mitf2* 基因表达量在 3 个过渡时期无显著差异外, 黑色时期鳞片和尾鳍中的表达量显著高于灰色期和黄色期, 与 *mitf* 下游基因 *TYR* 在橘色双冠丽鱼不同褪黑时期逐渐降低的表达模式基本一致(蒋燕玲等, 2016)。这与鱼体表面各种色素细胞的比例与分布也存在对应关系, 韦敏侠等(2015)研究发现, 橘色双冠丽鱼在黄色时期皮肤中的黄色素细胞和红色素细胞数量和分布比例增多, 黑色素细胞相对减少且处于凝集状态。在红鲫鱼发育过程中, *mitfa* 基因也呈现相同的表达趋势, 通过组织学观察发现, 红鲫鱼黑色素细胞数量随着其发育的进行逐渐减少, 体色由灰色逐渐过渡至红色, *mitfa* 表达量随之降低(Zhang *et al.*, 2017)。Liu 等(2015)检测了不同品系锦鲤中 *mitfa* 基因表达量, 发现含有黑色素细胞较多的, 体色偏白或偏黑的锦鲤 *mitfa* 表达量较高, 而含黑色素细胞较少的, 体色呈红白或全黄的锦鲤皮肤的 *mitfa* 表达量偏低, 表明 *mitfa* 表达量与黑色素细胞数量和分布比例呈正相关, 印证了 *mitfa* 基因对黑色素细胞发育和分布的重要作用, 本研究中 *mitf1* 和 *mitf2* 均属于 *mitfa*, 且也在黑色期表达量最高, 与此结果相对应。而且黄色时期橘色双冠丽鱼皮肤中可检测到 *mitfa* 基因的表达(Liu *et al.*, 2015), 可见其可能还参与调控其他色素细胞形成。

**3.2.3 *mitf* 基因在成鱼不同组织间的表达差异** *mitf1*、*mitf2* 亚型在橘色双冠丽鱼各组织中均有表达, 与 *mitf* 在青鳉中的表达趋势相类似(Li *et al.*, 2013a、b), 其中, 眼部表达量最高且显著高于其他组织, 表明 *mitf* 基因参与了橘色双冠丽鱼眼的发育调节。在哺乳动物中,

大量研究表明, *mitf* 基因的突变可能导致眼畸形的发生, 如小鼠眼畸形(Hertwig, 1942)、犬眼睛出现缺陷(Stritzel *et al.*, 2009)、牛眼睛变小(Wiedemar *et al.*, 2014)等均与 *mitf* 缺失有着密切关系, *mitf* 基因在哺乳动物眼睛发育中有着不可或缺的作用。脉络膜裂(CF)的闭合是眼睛发育的一个关键步骤, 研究显示, *mitf* 基因在颅神经嵴细胞中发挥作用, 促进脉络膜裂的闭合, 是眼睛正常发育必不可少的调节基因(Michael *et al.*, 2018)。但 Lane 等(2012)研究发现, 在具有 *mitfb* 基因突变的斑马鱼或 *mitfa*、*mitfb* 双基因突变的斑马鱼中, 其眼部发育正常, 与野生型斑马鱼无明显差异, 这一结果说明了 *mitf* 基因在斑马鱼眼睛发育过程中并非是必要的, 这一结论具有颠覆性。因此, *mitf* 基因在动物眼睛发育过程中是否为必需基因值得探讨, 但本研究中, *mitf1* 和 *mitf2* 均表现为眼部表达量最高, 仍然支持其在眼睛发育中起着必不可少的作用。

## 参 考 文 献

- ALTSCHMIED J, DELFGAAUW J, WILDE B, *et al.* Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish. *Genetics*, 2002, 161(1): 259–267
- BARLUENGA M, MEYER A. Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 326–326
- BAUER G L, PRAETORIUS C, BERGSTEINSDOTTIR K, *et al.* The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue. *Genetics*, 2009, 183(2): 581–594
- BENTLEY N J, EISEN T, GODING C R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 7996–8006
- COHEN M A, WERT K J, GOLDMANN J, *et al.* Human neural crest cells contribute to coat pigmentation in interspecies chimeras after in utero injection into mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(6): 1570–1575
- HAUSWIRTH R, HAASE B, BLATTER M, *et al.* Mutations in MITF and PAX3 cause “splashed white” and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genetics*, 2019, 15(8): e1002653
- HEMESATH T J, STEINGRIMSSON E, MCGILL G, *et al.* Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes and Development*, 1994, 8(22): 2770–2780
- HERSHEY C L, FISHER D E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-*J/mitf-J* isoform. *Gene*, 2005, 347(1): 73–82
- HERTWIG P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der

- Hausmaus. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 1942, 80(1): 220–246
- HOU L, PAVAN W J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: Do all roads lead to *mitf*. *Cell Research*, 2008, 18(12): 1163–1176
- JIANG Y L, SONG H M, LIU Y, *et al.* Cloning and analysis of TYR gene and its development stages and tissue expression in *Amphilophus citrinellus*. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(5): 697–707 [蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 橘色双冠丽鱼 TYR 基因的克隆及其发育时序和组织表达分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(5): 697–707]
- JIANG Y L. The development of body color of *Amphilophus citrinellus* and the cloning and analysis of body color-related gene TYR expression. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [蒋燕玲. 橘色双冠丽鱼体色发育变化及体色相关基因 TYR 的克隆与表达研究. 上海海洋大学硕士学位论文, 2016]
- KAUTT A F, ELMER K R, MEYER A. Genomic signatures of divergent selection and speciation patterns in a natural experiment, the young parallel radiations of Nicaraguan crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 2012, 21(19): 4770–4786
- KHALED M. Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 33690–33697
- KORBERG I B, SUNDSTROM E, MEADOWS J R S, *et al.* A simple repeat polymorphism in the MITF-M promoter is a key regulator of white spotting in dogs. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104363
- KUMASAKA M, SATO H, SATO S, *et al.* Isolation and developmental expression of *mitf* in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics*, 2010, 230(1): 107–113
- LANE B M, LISTER J A. Otx but not *mitf* transcription factors are required for zebrafish retinal pigment epithelium development. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49357
- LI M, ZHU F, HONG N, *et al.* Alternative transcription generates multiple *mitf* isoforms with different expression patterns and activities in medaka. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2013a, 27(1): 48–58
- LI M, ZHU F, HONG Y. Differential evolution of duplicated medaka fish *mitf* genes. *International Journal of Biological Sciences*, 2013b, 9(5): 496–508
- LIN R, LIN W, ZHOU S, *et al.* Integrated analysis of mRNA expression, CpG island methylation, and polymorphisms in the MITF gene in ducks (*Anas platyrhynchos*). *BioMed Research International*, 2019(3): 8512467
- LISTER J A, CAPPER A, ZENG Z Q, *et al.* A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(1): 133–140
- LISTER J A, ROBERTSON C P, LEPAGE T, *et al.* Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 1999, 126(17): 3757–3767
- LIU J H, WEN S, LUO C, *et al.* Involvement of the *mitfa* gene in the development of pigment cell in Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2775–2784
- MICHAEL H T, GRAFF-CHERRY C, CHIN S, *et al.* Partial rescue of ocular pigment cells and structure by inducible ectopic expression of *mitf*-M in MITF-deficient mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2018, 59(15): 6067–6073
- MINVIELLE F, BED'HOM B, COVILLE J L, *et al.* The “silver” Japanese quail and the MITF gene: Causal mutation, associated traits and homology with the “blue” chicken plumage. *BMC Genetics*, 2010, 11: 15
- MOCHII M, MAZAKI Y, MIZUNO N, *et al.* Role of *mitf* in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Developmental Biology*, 1998, 193(1): 47–62
- NAKAYAMA A, NGUYEN M T T, CHEN C C, *et al.* Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mechanisms of Development*, 1998, 70(1/2): 155–166
- NEWTON R A, ROBERTS D W, LEONARD J H, *et al.* Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways. *Peptides*, 2007, 28(12): 2387–2396
- PARK H Y, KOSMADAKI M, YAAR M, *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(9): 1493–1506
- SHI X Y, XU Y J, WU N N, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54]
- SHIOHARA M, SHIGEMURA T, SUZUKI T, *et al.* MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2008, 31(2): 215–226
- STEINGRIMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the Microphthalmia transcription factor network. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38(1): 365–411
- STRITZEL S, FRITSCHKE J, WOHLKE A, *et al.* Multiple ocular malformations in two sheepdogs homozygous for the merle mutation. Mutation analysis of the SILV gene and association study using MITF-associated markers. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*, 2009, 37(4): 229–238
- VOLKENING A, SANDSTEDTE B. Iridophores as a source of robustness in zebrafish stripes and variability in *Danio* patterns. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3231
- WANG Y, VIENNET C, ROBIN S, *et al.* Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *Journal of Dermatological Science*, 2017, 88(2): 159–166
- WEI M X, SONG H M, QI B L, *et al.* Pigment cells development and body color variation of postembryonic development in *Amphilophus citrinellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(1): 28–35 [韦敏侠, 宋红梅, 祁宝伦, 等. 橘色双冠丽鱼胚后色素细胞发育与体色变化. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(1): 28–35]
- WIEDEMAR N, DROEGEMUELLER C. A 19-Mb de novo deletion on BTA 22 including MITF leads to microphthalmia

- and the absence of pigmentation in a Holstein calf. *Animal Genetics*, 2014, 45(6): 868–870
- YAMADA T, AKAMATSU H, HASEGAWA S, *et al.* Melanocyte stem cells express receptors for canonical *Wnt*-signaling pathway on their surface. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(4): 837–842
- YU D D, LIU H J, GUAN J, *et al.* Early ontogeny of chromatophores and body color changes of *Acanthopagrus schlegelii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 1–7 [于道德, 刘洪军, 关健, 等. 黑棘鲷早期色素细胞发育与体色变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 1–7]
- ZHANG Y, LIU J, PENG L, *et al.* Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(5): 1387–1398

(编辑 冯小花)

## Structure and Expression Analysis of Body Color-Related *mitf* Gene in *Amphilophus citrinellus*

CHEN Xudong<sup>1,2</sup>, WU Guoqiang<sup>1,2</sup>, SONG Hongmei<sup>2①</sup>, WANG Xuejie<sup>2</sup>,  
MU Xidong<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>, LIU Chao<sup>2</sup>, HU Yinchang<sup>2</sup>

- (1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;  
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Leisure Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Modern Leisure Fisheries Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

**Abstract** Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is a transcription factor with a typical basic helix-loop-helix-leucine zipper structure. It is a key transcription factor in the melanin synthesis pathway in animals by activating downstream genes to initiate melanin synthesis. In order to explore the regulatory action of *mitf* during body color variation in *Amphilophus citrinellus*, the full-length cDNA of the *mitf* gene was cloned using the rapid amplification of cDNA ends technique, and the difference in gene expression in different developmental stages of embryos, different stages of body melanin, and various tissues in *A. citrinellus* were analyzed through qRT-PCR. Two mutant sequences of *mitf* were obtained. The full-length of *mitf1* cDNA was 1816 bp, including a 158 bp 5'UTR, a 428 bp 3'UTR, and a 1230 bp ORF coding a polypeptide of 409 amino acids. The full-length of *mitf2* cDNA was 1638 bp, including a 160 bp 5' UTR, a 428 bp 3'UTR, and a 1050 bp ORF coding a polypeptide of 349 amino acids. The analysis of the homology and phylogenetic tree results showed that *mitf1* and *mitf2* clustered into a small branch in the phylogenetic tree, which had the highest homology with Cichlidae fish and low homology with mammals. The results of the qRT-PCR showed that *mitf1* and *mitf2* were expressed to varying degrees in various tissues of adult fish, among which the expression in the eyes was the highest and was significantly higher than in other tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression in muscle, brain, and kidney tissue was also higher. The *mitf1* and *mitf2* genes were expressed in all stages of embryonic development, and the expression level was highest in the cleavage stage, which was significantly higher than the other embryonic stages. With the body color transition from black to orange, the expression of *mitf1* and *mitf2* genes decreased gradually in the fish skin, scales, and tail fins. It showed that the expression of *mitf* was positively correlated with changes in body color from black to yellow in *A. citrinellus*, which may be related to the dynamic change in the differentiation and distribution ratio of pigment cells in the body color development stage of fish. Through understanding the molecular basis of fish body color development and variation, this study accumulates data for fish pigment cell development and the artificial improvement of fish body color.

**Key words** *Amphilophus citrinellus*; *mitf*; qRT-PCR; Melanocyte

① Corresponding author: SONG Hongmei, E-mail: shm1227@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210107002

http://www.yykxjz.cn/

邝杰华, 马骞, 陈刚, 毛非凡, 周启苓, 黄建盛, 施钢, 张健东. 军曹鱼 *dnd* 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 119-128  
KUANG J H, MA Q, CHEN G, MAO F F, ZHOU Q L, HUANG J S, SHI G, ZHANG J D. Cloning and expression analysis of *dnd* during annual gonadal development of cobia (*Rachycentron canadum*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 119-128

# 军曹鱼 *dnd* 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达\*



邝杰华<sup>1</sup> 马骞<sup>1,2①</sup> 陈刚<sup>1,2①</sup> 毛非凡<sup>1</sup>  
周启苓<sup>1</sup> 黄建盛<sup>1,2</sup> 施钢<sup>1</sup> 张健东<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524025;  
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江) 广东 湛江 524025)

**摘要** 本研究通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了军曹鱼(*Rachycentron canadum*) *dnd* 基因(*Rcdnd*)的 cDNA 序列, 全长 1339 bp, 其中, 5'非编码区 59 bp, 3'非编码区 173 bp, 开放阅读框(ORF) 1107 bp, 共编码 368 个氨基酸。*Rcdnd* 氨基酸序列含有 1 段 RNA 识别保守基序(RRM)以及 4 个 C 端保守结构域(CR1~4), 与高体鲷(*Seriola dumerili*) *dnd* 的一致性最高(72.3%)。系统进化分析表明, *Rcdnd* 与高体鲷的同源蛋白亲缘关系最接近。基于半定量 RT-PCR 的组织表达分布分析结果显示, *Rcdnd* 在性腺中特异表达, 在其他组织中均无表达。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果显示, 在精巢发育过程(II~V 期), *Rcdnd* 的表达水平呈逐渐上升趋势; 在卵巢发育过程(I~III 期), *Rcdnd* 的表达水平先显著升高后趋于稳定, 在 150 dph (II 期)时的表达量最高。原位杂交结果显示, 不同发育时期性腺组织中, *Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达。在精巢中, *Rcdnd* mRNA 集中表达于精原细胞和初级精母细胞的周缘, 次级精母细胞中的杂交信号明显减弱, 而精细胞和成熟精子中几乎检测不到杂交信号。在卵巢中, *Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达最强, 在初级卵母细胞中的表达较弱, 其中, I、II 和 III 时相卵母细胞检测到的杂交信号强度无显著差异, 且杂交信号均匀分布于细胞质中。研究结果表明, *Rcdnd* 基因可能参与军曹鱼性腺发育过程, 上述结果可为揭示军曹鱼两性生殖细胞发生发育的调控机理提供理论依据。

**关键词** 军曹鱼; *dnd*; 基因克隆; 性腺发育; 表达分析

**中图分类号** Q785; S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0119-10

*dnd* 基因最初鉴定于斑马鱼(*Danio rerio*)中 (Weidinger *et al*, 2003), 可编码一种进化上保守的 RNA 结合蛋白, 作为脊椎动物生殖质的重要组成部分之一, 特异表达于生殖系细胞中, 并在生殖细胞的发生

\* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系专项资金、南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)(ZJW-2019-06)和广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022)共同资助 [This work was funded by China Agriculture Research System of MOF and MARA, Fund of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang) (ZJW-2019-06), and Program for Scientific Research Start-up Funds of Guangdong Ocean University (R19022)]. 邝杰华, E-mail: 3242864479@qq.com

① 通讯作者: 马骞, 副研究员, E-mail: maq@gdou.edu.cn; 陈刚, 教授, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

收稿日期: 2021-01-07, 收修稿日期: 2021-02-05

及发育过程中发挥着重要作用(Gross-Thebing *et al.*, 2017)。基于此特性, *dnd* 基因常作为分子标记物, 广泛应用于鱼类生殖细胞的相关研究(程琳等, 2020)。目前, 已在多种脊椎动物中克隆和鉴定出 *dnd* 的同源基因, 包括小鼠(*Mus musculus*) (Bhattacharya *et al.*, 2007)、红原鸡(*Gallus gallus*) (Aramaki *et al.*, 2009)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (Horvay *et al.*, 2006)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*) (Škugor *et al.*, 2014)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Wargelius *et al.*, 2016)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Fujimoto *et al.*, 2010)、银鲫(*Carassius gibelio*) (Li *et al.*, 2016)等。

据报道, *dnd* 基因的表达模式在不同物种中存在明显的差异, 如 *dnd* 基因仅在小鼠精巢中特异表达(Bhattacharya *et al.*, 2007); 在非洲爪蟾中, *dnd* 基因则特异表达于卵巢(Horvay *et al.*, 2006); 而大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (陈仕海等, 2015)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (Lin *et al.*, 2013)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Wang *et al.*, 2015) *dnd* 基因均在性腺中特异表达, 但在卵巢中的表达水平要高于精巢。关于 *dnd* 基因功能方面, 小鼠 *dnd* 基因发生突变后, 将抑制原始生殖细胞(PGCs)的产生, 导致部分特定遗传背景的个体产生睾丸生殖细胞瘤(Youngren *et al.*, 2005); 抑制非洲爪蟾胚胎发育时期 *dnd* 基因的表达将直接导致其 PGCs 的缺失(Horvay *et al.*, 2006); 敲除斑马鱼 *dnd* 基因可引起 PGCs 的迁移发生异常, 随后凋亡, 部分雌性个体甚至出现性逆转的现象(Weidinger *et al.*, 2003)。以上研究结果表明, *dnd* 基因在 PGCs 发生、迁移及性别分化中发挥着重要的调节作用。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)隶属鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron*), 为广盐暖水性海水鱼类, 俗称海鲷、海龙鱼, 广泛分布于热带和亚热带海域(东太平洋除外)(Castellanos-Galindo *et al.*, 2016), 在中国南海部分海域亦有少量分布(陈刚等, 2004)。由于军曹鱼具有生长速率快、易于驯化、抗病力强、肉厚质地细腻等特点(Hamilton *et al.*, 2013), 近年来在南方沿海地区的养殖发展迅猛, 随着人工繁殖和大规模育苗技术的突破, 军曹鱼已成为我国极具前景的海水网箱养殖鱼类之一。

本研究克隆分析军曹鱼 *dnd* (*Rcdnd*)基因 cDNA 全长序列, 利用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 *Rcdnd* 的组织表达分布及其在不同发育期性腺组织中的表达水平, 利用原位杂交技术初步分析 *Rcdnd* mRNA 在配子形成过程中的表达定位分布, 旨在从分子水平阐明 *dnd* 基因在军曹鱼配子

发生过程中的作用, 同时也为进一步研究鱼类 PGCs 发生、迁移和分化的分子机理提供基础理论资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

实验用军曹鱼于 2019 年 6 月—2020 年 4 月采自广东省茂名市电白县某室内养殖基地, 军曹鱼幼鱼饲养于直径 9 m、水深 2.5 m 的金属圆形水池内, 流水充气, 养殖盐度 27.0~30.5, 温度 25.0℃~30.0℃, 分别对 90、120、150、185、210 和 360 dph 体质良好的军曹鱼进行采样, 其中, 实验用雌鱼共 23 尾, 体重 215.0~5050.0 g, 体长 29.8~68.5 cm; 雄鱼共 18 尾, 体重 230.0~4225.0 g, 体长 29.2~64.5 cm。

对随机采集的军曹鱼活体进行形态学指标的测量, 随后立即解剖, 取出性腺, 鉴定其性别, 将同一尾鱼的两叶性腺分开保存, 其中一叶性腺于 4℃在 RNA Later 中静置过夜, 最后转移至-80℃超低温冰箱保存, 用于 qRT-PCR 实验; 另外一叶性腺从中间剪为两段, 分别放入 4%多聚甲醛(PFA)中, 固定 24 h 后转入焦碳酸二乙酯(DEPC)配制的 70%乙醇中, 用于切片原位杂交实验。此外, 选取 150 dph 军曹鱼雌雄各 1 尾, 将其脑、肌肉、鳃、肝、肠、胃、脾、体肾、心、皮肤、眼睛、精巢和卵巢分离, 经 DEPC 水冲洗后放入 RNA Later 中, -80℃保存待用。

### 1.2 *Rcdnd* 基因全长 cDNA 的克隆

将采集的军曹鱼卵巢放入液氮中研磨, 采用 Trizol 法(Invitrogen)提取总 RNA。通过 SimpliNano 超微量核酸蛋白测定仪检测总 RNA 的浓度和纯度, 并以 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。参考 EasyScript One-step cDNA Synthesis 试剂盒(TransGen)说明书, 将 2 μg 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA, 另取 2 μg 总 RNA, 按照 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'试剂盒(Clontech)说明书, 合成 5'/3' RACE-Ready cDNA。

从课题组前期获得的军曹鱼全基因组数据库(暂未上传至 NCBI 数据库)中提取 *dnd* 基因的 CDS 序列信息, 分别在序列两端设计上下游特异性引物 *Rcdnd*-F 和 *Rcdnd*-R(表 1), PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 67℃ 30 s, 72℃ 1 min 20 s, 共 35 个循环; 72℃ 10 min, PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 确定为目的片段后用胶回收试剂盒(TransGen)纯化回收, 并将纯化产物连接到 pMD-18T (TaKaRa)载体, 进而转化至 DH-5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选挑取单克隆阳性菌落由生工生物工程(上海)股份有



限公司测序。根据测序片段, 分别在靠近序列 5'和 3'末端各设计 2 条 RACE 引物 Rcdnd 5'-R1/R2 和 Rcdnd 3'-F1/F2 (表 1), 采用巢式 PCR 获取 *Rcdnd* 基因 5'和 3'末端序列。

使用 NCBI 数据库上的 BLASTP 对克隆所得 *Rcdnd* 氨基酸序列进行比对, 下载其他硬骨鱼类及高等脊椎动物的 *dnd* 氨基酸序列, 利用 GenDoc 进行氨基酸序列多重比对分析。利用 MEGA 5.0 软件, 以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统进化树, 针对进化树各分支结点均进行 1000 次重复计算检验。

### 1.3 *Rcvasa* 基因在各组织及性腺发育过程中的表达

通过组织学观察并参照国内学者(刘筠, 1993)对鱼类性腺的分期方法, 依据性腺中生殖细胞的种类、成熟度、数量占比及排列方式进行发育分期的划分, 提取不同发育时期军曹鱼的性腺以及 150 dph 军曹鱼个体各组织的总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。基于测序获得的 *Rcdnd* 基因序列, 设计一对特异性扩增引物 Rcdnd-F1/R1, 并以军曹鱼  $\beta$ -actin 作为内参基因(表 1)。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 20 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳检测 *Rcdnd* 在不同组织中的半

定量 RT-PCR 结果, 利用 Tanon 4100 凝胶成像系统采集图像。qRT-PCR 实验流程按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作, 使用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪检测 *Rcdnd* 在不同发育时期精巢和卵巢中的表达, 每个实验样品设置 3 个重复。根据测得的 *Ct* 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法(Schmittgen *et al*, 2008)计算 *Rcdnd* 的相对表达量。所得数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD,  $n=3$ )表示, 利用统计学软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Duncan's 多重比较,  $P<0.05$  表示有显著性差异。

### 1.4 性腺组织原位杂交

根据已获得的 *Rcdnd* 基因序列, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计具有特异性的寡核苷酸探针序列(表 1), 探针的 5'和 3'端用地高辛(DIG)标记, 由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。

将石蜡包埋的 120、210 和 360 dph 军曹鱼精巢和卵巢样品进行组织切片(5~6  $\mu$ m), 具体杂交过程综合参考相关研究中的方法(李晓妮等, 2017; 史宝等, 2017)。滴加 BCIP/NBT 显色液进行化学显色, 显微观察阳性后再滴加核固红染核, 中性树胶封片, 最后显微镜检, 采集图像分析。

表 1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
Rcdnd-F	ATGGAGGACGAGCAGAACCAGGT	CDS 序列克隆 CDS sequence cloning
Rcdnd-R	TCAAAATAGGCTGTCATGGGAGGGT	
Rcdnd3'-F1	ATTGGAGACCTGCCAGTTGC	3'末端序列克隆 3' RACE
Rcdnd3'-F2	GATGGATTCTCTACTTCACCTACA	
Rcdnd5'-R1	CTTGATTGAGATGGTCAGAGCA	5'末端序列克隆 5' RACE
Rcdnd5'-R2	CTGTATTTGGCATAGGCCGAAGC	
Rcdnd-F1	GAACCGTGGCTTCGCCTATG	PCR 扩增 PCR amplification
Rcdnd-R1	AGACACTCTCTCCACCCCGT	
$\beta$ -actin-F	AGGGAATGTGCGTGAC	内参基因 Internal control gene
$\beta$ -actin-R	AGGCAGCTCGTAGCTCTT	
Rcdnd-Pro	GGTTGTTTTTCAGCCAGGATTCCAGTGCC	原位杂交探针 Probe of CISH

## 2 结果与分析

### 2.1 *Rcdnd* cDNA 全长及序列分析

实验克隆所得的 *Rcdnd* 序列全长 1339 bp, 其中, 5'非编码区 59 bp, 3'非编码区 173 bp, 开放阅读框(ORF) 1107 bp, 共编码 368 个氨基酸, 已提交 NCBI GenBank (登录号: MW436697); 预测的编码蛋白的分子质量为 40.36 kDa, 等电点(pI)为 6.30。蛋白结构域

预测结果显示, 在推导的 *Rcdnd* 氨基酸序列中, 42~114 aa 为一段 RNA 结合蛋白保守的 RNA 识别序列(RRM) (图 1)。此外, 通过氨基酸序列多重比对分析发现, *Rcdnd* 氨基酸序列还具有 4 个 C 端保守结构域(CR1~4), 同时发现, 军曹鱼 *dnd* 氨基酸序列与鲮科(Carangidae)鱼类的一致性最高, 如高体鲮(*Seriola dumerili*)和黄条鲮(*Seriola lalandi*)分别达 72.3%和 71.8%, 与哺乳类的一致性较低, 如小鼠仅为 28.2% (图 2)。

```

1   AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGCGCCGCGAACACGGTATCGTGGAACTGATGGAGGACGAGCAGAACCAGGTGCTGAACCTTGAGCGTGTGACGGCACTGGAAATCTGG
1   M E D E Q N Q V L N L E R V Q A L E I L
121 CTGAAAACAACCAACACAAAGCTTACACAATATGGGATGGTCCCTGTCCCAGGAACCCACTGTGAGGTCTTCATCAATCAGATCCCACGGGACACCTACGAGGACCTGCTGATCCCCTGT
21  A E N N Q H K A Y T I W D G P V P G T H C E V F I N Q I P R D T Y E D L L I P L
241 TTAGTCAGTGGGCCACTCTGGGAGTTCAGGCTCATGATGAACCTCAGTGGCCAGAACCCTGGCTTCGCCTATGCCAAATACAGCTCATCTGGGGTAGCTGCTGACGCAATCCGCTGC
61  F S S V G P L W E F R L M M N F S G Q N R G F A Y A K Y S S S G V A A D A I R L
361 TGCATGGACACATGCTGGAGCTGGCTTCCACCTCAGCGTCCGACGAGTACGGAGAAGAGACACCTCTGTATTGGAGACTGCCAGTGGCCACCAGGCAAGAGGACCTACTGCAGTAA
101 L H G H M L E P G F H L S V R R S T E K R H L C I G D L P V A T R Q E D L L Q V
481 TGAGTGTGCTGGCCGACGGGTGGAGAGTGTCTCTGAAGGCAGAGGCTGGTATAGAAGGGGTGTCTGTATAGTGGCCTTCTCATCCCACCATGCTGCTTCTATAGCCAAGAAGATGC
141 M S V L A D G V E R V S L K A E A G I E G V S A I V A F S S H H A A S I A K K M
601 TGGTGAAGTATTCAAGAAGCAGTTTGTCTGACCATCTCAATCAAGTGGCATTACCTGTGACCTCAAGCTCTGATGAGCCACTGCCTCCACATAAACCTTCAAAGAGCCTCTGATGT
181 L V E V F K K Q F A L T I S I K W H S P V T S S S D E P L P P H K P S K S L L M
721 CACCTCTGAAGCCGTTCACCTCCTGAATGCTCAATGGGCCAGTCCCTGCCTCCTCATCTCACCATTATCCATCCATCTCCAGGGTTTCTGCAAGCAGTGGGGGACCAGCTGTAC
221 S P L K P L H L L N A Q W A P V L P P H L T I H P S I S Q G F C Q A V G G P A V
841 CTCCTGTCTCCACCTTGTCTCTTTGGGGCAGTGGTTACTGTAGTGTCCCAACATGGTCTGCAGAGACTGTGTGAGGCGTCTGGGGTCGGCCAGCCACTCTATGAGATCTGCT
261 P P C S S T L S S L G Q L V T V V S P T M V L Q R L C E A S G V G Q P L Y E I C
961 ACAGCCACTGGCCAGATGGATTCTCTACTTACCTACATGATGGTTGTGTCCTAGGGTGTGGAGCCCTCAGAGGGTGGTTCATGCTTACCTGGACCCACTGCCACCAGCAGCG
301 Y S H T G P D G F L Y F T Y M V C V P R V M E P F R G L V M V L P G P T A T S T
1081 TGGAGGAGCTCAGCAGTGCAGCCAGCAGGCTCAGAGGGTTCAGAGTAACTCTCACCCTCCCATGACAGCCTATTTGAAAATGATGTACTATCCCAAGTGTGATTGAAA
341 L E E A Q Q V A A Q Q V L Q R V Q S K L S P S H D S L F *
1201 TGTAGTTGATTTTGCATGTTTTATTATAGTCCATTGGACTGTATTGTTCTGTGGTTGCATGCTTTTGTGTTGATTGGTTCCTCATTTTAATTTAATGAGTAATAGGAAAAAAAAA
1321 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 军曹鱼 *dnd* cDNA 全长序列和氨基酸序列分析

Fig.1 Complete sequence of *R. canadum dnd* and analysis of deduced amino acid sequence

下划线指示起始密码子和终止密码子，粗体斜体指示加尾信号，灰色阴影指示 RRM 识别基序

The initiation codon ATG and stop codon TAA are underlined. The polyadenylation signal AATTTAA are in bold and italic.

The RNA recognition motif (RRM) are highlighted in grey shadow

基于军曹鱼与 GenBank 数据库中已发表的其他物种 *dnd* 氨基酸序列所构建的系统进化树中(图 3)，硬骨鱼类均聚为一簇，而两栖类、鸟类和哺乳类等高等脊椎动物则聚为另一簇，其中，军曹鱼与高体鲷、蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)和大菱鲆的亲缘关系较近，最先聚为一支，随后进一步与鲈形目、鲑形目、鲉形目和鲂形目等分支聚为一簇。

## 2.2 *Rcdnd* 的组织表达模式

采用半定量 RT-PCR 检测了 *Rcdnd* 在 150 dph 军曹鱼各组织中的表达水平，结果表明，*Rcdnd* 在性腺中特异表达，且卵巢和精巢中均检测到较高的表达水平，在性腺外的其他组织中均无表达(图 4)。

## 2.3 *Rcdnd* 在性腺周年发育过程中的表达模式

在精巢发育过程中，*Rcdnd* 的表达水平呈逐渐上升趋势，其在 90 dph (II期)的表达量最低，120 dph (II~III期)时表达量无显著变化，而在 150 dph (III期)~

360 dph (V期)的表达量均出现显著升高，其中，185 dph (III期)时表达量上升至 90 dph 的 2.68 倍，210 dph (IV期)的表达量与 185 dph (III期)无显著差异，而 360 dph (V期)时表达量进一步显著升高并达到最大值，约为 90 dph 的 3.33 倍(图 5A)。

卵巢发育过程中，*Rcdnd* 的表达水平先显著升高后趋于平稳，90 dph (I期)时的表达量最低，随后在 120 dph (I~II期)~360 dph (III期)的表达量均显著高于 90 dph，其中，150 dph 表达量上升至最大值，约为 90 dph 的 2.25 倍，185 dph (II期)和 210 dph (II期)的表达量均较 150 dph 显著降低，而 185、210 和 360 dph 发育时间点的相对表达量无显著差异(图 5B)。

## 2.4 *Rcdnd* 在性腺发育过程中的表达定位

利用切片原位杂交技术检测 *Rcdnd* mRNA 在军曹鱼不同发育期性腺中的表达定位，结果显示，120 dph 军曹鱼的精巢中，*Rcdnd* mRNA 的杂交信号主要分布于精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞

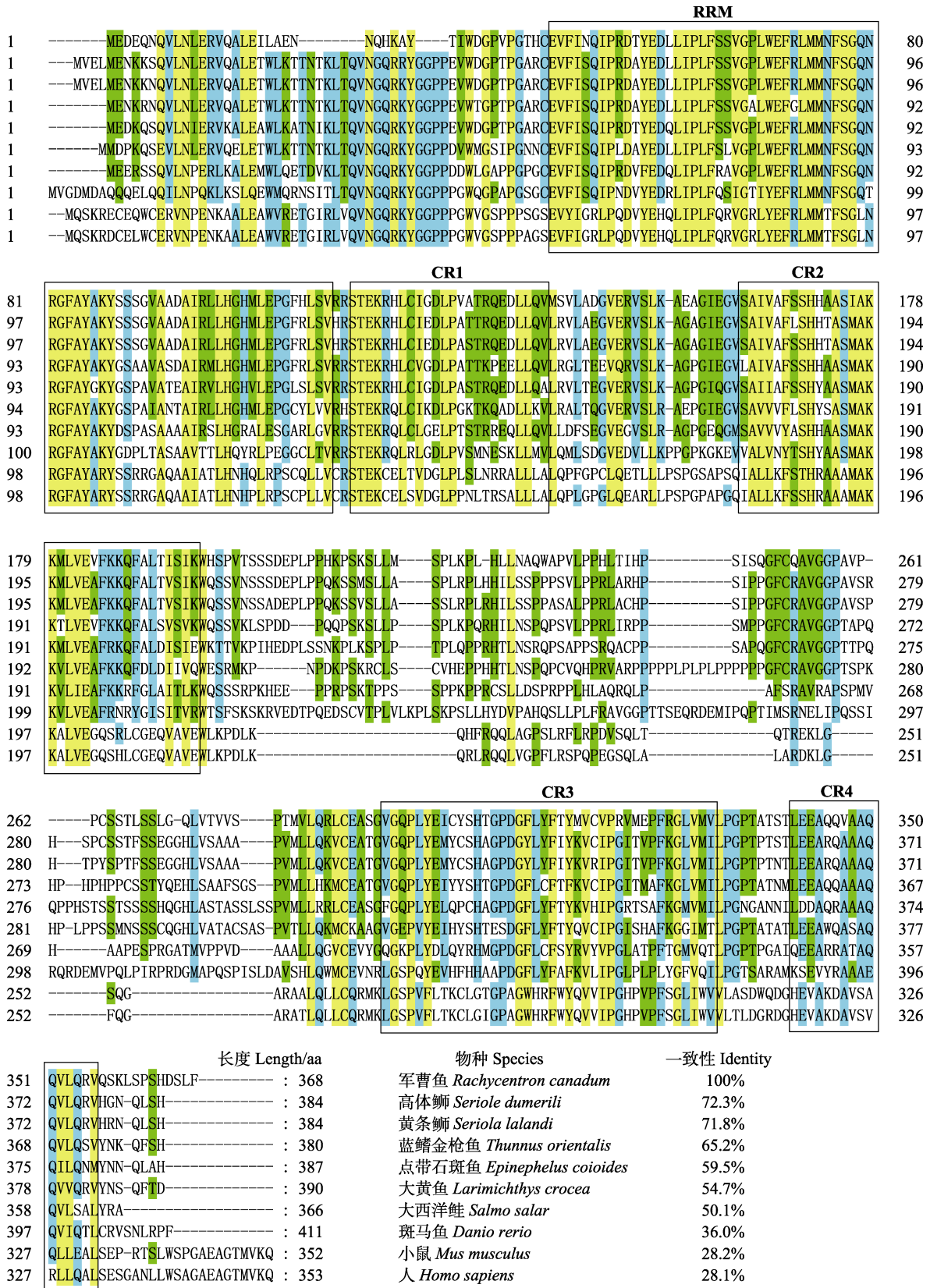


图 2 军曹鱼 *dnd* 氨基酸序列的多重比对

Fig.2 Multiple alignment of *R. canadum dnd* deduced amino acid sequence

方框表示 5 个氨基酸特异性保守结构域

The frame regions indicate the five amino acid specific conserved regions

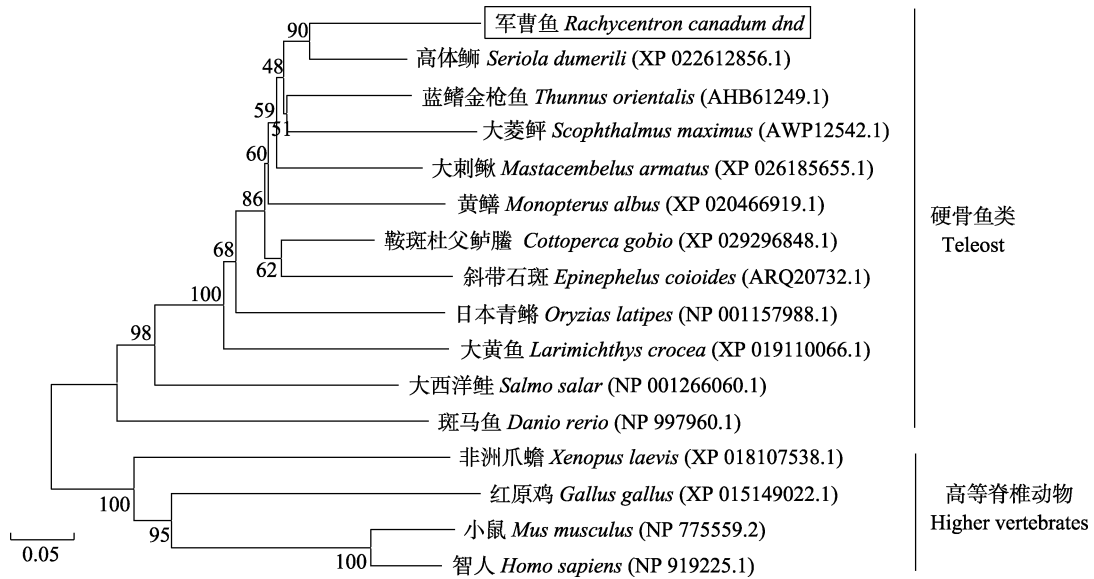


图 3 基于 *dnd* 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 树)

Fig.3 Phylogenetic tree of *dnd* amino acid sequences based on neighbor-joining (NJ) method

Bootstrap 检验的重复次数为 1000 次, 标尺 0.05 为进化距离

The tree is based on a 1000 bootstrap procedure, the scale bar 0.05 in terms of genetic distance is indicated below the tree

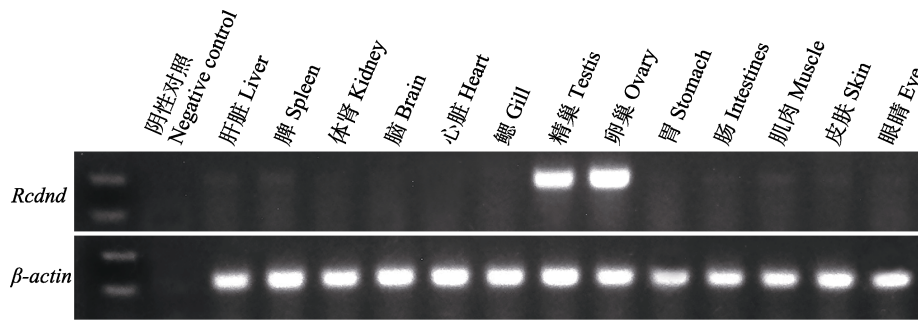


图 4 RT-PCR 分析 *Rcdnd* 在军曹鱼不同组织中的表达

Fig.4 Tissue distribution of *dnd* expression in *R. canadum* by RT-PCR

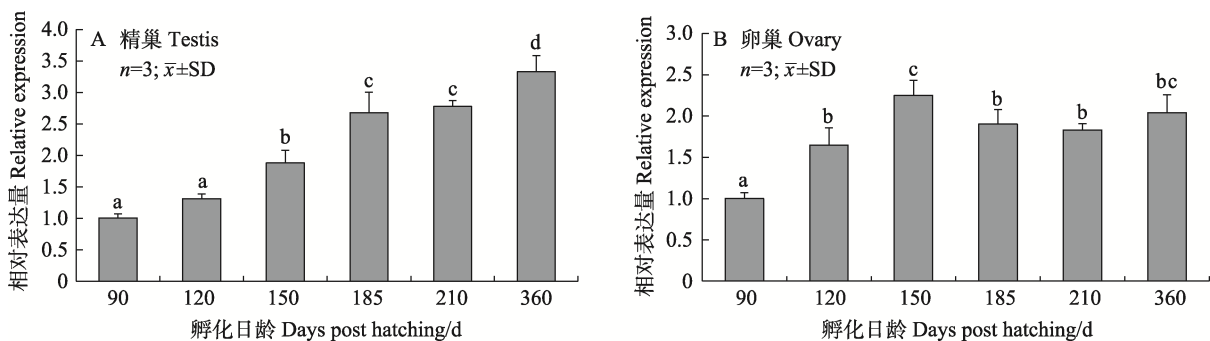


图 5 军曹鱼性腺周年发育过程中 *Rcdnd* mRNA 的表达水平

Fig.5 *Rcdnd* mRNA expression level in annual gonadal development of *R. canadum*

上标不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

的周缘, 其中, 在精原细胞和初级精母细胞中检测到的杂交信号最强, 次级精母细胞中的杂交信号明显减

弱, 而精细胞中几乎检测不到杂交信号(图 6A1)。 *Rcdnd* mRNA 在 210 dph 和 360 dph 军曹鱼精巢中的



表达定位模式与 120 dph 相似, 杂交信号主要分布于精子形成过程中的精原细胞和精母细胞, 在精细胞和成熟精子中的表达极其微弱(图 6B1、C1)。

在卵巢发育过程中, *Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达, 杂交信号均匀分布于细胞质及核仁内。*Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达最强, 而在初级卵母细胞中的表达相对较弱, 且随着卵母细胞的生长发育, 在第 I、II 和 III 时相卵母细胞中检测到的杂交信号强度无明显变化(图 6A1、B1 和 C1)。

### 3 讨论

本研究首次克隆了军曹鱼 *dnd* 基因的 cDNA 序列, 其全长为 1339 bp, 编码 368 个氨基酸, 推导的氨基酸序列与鲈科鱼类的一致性较高, 和高体鲈相比为 72.3%, 与已报道的大多数硬骨鱼类 *dnd* 蛋白一样具有典型的 RNA 识别基序(RRM)及 4 个 C 端保守区(CR1~4)(Lin *et al*, 2013; Wang *et al*, 2015; Yang *et al*, 2015); 通过构建系统进化树发现, 军曹鱼 *dnd* 属于

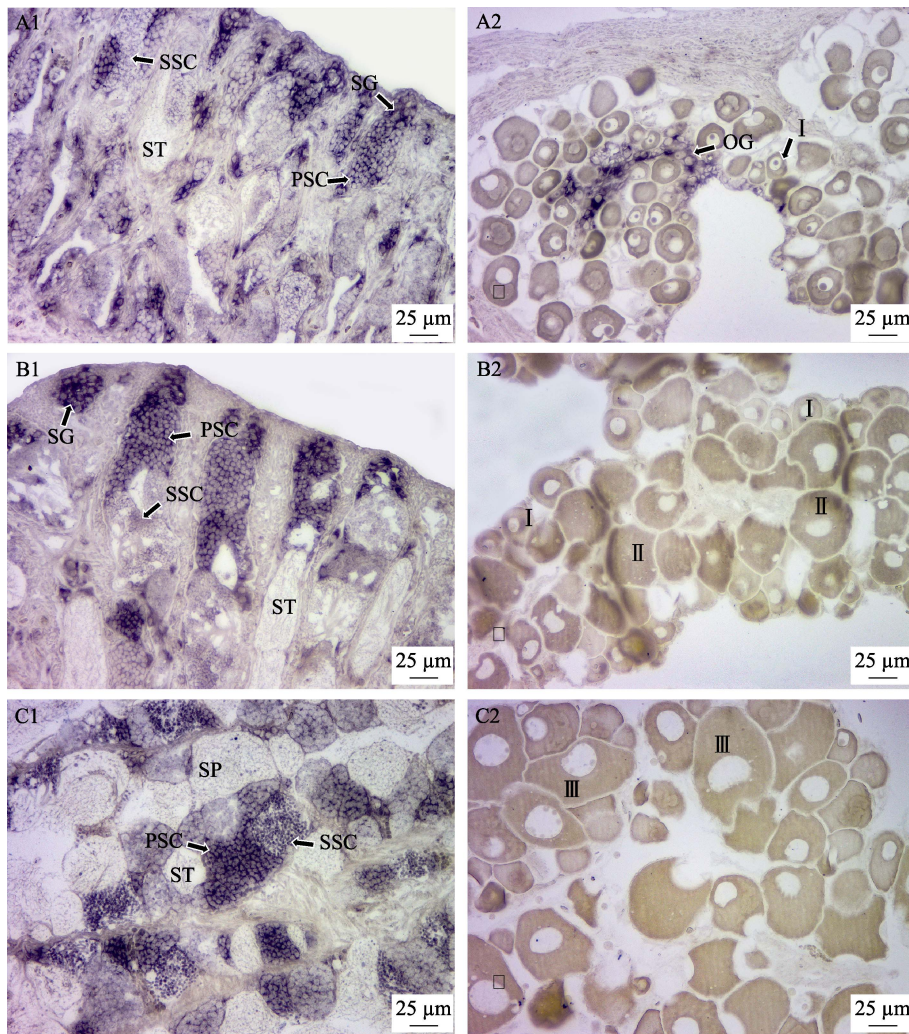


图 6 原位杂交法分析不同发育期性腺中 *Rcdnd* mRNA 的定位

Fig.6 Distribution of *Rcdnd* mRNA in different developmental stages of gonads by chemical *in situ* hybridization (CISH)

A1、B1 和 C1: 120 dph、210 dph 和 360 dph 精巢切片;

A2、B2 和 C2: 120 dph、210 dph 和 360 dph 卵巢切片

SG: 精原细胞; PSC: 初级精母细胞; SSC: 次级精母细胞; ST: 精细胞; SP: 精子; OG: 卵原细胞;

I: 第 I 时相卵母细胞; II: 第 II 时相卵母细胞; III: 第 III 时相卵母细胞

A1, B1 and C1: Sections of testis at 120 dph, 210 dph and 360 dph;

A2, B2 and C2: Sections of ovary at 120 dph, 210 dph and 360 dph

SG: Spermatogonia; PSC: Primary spermatocyte; SSC: Secondary spermatocyte; ST: Spermatid; SP: Spermatozoa;

OG: Oogonium; I: Oocyte at Stage I; II: Oocyte at Stage II; III: Oocyte at Stage II



硬骨鱼类的进化分支,与高体鲮的亲缘关系最为接近。据此,本研究克隆的 *Rcdnd* 属于 *dnd* 同源基因,尽管与其他物种 *dnd* 基因相比, *Rcdnd* 在进化过程中发生较大的结构变化,但仍保留了一定的保守性功能结构,推测其在维持 *dnd* 基因的功能稳定性上起到关键作用(Hong *et al.*, 2016)。

基于半定量 RT-PCR 的组织表达分析结果显示, *Rcdnd* 基因在精巢和卵巢中特异表达,这与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)、牙鲈(Wang *et al.*, 2015)、微鲤(*Paedocypris progenetica*) (陈克让等, 2018)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Jin *et al.*, 2019)、稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*) (Duan *et al.*, 2015)、蓝鳍金枪鱼(Yazawa *et al.*, 2013)等硬骨鱼类中的研究结果一致,由此推测, *Rcdnd* 基因可能参与调节军曹鱼性腺发育过程。

本研究采集的军曹鱼精巢样品包含了性腺发育分期的 II~V 期,其中, 90 dph 时,精巢处于精母细胞增长期(II 期); 120 dph 时,精巢处于 II~III 期; 150 dph 和 185 dph 时,精巢均处于精母细胞成熟期(III 期),而 210 和 360 dph 精巢分别处于精子细胞变态期(IV 期)和精子成熟期(V 期)。这些样品中, *Rcdnd* 的表达量随着精巢的发育呈逐渐上升趋势,在精子成熟期达到最大值,表明 *Rcdnd* 在军曹鱼精子发生过程中发挥一定的调控作用,这与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)和蓝鳍金枪鱼(Yazawa *et al.*, 2013)的研究结果相似。采集的卵巢样品包含 3 个发育分期,其中, 90 dph 卵巢属于卵原细胞增殖期(I 期), 120 dph 卵巢处于 I~II 期, 150、185 和 210 dph 卵巢均属于卵母细胞小生长期(II 期), 360 dph 卵巢发育至初级卵母细胞大生长期(III 期)。*Rcdnd* 表达量在卵原细胞增殖期最低,随着卵巢的发育, *Rcdnd* 表达量显著升高并趋于稳定,卵巢由 I 期发育至 III 期的过程中,卵母细胞通过积累糖类、蛋白质、核酸等原生质,细胞体积不断增大(Nishimura *et al.*, 2014),因此, *Rcdnd* 在卵巢发育过程中较高的表达水平可能与生殖细胞原生质的积累密切相关。此外,大菱鲂卵巢发育过程中, *dnd* 基因的表达量在由 I 期发育至 II 期时出现显著的升高,但随着卵巢进一步发育至 III、IV 期,其表达量呈下降趋势(Lin *et al.*, 2013),这与 *dnd* 基因在军曹鱼卵巢发育过程中的表达模式存在一定差异,由此推测, *dnd* 基因在卵巢发育过程中的表达模式存在物种差异性。

性腺切片原位杂交结果进一步证实, *Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达,而在性腺体细胞中的表达极微弱。*Rcdnd* mRNA 在精巢发育过程中的表达定位与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)、稀有鮎鲫(Duan *et al.*,

2015)和青鳉(Liu *et al.*, 2009)相似, *Rcdnd* mRNA 杂交信号主要分布于精原细胞和初级精母细胞的周缘,次级精母细胞中的杂交信号明显减弱,而精细胞和成熟精子中几乎检测不到杂交信号。据此推测, *Rcdnd* 基因可能在精子发生早期(如精原细胞向初级精母细胞转化的过程)具有重要作用,但在后期精细胞发育和成熟过程中的作用不显著。卵巢发育过程中, *Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达较强,卵母细胞中杂交信号均匀分布于细胞质和核仁,在第 I、II 和 III 时相卵母细胞间的杂交信号强度无明显变化;卵母细胞发育至第 III 时相后,细胞质内开始沉积卵黄(刘晨斌等, 2019),表明 *Rcdnd* 基因主要在卵黄形成前期尤其是卵原细胞向初级卵母细胞分化阶段发挥调节作用。然而,大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)和牙鲈(Wang *et al.*, 2015) *dnd* mRNA 在卵原细胞和第 I 时相卵母细胞中的表达较弱,当卵母细胞发育至第 II 时相, *dnd* mRNA 的表达也达到最强,而第 III 时相卵母细胞中的杂交信号明显减弱,随着卵母细胞进一步发育至第 IV 时相后,几乎检测不到杂交信号。据此推测, *dnd* 基因在鱼类卵子形成过程中发挥作用的时期存在明显的种间差异。已有研究表明,卵质内卵黄的大量积累可导致 RNA 转录速度减慢(张红卫等, 2006),本研究未采集到 III 期早期之后的卵巢样本,因此,关于 *Rcdnd* mRNA 在卵巢发育晚期(卵黄充塞阶段卵母细胞)中的表达仍有待进一步探究。

## 参 考 文 献

- ARAMAKI S, KUBOTA K, SOH T, *et al.* Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55(2): 214-218
- BHATTACHARYA C, AGGARWAL S, ZHU R, *et al.* The mouse *dead end* gene isoform  $\alpha$  is necessary for germ cell and embryonic viability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355(1): 194-199
- CASTELLANOS-GALINDO G A, BAOS R, ZAPATA L A. Mariculture-induced introduction of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), a large predatory fish, in the tropical eastern Pacific. *BioInvasions Records*, 2016, 5(1): 55-58
- CHEN G, ZHANG J D, YE N, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum*( I ). *Scientific Fish Farming*, 2004(1): 10-11 [陈刚, 张健东, 叶宁, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(上). *科学养鱼*, 2004(1): 10-11]
- CHEN K R, DING T Y, LI M Y. Cloning and expression analysis of *dazl* and *dnd* genes in minifish. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(7): 2795-2803 [陈克让, 丁天宜, 李名

- 友. Minifish *dazl* 和 *dnd* 基因的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2795–2803]
- CHEN S H, CAI M Y, ZHANG Z P, *et al.* Preliminary studies on specification and development of the primordial germ cells from large yellowcroaker by *dnd* gene. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(9): 1273–1282 [陈仕海, 蔡明夷, 张子平, 等. 基于 *dnd* 基因标记的大黄鱼原始生殖细胞发生发育的初步研究. 水产学报, 2015, 39(9): 1273–1282]
- CHENG L, HUANG T Q, LIU C B, *et al.* Research perspectives: Marker genes of primordial germ cells in fishes. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(6): 80–88 [程琳, 黄天晴, 刘晨斌, 等. 鱼类原始生殖细胞标记基因研究进展. 水产学杂志, 2020, 33(6): 80–88]
- DUAN J D, FENG G Q, CHANG P, *et al.* Germ cell-specific expression of *dead end* (*dnd*) in rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(2): 561–571
- FUJIMOTO T, NISHIMURA T, GOTO-KAZETO R, *et al.* Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(40): 17211–17216
- GROSS-THEBING T, YIGIT S, PFEIFFER J, *et al.* The vertebrate protein Dead End maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation. Development Cell, 2017, 43(6): 704–715
- HAMILTON S, SEVERI W, CAVALLI R O. Biology and aquaculture of cobia: A review. Boletim do Instituto de Pesca, 2013, 39(4): 461–477
- HONG N, LI M Y, YUAN Y M, *et al.* *Dnd* is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish. Stem Cell Reports, 2016, 6(3): 411–421
- HORVAY K, CLAUBEN M, KATZER M, *et al.* *Xenopus Dead end* mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. Developmental Biology, 2006, 291(1): 1–11
- JIN Y H, DAVIE A, MIGAUD H. Expression pattern of *nanos*, *piwil*, *dnd*, *vasa* and *pum* genes during ontogenic development in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Gene, 2019, 688: 62–70
- LI S Z, LIU W, LI Z, *et al.* Molecular characterization and expression pattern of a germ cell marker gene *dnd* in gibel carp (*Carassius gibelio*). Gene, 2016, 591(1): 183–190
- LI X N, LIU X Z, SHI B, *et al.* The expression patterns of membrane progesterin receptor  $\alpha$  (*mPR $\alpha$* ) during oocytes maturation in *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 25–33 [李晓妮, 柳学周, 史宝, 等. 膜孕激素受体(*mPR $\alpha$* )在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 卵母细胞成熟过程中的表达特征. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 25–33]
- LIN F, ZHAO C Y, XU S H, *et al.* Germline-specific and sexually dimorphic expression of a *dead end* gene homologue in turbot (*Scophthalmus maximus*). Theriogenology, 2013, 80(6): 665–672
- LIU C B, XU G F, HUANG T Q, *et al.* A review of research progress on gonadal development in fish. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 46–54 [刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46–54]
- LIU L X, HONG N, XU H Y, *et al.* Medaka *dead end* encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. Gene Expression Patterns, 2009, 9(7): 541–548
- LIU Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1993, 20–42 [刘筠. 中国养殖鱼类繁育生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 20–42]
- NISHIMURA T, TANAKA M. Gonadal development in fish. Sexual Development, 2014, 8(5): 252–261
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing realtime PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101–1108
- SHI B, LIU X Z, XU T, *et al.* Expression characterization of the novel membrane progesterin receptor (*mPR-Like*) gene during the oocyte maturation of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 10–17 [史宝, 柳学周, 徐涛, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 新型膜孕激素受体基因(*mPRL*) 在卵母细胞成熟过程中的表达特征. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 10–17]
- ŠKUGOR A, TVEITEN H, KRASNOV A, *et al.* Knockdown of the germ cell factor *Dead end* induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) hatchlings. Animal Reproduction Science, 2014, 144(3/4): 129–137
- WANG X Y, LIU Q H, XIAO Y S, *et al.* The *dnd* RNA identifies germ cell origin and migration in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). BioMed Research International, 2015: 428591
- WARGELIUS A, LEININGER S, SKAFTNESMO K O, *et al.* *Dnd* knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. Scientific Reports, 2016, 6: 21284
- WEIDINGER G, JÜRIG S, SLANCHEV K, *et al.* *Dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. Current Biology, 2003, 13(16): 1429–1434
- YANG X G, YUE H M, YE H, *et al.* Identification of a germ cell marker gene, the *dead end* homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. Gene, 2015, 558(1): 118–125
- YAZAWA R, TAKEUCHI Y, MORITA T, *et al.* The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) *dead end* gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. Molecular Reproduction and Development, 2013, 80(10): 871–880
- YOUNGREN K, COVENEY D, PENG X, *et al.* The Ter mutation in the *dead end* gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. Nature, 2005, 435(7040): 360–364
- ZHANG H W, WANG Z R, ZHANG S C. Developmental Biology. Beijing: Higher Education Press, 2006, 399–407 [张红卫, 王子仁, 张士瑾. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社, 2006, 399–407]

## Cloning and Expression Analysis of *dnd* During Annual Gonadal Development of Cobia (*Rachycentron canadum*)

KUANG Jiehua<sup>1</sup>, MA Qian<sup>1,2</sup>①, CHEN Gang<sup>1,2</sup>①, MAO Feifan<sup>1</sup>, ZHOU Qiling<sup>1</sup>,  
HUANG Jiansheng<sup>1,2</sup>, SHI Gang<sup>1</sup>, ZHANG Jiandong<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

**Abstract** In this study, the full length cDNA sequence of *Rachycentron canadum dnd* (*Rcdnd*) was cloned using RACE technology for the first time. In total, the sequence comprises 1339 bp, including a 5'-UTR of 59 bp, a 3'-UTR of 173 bp, and an open reading frame of 1107 bp, encoding a protein of 368 amino acids. The deduced amino acid sequence contains a conserved RNA recognition motif and four conserved regions (CR1~4). Comparisons of the deduced amino acid sequence with those of other teleosts revealed the highest percentage identity (72.3%) with *Seriola dumerili*. Phylogenetic tree analysis also showed that the *dnd* of *R. canadum* was most closely related to the homologous proteins of *S. dumerili*. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) results indicated that *Rcdnd* was specifically expressed in the gonads, but not in other tissues. The results of real-time quantitative PCR (qRT-PCR) revealed that *Rcdnd* expression tended to gradually increase as the testis developed (Stages II to V). During the development of the ovary (Stage I to III), *Rcdnd* expression first increased substantially and then stabilized; the highest expression level was found at 150 days post hatching (dph) (Stage II). Furthermore, the results of chemical in situ hybridization revealed that *Rcdnd* mRNA was mainly expressed in germ cells but barely detected in somatic cells. In the testis, *Rcdnd* mRNA signals were concentrated in the periphery of spermatogonia and primary spermatocytes; they were only weakly detected in secondary spermatocytes and barely detected in spermatids and spermatozoa. In the ovary, *Rcdnd* mRNA was highly expressed in oogonia, and the signals became weak in primary oocytes dispersed in the perinuclear cytoplasm. There were no significant differences in *Rcdnd* mRNA signals detected in oocytes in phases I, II, and III. In conclusion, these findings suggest that the *Rcdnd* gene may play an important role in gonadal development and provide a theoretical reference for revealing the regulatory mechanism of germ cell differentiation during gametogenesis in *R. canadum*.

**Key words** *Rachycentron canadum*; *dnd*; Gene cloning; Gonadal development; Expression analysis

① Corresponding author: MA Qian, E-mail: maq@gdou.edu.cn; CHEN Gang, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210104001

http://www.yykxjz.cn/

赵仲孟, 张露, 赵瀚, 黄志鹏, 柯红雨, 段元亮, 李强, 周剑. 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉的营养成分比较及评价. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 129-136

ZHAO Z M, ZHANG L, ZHAO H, HUANG Z P, KE H Y, DUAN Y L, LI Q, ZHOU J. Analysis and evaluation of nutritive composition in muscles of *Acipenser baerii*, *Acipenser schrenckii*, and their hybrids. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 129-136

# 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉的营养成分比较及评价\*

赵仲孟 张露 赵瀚 黄志鹏 柯红雨 段元亮 李强 周剑<sup>①</sup>

(四川省农业科学院水产研究所 四川 成都 611730)

**摘要** 通过对西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)、施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂, *Acipenser baerii*♀×*A. schrenckii*♂)的肌肉常规营养成分进行测定, 同时进行氨基酸和脂肪酸的测定, 从而对 3 种鲟鱼营养品质进行分析评价。结果显示, 除水分含量外, 杂交种肌肉中粗灰分、粗蛋白和粗脂肪含量均高于其亲本西伯利亚鲟和施氏鲟, 但均未达到显著差异( $P>0.05$ ); 在 3 种鲟鱼肌肉中共检测出 16 种氨基酸, 其中, 包括 7 种必需氨基酸和 4 种鲜味氨基酸, 杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉中的氨基酸总量、必需氨基酸总量及鲜味氨基酸总量均高于其亲本西伯利亚鲟和施氏鲟。根据氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS), 3 种鲟鱼肌肉中第一限制氨基酸均为蛋氨酸+胱氨酸; 第二限制氨基酸均为缬氨酸。另外, 在杂交种肌肉中检测出亲本含有的 18 种脂肪酸外, 还另外检测出 4 种脂肪酸, 且杂交种肌肉中饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸含量均显著高于亲本( $P<0.05$ )。在 3 种鲟鱼肌肉中饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸含量最高的分别为棕榈酸(C16:0)、油酸(C18:1n9c)和亚油酸(C18:2n6c)。研究表明, 杂交种相比于亲本具有更高的食用价值和营养价值, 从而具有更明显的生产优势。

**关键词** 西伯利亚鲟; 施氏鲟; 杂交; 营养成分; 比较分析

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0129-08

西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)和施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)是我国的 2 个重要养殖品种, 均隶属于鲟形目(*Acipenseriformes*)、鲟科(*Acipenseridae*)、鲟属(*Acipenser*)。在自然条件下, 施氏鲟主要分布于黑龙江水系(Krykhtin *et al*, 1997), 是该地区的特有种和重要经济鱼类, 该品种主要优势在于生长速度快, 但也

存在抗病力差、不耐运输, 且对活饵过于依赖较难驯化、在养殖过程中死亡率较高等缺点。而西伯利亚鲟在我国额尔齐斯河水系有少量分布, 虽然其生长速度慢, 但抗病力强, 耐运输(Birstein *et al*, 1993; 孙大江等, 2011)。我国于 2007 年前后将西伯利亚鲟和施氏鲟的杂交组合(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂, *Acipenser*

\* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系、优质特色淡水鱼工程产业链关键技术集成与示范(2018NZ0007)和亚冷水性鱼类养殖产业化研究与示范“创新能力培育”(2020YFN0134)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA, the Key Technology Integration and Demonstration of High Quality Characteristic Freshwater Fish Engineering Industry Chain (2018NZ0007), and Research on Industrialization of Sub-Cold Water Fish Culture and Demonstration of “Cultivation of Innovation Ability” (2020YFN0134)].

赵仲孟, E-mail: 18227552594@163.com

① 通讯作者: 周剑, 副研究员, E-mail: zhoujian980@126.com

收稿日期: 2021-01-04, 收修改稿日期: 2021-02-04

*baerii*♀ × *A. schrenckii*♂)繁育成功。在养殖过程中,发现杂交种比其亲本具有明显的生产优势,主要体现在生长速度较快、肉质好、抗病力强和运输成活率高等。杂交种凭借其生产优势,在全国范围内迅速进行推广养殖,已成为我国商品鲟鱼养殖规模与产量最大的品种(孙大江等, 2011)。

目前,关于杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)的研究主要集中在生长性能、繁殖力、抗逆性和免疫等方面(朱华等, 2014; 齐茜等, 2017; 王念民等, 2010b; 王荻等, 2011)。朱华等(2014)比较了西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂)杂交 F<sub>1</sub> 及其母本西伯利亚鲟的苗种培育,发现随着年龄的增长,杂交 F<sub>1</sub> 生长速度明显快于西伯利亚鲟,说明杂交 F<sub>1</sub> 比其母本西伯利亚鲟的生长性能更加优良。王念民等(2010a)用施氏鲟同西伯利亚鲟和小体鲟(*Acipenser ruthenus*)进行正反杂交实验发现,杂种后代的生长速度比其亲本更具优势。此外,齐茜等(2017)对西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交 F<sub>1</sub> 进行繁殖力方面研究发现,杂交 F<sub>1</sub> 的平均受精率和孵化率高于其亲本西伯利亚鲟且开口率也是最高,因此,证明了杂交 F<sub>1</sub> 在繁殖力方面优于其亲本。对于免疫能力,王荻等(2011)研究发现,西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂)杂交 F<sub>1</sub> 的肝、肾、鳃、肌肉和血液等组织中免疫相关的超氧化物歧化酶(SOD)和酸性磷酸酶(ACP)活性高于其亲本。而对于西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉营养成分的研究相对较少,本研究通过对西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉营养成分进行分析测定,比较分析3种鲟鱼肌肉营养成分差异,旨在为杂交鲟的养殖和研究提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及样品处理

本研究中,西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)均来自四川润兆渔业有限公司彭州军乐基地,西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种均为2018年11月同时段产卵受精,经孵化、驯化后同池饲养,且采用同样的饲喂方式。于2020年10月,随机选取健壮无伤、规格均一且达到商品鱼规格的西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种各5尾。其中,西伯利亚鲟体长为25.19~27.72 cm,体重为1178.67~1272.81 g;施氏鲟体长为28.48~31.18 cm,体重为1377.53~1478.35 g;杂交种体长为32.46~36.22 cm,体重为1645.61~1720.26 g。每尾鱼为1个分析样品,每尾取肌肉样品100 g,取自两侧头盖骨后至尾鳍前的体背

肌肉,捣碎混匀后,经105℃烘干后保存。

### 1.2 检测方法

分别对每个肌肉样品进行常规营养成分测定:根据GB 5009.3-2016测定肌肉中水分;根据GB 5009.4-2016测定肌肉粗灰分含量;根据GB 5009.5-2016测定肌肉粗蛋白含量;根据GB 5009.6-2016测定肌肉粗脂肪含量。

分别对每个肌肉样品进行氨基酸和脂肪酸含量的测定:本实验氨基酸采用GB 5009.124-2016微波辅助酸水解法进行测定,脂肪酸采用GB 5009.168-2016法进行测定。

### 1.3 氨基酸营养价值评价

分别对西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种的氨基酸评分(amino acid score, AAS)、化学评分(chemical score, CS)和必需氨基酸指数(essential amino acid index, EAAI)进行计算,同时与FAO/WHO氨基酸评分模式和中国预防医学科学院营养与食品卫生所提出的全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式进行比较(刘俊利等, 2011; 周剑等, 2021),计算公式为:

$$AAS = \frac{\text{待测鲟鱼肌肉蛋白氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{FAO/WHO评分模式氨基酸含量(mg/g N)}}$$

$$CS = \frac{\text{待测鲟鱼肌肉蛋白氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{全鸡蛋蛋白质同种氨基酸含量(mg/g N)}}$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{AE} \times \frac{100B}{BE} \times \frac{100C}{CE} \cdots \times \frac{100F}{FE}}$$

AAS和CS公式中,氨基酸含量(mg/g)=鲟鱼肌肉鲜样氨基酸含量百分比/鲟鱼肌肉鲜样粗蛋白含量百分比×6.25×1000。

EAAI公式中, $n$ 为氨基酸中需要比较的必需氨基酸个数;AE、BE、...、FE为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(mg/g N);A、B、...、F为鲟鱼肌肉中蛋白质的必需氨基酸含量(mg/g N)。

### 1.4 数据统计

采用SPSS 16.0软件进行统计分析,独立样本 $t$ 检验进行西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种样本间的差异分析,方差齐性检验使用Levene's test进行,平均值±标准差(Mean±SD)表示描述性统计值。

## 2 结果

### 2.1 基本营养成分

杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉中粗灰分、



粗蛋白和粗脂肪含量均高于其亲本西伯利亚鲟和施氏鲟, 但均未达到显著差异( $P>0.05$ ), 而杂交种肌肉中水分含量低于其亲本西伯利亚鲟和施氏鲟, 差异也并不显著( $P>0.05$ )(表 1)。

## 2.2 氨基酸组成

在西伯利亚鲟、施氏鲟及杂交种个体的肌肉中

共检测出 16 种氨基酸, 氨基酸总量分别为(16.34±0.39)%、(16.11±0.47)%和(16.75±0.67)%。杂交种肌肉中必需氨基酸总量显著高于施氏鲟( $P<0.05$ ), 同时高于西伯利亚鲟但无显著性差异( $P>0.05$ )。除此之外, 氨基酸总量和鲜味氨基酸总量均在杂交种肌肉中含量最高, 但差异并不显著( $P>0.05$ )(表 2)。

西伯利亚鲟肌肉中必需氨基酸总量占氨基酸总

表 1 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉中主要营养物质(平均值±标准差) (%湿重)

Tab.1 Nutrient components in muscles of the *A. baerii*, *A. schrenckii* and *A. baerii* × *A. schrenckii* (Mean±SD) (% wet weight)

品种 Species	水分 Moisture/%	粗灰分 Ash/(g/100g)	粗蛋白 Crude protein/(g/100 g)	粗脂肪 Crude fat/(g/100 g)
西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂) <i>A. baerii</i> (♀)× <i>A. schrenckii</i> (♂)	73.36±2.59	1.10±0.06	17.64±0.69	7.96±2.43
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	74.68±0.88	1.03±0.06	16.92±0.38	6.82±0.65
施氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	75.08±0.72	1.02±0.04	16.92±0.52	7.82±0.92

表 2 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)肌肉中氨基酸组成(平均值±标准差) (%湿重)

Tab.2 Amino acids composition in muscles of the *Acipenser baerii*, *Acipenser schrenckii* and *A. baerii* × *A. schrenckii* (Mean±SD) (% wet weight)

氨基酸 Amino acids	西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂) <i>A. baerii</i> (♀)× <i>A. schrenckii</i> (♂)	西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	施氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
天门冬氨酸 <sup>#</sup> Asp	1.73±0.07	1.70±0.03	1.67±0.03
苏氨酸* Thr	0.78±0.03	0.76±0.02	0.76±0.02
丝氨酸 Ser	0.74±0.04 <sup>a</sup>	0.70±0.02 <sup>b</sup>	0.72±0.03 <sup>a,b</sup>
谷氨酸 <sup>#</sup> Glu	2.70±0.13	2.59±0.07	2.64±0.06
甘氨酸 <sup>#</sup> Gly	0.84±0.13	0.80±0.05	0.80±0.13
丙氨酸 <sup>#</sup> Ala	0.97±0.06	0.97±0.03	0.97±0.04
缬氨酸* Val	0.87±0.05 <sup>a</sup>	0.87±0.05 <sup>a</sup>	0.77±0.03 <sup>b</sup>
蛋氨酸* Met	0.59±0.04 <sup>a,b</sup>	0.60±0.06 <sup>a</sup>	0.53±0.02 <sup>b</sup>
异亮氨酸* Ile	0.78±0.05	0.77±0.05	0.75±0.02
亮氨酸* Leu	1.35±0.06	1.34±0.02	1.34±0.04
酪氨酸 Tyr	0.67±0.05	0.66±0.02	0.62±0.03
苯丙氨酸* Phe	0.75±0.05	0.75±0.35	0.71±0.02
赖氨酸* Lys	1.70±0.07 <sup>a</sup>	1.65±0.05 <sup>a,b</sup>	1.60±0.07 <sup>b</sup>
组氨酸 His	0.65±0.03 <sup>a</sup>	0.55±0.04 <sup>b</sup>	0.61±0.01 <sup>a</sup>
精氨酸 Arg	1.06±0.05	1.03±0.05	1.01±0.04
脯氨酸 Pro	0.56±0.07	0.59±0.13	0.61±0.05
氨基酸总量 W <sub>TAA</sub>	16.75±0.67	16.34±0.39	16.11±0.47
必需氨基酸总量 W <sub>EAA</sub>	6.82±0.33 <sup>a</sup>	6.74±0.21 <sup>a,b</sup>	6.45±0.27 <sup>b</sup>
鲜味氨基酸总量 W <sub>DAA</sub>	6.24±0.31	6.06±0.17	6.07±0.25
非必需氨基酸总量 W <sub>NEAA</sub>	9.92±0.44	9.60±0.20	9.65±0.37
W <sub>EAA</sub> /W <sub>TAA</sub> /%	40.70±0.01 <sup>a,b</sup>	41.24±0.00 <sup>a</sup>	40.08±0.01 <sup>b</sup>
W <sub>EAA</sub> /W <sub>NEAA</sub> /%	68.75±0.01 <sup>a,b</sup>	70.20±0.00 <sup>a</sup>	66.84±0.01 <sup>b</sup>
W <sub>DAA</sub> /W <sub>TAA</sub> /%	37.25±0.01	37.11±0.01	37.67±0.00

注: \* 鱼类必需氨基酸; # 鲜味氨基酸。同一行数据具有不同上标字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Note: \* Essential amino acids; # Flavor amino acid. Different superscript letters in the same row indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

量的比值( $W_{EAA}/W_{TAA}$ )和必需氨基酸总量占非必需氨基酸总量的比值( $W_{EAA}/W_{NEAA}$ )均为最高,显著高于施氏鲟,与杂交种无显著差异。除此之外,肌肉中鲜味氨基酸总量占氨基酸总量的比值( $W_{DAA}/W_{TAA}$ )最高的是施氏鲟,但均未达到显著差异( $P>0.05$ )(表 2)。

### 2.3 肌肉营养品质评价

通过计算得出西伯利亚鲟、施氏鲟及杂交种肌肉的氨基酸评分值(ASS)和化学评分值(CS),西伯利亚鲟肌肉中必需氨基酸的 ASS 值为 1.01~1.80,CS 值为 0.58~1.30;施氏鲟肌肉中必需氨基酸的 ASS 值为 0.89~1.74,CS 值为 0.51~1.34;杂交种肌肉中必需氨基酸的 ASS 值为 0.95~1.77,CS 值为 0.54~1.37(表 3)。根据 ASS 评分和 CS 评分,西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种肌肉中的第一限制氨基酸均为蛋氨酸+胱氨酸;第二限制氨基酸均为缬氨酸。

### 2.4 脂肪酸组成

在西伯利亚鲟和施氏鲟肌肉中共检测出 18 种脂肪酸,包括饱和脂肪酸(SFA, saturated fatty acid) 7 种,单不饱和脂肪酸(MUFA, monounsaturated fatty acid) 3 种,多不饱和脂肪酸(PUFA, polyunsaturated fatty acid) 8 种。而在杂交种肌肉中除西伯利亚鲟和施氏鲟

肌肉中检测出的 18 种脂肪酸外,在 SFA 中还检测出二十三酸(C23:0);MUFA 中还检测出顺-10-十七碳一烯酸(C17:1n7);以及在 PUFA 中还检测出顺-8,11,14-二十碳三烯酸(C20:3n6)和顺-13,16-二十二碳二烯酸(C22:2n6)(表 4)。

杂交种肌肉 SFA 占肌肉干重的 1.69%,显著高于西伯利亚鲟的 1.31%和施氏鲟的 1.33% ( $P<0.05$ );杂交种肌肉 MUFA 占肌肉干重的 2.51%,显著高于西伯利亚鲟的 1.84%和施氏鲟的 1.96% ( $P<0.05$ );杂交种肌肉 PUFA 占肌肉干重的 3.38%,同样显著高于西伯利亚鲟的 2.79%和施氏鲟的 2.69% ( $P<0.05$ )。在西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种肌肉中 SFA 含量最高的是棕榈酸(C16:0);MUFA 含量最高的是油酸(C18:1n9c);而 PUFA 在肌肉中含量最高的是亚油酸(C18:2n6c)。

## 3 讨论

### 3.1 常规营养成分分析

鱼体肌肉中粗蛋白和粗脂肪等含量的高低是衡量鱼类营养价值的重要指标。其中,蛋白质是组成动物一切细胞、组织的重要成分,机体所有重要的组成部分都需要蛋白质的参加。食品中蛋白质含量的多少,虽然不能决定一种食品营养价值的高低,但评定

表 3 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交后代肌肉中氨基酸评分和化学评分  
Tab.3 Comparative analysis of AAS and CS in muscles between the *A. baerii*,  
*A. schrenckii* and *A. baerii* × *A. schrenckii*

必需氨基酸 EAA	西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂) <i>A. baerii</i> (♀)× <i>A. schrenckii</i> (♂)			西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>			施氏鲟 <i>A. schrenckii</i>			FAO 评分 模式标准 含量 FAO score model	全鸡蛋 蛋白质 标准含量 Egg score model
	氨基酸 含量 Amino acid contents	氨基酸 评分值 AAS	化学 评分值 CS	氨基酸 含量 Amino acid contents	氨基酸评 分值 AAS	化学 评分值 CS	氨基酸 含量 Amino acid contents	氨基酸评 分值 AAS	化学 评分值 CS		
亮氨酸 Leu	478	1.09	0.90	495	1.13	0.93	494	1.12	0.93	440	534
异亮氨酸 Ile	276	1.10	0.83	283	1.13	0.85	277	1.11	0.84	250	331
赖氨酸 Lys	602	1.77	1.37	611	1.80	1.39	590	1.74	1.34	340	441
苏氨酸 Thr	277	1.11	0.95	280	1.12	0.96	282	1.13	0.97	250	292
缬氨酸 Val	307	0.99**	0.75**	323	1.04**	0.79**	284	0.92**	0.69**	310	411
苯丙+酪氨酸 Phe+Tyr	504	1.33	0.89	523	1.38	0.93	493	1.30	0.87	380	565
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	209	0.95*	0.54*	222	1.01*	0.58*	196	0.89*	0.51*	220	386
总计 Total	2653			2737			2616			2190	2960
必需氨基酸 指数 EAAI		86.02			89.39			84.45			

注: \*为第一限制性氨基酸; \*\*为第二限制性氨基酸

Note: \* indicate the first limiting amino acids; \*\* indicate the second limiting amino acids

表 4 西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交后代肌肉中脂肪酸组成及含量(平均值±标准差) (%湿重)  
 Tab.4 Fatty acids composition in muscles of of the *A. baerii*, *A. schrenckii* and  
*A. baerii* × *A. schrenckii* (Mean±SD) (% wet weight)

脂肪酸 Fatty acid	西伯利亚鲟(♀)×施氏鲟(♂) <i>A. baerii</i> (♀)× <i>A. schrenckii</i> (♂)	西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	施氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
	含量 Content		
C14:0	0.097±0.040	0.079±0.010	0.072±0.040
C15:0	0.018±0.010	0.015±0.000	0.013±0.000
C16:0	1.260±0.500	0.990±0.110	0.950±0.060
C17:0	0.030±0.010 <sup>a</sup>	0.020±0.000 <sup>b</sup>	0.020±0.000 <sup>b</sup>
C18:0	0.250±0.090 <sup>a</sup>	0.170±0.010 <sup>b</sup>	0.210±0.030 <sup>a,b</sup>
C20:0	0.020±0.010 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>a,b</sup>	0.010±0.010 <sup>b</sup>
C22:0	0.010±0.000 <sup>a</sup>	0.030±0.000 <sup>b</sup>	0.060±0.010 <sup>c</sup>
C23:0	0.006±0.000	未检出(定量限: 0.003 3)	未检出(定量限: 0.003 3)
Σ SFA	1.690±0.660 <sup>a</sup>	1.310±0.130 <sup>b</sup>	1.330±0.110 <sup>b</sup>
C16:1n7	0.180±0.090	0.150±0.020	0.120±0.010
C17:1n7	0.015±0.015	未检出(定量限: 0.003 3)	未检出(定量限: 0.003 3)
C18:1n9c	2.290±1.020	1.680±0.170	1.830±0.180
C22:1n9	0.030±0.040	0.010±0.000	0.010±0.000
Σ MUFA	2.510±1.160 <sup>a</sup>	1.840±0.190 <sup>b</sup>	1.960±0.180 <sup>b</sup>
C18:2n6c	2.060±0.830	1.710±0.140	1.620±0.140
C18:3n6	0.090±0.020	0.090±0.020	0.080±0.010
C18:3n3	0.400±0.180	0.300±0.040	0.320±0.030
C20:2	0.110±0.050	0.090±0.010	0.100±0.010
C20:3n6	0.040±0.010	未检出(定量限: 0.003 3)	未检出(定量限: 0.003 3)
C20:3n3	0.020±0.010	0.020±0.000	0.030±0.000
C20:4n6	0.070±0.010	0.070±0.010	0.080±0.010
C22:2n6	0.006±0.000	未检出(定量限: 0.003 3)	未检出(定量限: 0.003 3)
C20:5n3	0.130±0.060	0.110±0.010	0.100±0.000
C22:6n3	0.450±0.160	0.370±0.030	0.370±0.030
Σ PUFA	3.380±1.320 <sup>a</sup>	2.790±0.220 <sup>b</sup>	2.690±0.790 <sup>b</sup>

一种食品蛋白质营养价值时,应以蛋白质含量为基础(李华, 2013)。本研究中,杂交种个体肌肉中粗蛋白含量(17.64%)高于西伯利亚鲟和施氏鲟,具有较好的优势。同时高于同规格的俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)、匙吻鲟(*Polyodon spathula*)等鲟形目鱼类,低于小体鲟、达氏鳇(*Huso dauricus*)等(杨太有等, 2005; 龚全等, 2012; 尹洪滨等, 2004; 沈硕等, 2009)。脂肪是鱼类能量的来源,本研究中,杂交种肌肉中粗脂肪含量(7.96%)高于西伯利亚鲟和施氏鲟,同时高于俄罗斯鲟、达氏鲟、匙吻鲟、中华鲟、小体鲟、达氏鳇等鲟形目鱼类(杨太有等, 2005; 龚全等, 2012; 尹洪滨等, 2004; 沈硕等, 2009)。因此,杂交种肌肉中粗蛋白和粗脂肪含量较高,可作为杂交选育的指标,且相比其亲本和其他鲟形目鱼类具有较好

的优势,是一种营养价值较高的鱼类。除此之外,杂交种肌肉中粗灰分含量也高于其亲本,而水分含量低于其亲本,这也是影响其营养价值的重要原因之一。

### 3.2 氨基酸组成比较

肌肉营养品质的评定主要受蛋白质中氨基酸的影响,根据 FAO/WHO 的理想模式,必需氨基酸占氨基酸总量的比值( $W_{EAA}/W_{TAA}$ )为 40%左右,必需氨基酸与非必需氨基酸的比值( $W_{EAA}/W_{NEAA}$ )在 60%以上为质量较好的蛋白质(高露娇等, 2011; Pellet *et al*, 1980)。本研究中,西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种肌肉的  $W_{EAA}/W_{TAA}$  和  $W_{EAA}/W_{NEAA}$  值均符合优质蛋白质的要求。而 3 种鲟鱼肌肉中  $W_{EAA}/W_{TAA}$  和  $W_{EAA}/W_{NEAA}$  值最高的为西伯利亚鲟,鲜味氨基酸总量占氨基酸总量的比值( $W_{DAA}/W_{TAA}$ )最高的是施氏

鲟,可能是由于杂交种肌肉中的  $W_{TAA}$ 、 $W_{EAA}$ 、 $W_{DAA}$  和  $W_{NEAA}$  均高于其亲本,导致其杂交  $F_1$  肌肉中  $W_{EAA}/W_{TAA}$ 、 $W_{EAA}/W_{NEAA}$  和  $W_{DAA}/W_{TAA}$  值偏低。在 3 种鲟鱼肌肉中,必需氨基酸含量最高的均为赖氨酸,赖氨酸是乳液中第一限制性氨基酸,并有“生长氨基酸”之称,食用鲟鱼可补充食物中赖氨酸摄入,从而提高蛋白质的利用率(周均等, 2006)。且 3 种鲟鱼肌肉在赖氨酸含量均超过 FAO/WHO 模式和鸡蛋蛋白质,杂交种肌肉中含量最高,显著高于施氏鲟。同时高于俄罗斯鲟、匙吻鲟、中华鲟、达氏鳇和达氏鲟,低于小体鲟(杨太有等, 2005; 龚全等, 2012; 尹洪滨等, 2004; 沈硕等, 2009)。除此之外,还高于草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、合方鲫(日本白鲫♀×红鲫♂, *Carassius cuvieri*♀×*C. auratus*♂)、红鲫等常规鱼类(陈小雷等, 2020; 刘俊利等, 2011; 刘庆峰等, 2017)。蛋白质的鲜美程度主要取决于呈鲜味的谷氨酸和天门冬氨酸以及呈甘味的甘氨酸和丙氨酸的组成与含量(张昌颖等, 1988; 刘峰等, 2018)。本研究中, 3 种鲟鱼肌肉中含量最高的为谷氨酸,谷氨酸是鲜味最强的氨基酸,也是脑组织生化代谢中合成生理活性物质的重要参与物质。且杂交  $F_1$  肌肉中谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸和丙氨酸含量均高于亲本,说明杂交种肉质味道更加鲜美。而鲜味氨基酸总量低于俄罗斯鲟、中华鲟和小体鲟等其他鲟形目鱼类(杨太有等, 2005; 尹洪滨等, 2004)。

必需氨基酸指数(EAAI)是评价食品营养价值的常用指标之一(许星鸿等, 2011)。Oser(1951)提出,当  $EAAI > 90$ ,表示蛋白质的营养价值高, $EAAI$  为 70~90 时,表示蛋白质的营养价值为良。本研究中,西伯利亚鲟、施氏鲟及其杂交种的  $EAAI$  分别为 89.39、84.45 和 86.02,接近 90,说明 3 种鲟鱼蛋白质营养价值均较高。

### 3.3 脂肪酸组成比较

脂肪酸是机体主要能源之一,对鱼类的生长和生存起着重要作用(王永明等, 2018)。本研究在西伯利亚鲟和施氏鲟肌肉中共检测出 18 种脂肪酸,而在杂交种肌肉中还另外检测出 4 种脂肪酸,可能是因为这 4 种脂肪酸在西伯利亚鲟和施氏鲟肌肉中未达到检测的最低标准含量,而在杂交种中达到最低标准含量。在 3 种鲟鱼肌肉中均以多不饱和脂肪酸(PUFA)含量最高,单不饱和脂肪酸(MUFA)次之,饱和脂肪酸(SFA)最低,且杂交种肌肉中 PUFA、MUFA 和 SFA 含量均显著高于其亲本西伯利亚鲟和施氏鲟,这可能是由于杂交育种引起的肉质变化,其确切机制还需要进一步

深入研究。3 种鲟鱼肌肉中 SFA 含量最高的是棕榈酸(C16:0); MUFA 含量最高的是油酸(C18:1n9c); 而 PUFA 在肌肉中含量最高的是亚油酸(C18:2n6c)。鱼类肌肉中脂肪酸组成的含量与其种类、生存环境、饵料营养成分等诸因素有关(Ahlgren *et al.*, 2010)。但在相同条件下,鲟形目鱼类及其杂交后代在脂肪酸组成含量上表现出的特征,为其脂肪酸的组成结构、含量、营养价值评定以及鱼类种质标准的建立提供了依据(尹洪滨等, 2004)。

综上所述,杂交种(西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂)相比于亲本西伯利亚鲟和施氏鲟肌肉中粗蛋白和粗脂肪含量较高,氨基酸含量和脂肪酸含量同样高于亲本。同时具有均衡的氨基酸组成,必需氨基酸含量符合人体需要,表现出更高的食用价值和营养价值,可在后续的鲟鱼杂交育种研究中提供基础数据。

## 参 考 文 献

- AHLGREN G, BLOMQVIST P, BOBERG M, *et al.* Fatty acid content of the dorsal muscle-an indicator of fat quality in freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 2010, 45(1): 131-157
- BIRSTEIN V J. Sturgeons and paddlefishes: Threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology*, 1993, 7(4): 773-787
- CHEN X L, CUI K, ZHOU B B, *et al.* Comparison of nutrient composition in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* cultured in spring flowing water and in a routine pond. *Fisheries Science*, 2020, 39(1): 63-71 [陈小雷, 崔凯, 周蓓蓓, 等. 山泉流水与池塘养殖草鱼营养成分比较. *水产科学*, 2020, 39(1): 63-71]
- GAO L J, HUANG Y Q, XIA L J, *et al.* Comparison of flesh quality of farmed fugu, *Takifugu rubripes* from different culture models. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1668-1676 [高露娇, 黄艳青, 夏连军, 等. 不同养殖模式下红鳍东方鲀的品质比较. *水产学报*, 2011, 35(11): 1668-1676]
- GONG Q, ZHAO G, DU J, *et al.* Analysis of nutritional composition in muscle of *Acipenser dabryanus* Dumeril. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(6): 2372-2375 [龚全, 赵刚, 杜军, 等. 达氏鲟肌肉营养成分分析. *西南农业学报*, 2012, 25(6): 2372-2375]
- KRYKHTIN M L, SVIRSKII V G. Endemic sturgeons of the Amur River: Kaluga, *Huso dauricus*, and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1/2/3/4): 231-239
- LI H. Comparison of nutrient components in muscles of wild and artificial cultured *Triplophysa siluroides*. *Sichuan Journal of Zoology*, 2013, 32(4): 584-587 [李华. 野生和人工养殖似鲃高原鳅肌肉营养成分比较. *四川动物*, 2013, 32(4):

- 584–587]
- LIU F, LÜ X K, LIU Y Y, *et al.* Effect of starvation on amino acids and fatty acids of juvenile *Larimichthys crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 58–65 [刘峰, 吕小康, 刘阳阳, 等. 饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 58–65]
- LIU J L, XIONG B X, LÜ G J, *et al.* Comparison on muscle composition of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys mobilis* in two reservoirs with different trophic levels. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1098–1104 [刘俊利, 熊邦喜, 吕光俊, 等. 两种不同营养类型水库鲢、鳙肌肉营养成分的比较. *水产学报*, 2011, 35(7): 1098–1104]
- LIU Q F, WANG J, XIAO J, *et al.* Muscle nutrient of *Carassius auratus cuvieri* (♀)×*Carassius auratus* red var. (♂) and its parents. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1133–1139 [刘庆峰, 王静, 肖军, 等. 合方鲫及其亲本肌肉营养成分分析. *水产学报*, 2017, 41(7): 1133–1139]
- OSER B L. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *Journal of the American Dietetic Association*, 1951, 27(5): 396–402
- PELLET P L, YONG V R. *Nutritional evaluation of protein food*. Tokyo: The United National University Publishing Company, 1980, 26–29
- QI Q, LIU H H, LI Z H, *et al.* Comparison of reproductive performance, growth performance and disease resistance performance among *Acipenser schrencki*, *Acipenser baeri* and their hybrid offsprings. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39(2): 376–383 [齐茜, 刘浩浩, 李忠华, 等. 施氏鲟、西伯利亚鲟及其杂交后代的繁殖性能、生长性能及抗病性能比较. *江西农业大学学报*, 2017, 39(2): 376–383]
- SHEN S, ZHOU J C, ZHAO S M, *et al.* The nutritional composition and evaluation of muscle of *Polyodon spathula*. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2009, 31(3): 295–297 [沈硕, 周继成, 赵思明, 等. 匙吻鲟的营养成分及肌肉营养评价. *营养学报*, 2009, 31(3): 295–297]
- SUN D J, QU Q Z, ZHANG Y, *et al.* Sturgeon aquaculture in China. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(4): 67–70 [孙大江, 曲秋芝, 张颖, 等. 中国的鲟鱼养殖. *水产学杂志*, 2011, 24(4): 67–70]
- WANG D, LI S W, LIU H B, *et al.* Comparative studies on the activities of four immune-related enzymes from four kinds of sturgeons. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2011, 33(6): 1195–1201 [王荻, 李绍戊, 刘红柏, 等. 4种免疫相关酶在鲟鱼组织内的分布及活性比较. *江西农业大学学报*, 2011, 33(6): 1195–1201]
- WANG N M, YANG G Q, PENG T, *et al.* Comparison of offspring survival of three kinds of sturgeons purebreds and crossbreds. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2010a, 28(4): 507–511 [王念民, 杨贵强, 彭涛, 等. 3种鲟鱼纯种及杂交种后代育苗比较. *四川农业大学学报*, 2010a, 28(4): 507–511]
- WANG N M, YANG G Q, PENG T, *et al.* Analysis on muscle nutritive components of three kinds of sturgeons and their hybrids. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2010b, 32(S): 53–56 [王念民, 杨贵强, 彭涛, 等. 三种鲟鱼及其杂交种肌肉营养成分分析. *吉林农业大学学报*, 2010b, 32(S): 53–56]
- WANG Y M, SHI J R, XIE B W, *et al.* Nutritional composition of muscle in cultured *Sinibotia reevesae* population at different ages. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(3): 542–549 [王永明, 史晋绒, 谢碧文, 等. 不同年龄段养殖宽体沙鳊肌肉营养成分分析与评价. *水生生物学报*, 2018, 42(3): 542–549]
- XU X H, LIU X, YAN B L, *et al.* Nutritional component analysis and quality evaluation of *Penaeus japonicus*. *Food Science*, 2011, 32(13): 297–301 [许星鸿, 刘翔, 阎斌伦, 等. 日本对虾肌肉营养成分分析与品质评价. *食品科学*, 2011, 32(13): 297–301]
- YIN H B, SUN Z W, SUN D J, *et al.* Comparison of nutritive compositions in muscles among six farmed sturgeon species. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(2): 92–96 [尹洪滨, 孙中武, 孙大江, 等. 6种养殖鲟鳊鱼肌肉营养成分的比较分析. *大连水产学院学报*, 2004, 19(2): 92–96]
- YANG T Y, PENG R H, ZHAO D Q. Approximate compositions in muscle of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt). *Fisheries Science*, 2005, 24(4): 15–17 [杨太有, 彭仁海, 赵道全. 俄罗斯斯鲟肌肉营养成份的分析. *水产科学*, 2005, 24(4): 15–17]
- ZHANG C Y, LI L, LI C F, *et al.* *Biochemistry*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988, 305–561 [张昌颖, 李亮, 李昌甫, 等. *生物化学*. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 305–561]
- ZHOU J, SONG D J. Advance in lysine nutrition. *Feed Research*, 2006, 27(8): 48–50 [周均, 宋代军. 赖氨酸营养研究进展. *饲料研究*, 2006, 27(8): 48–50]
- ZHOU J, ZHAO Z M, HUANG Z P, *et al.* Comparison of nutrient components in muscles and hepatopancreas of pond- and paddy field-cultured *Procambarus clarkii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 162–169 [周剑, 赵仲孟, 黄志鹏, 等. 池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝脏营养成分比较. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 162–169]
- ZHU H, HU H X, WANG W, *et al.* Comparative study on the breeding of Siberian sturgeon and hybrid sturgeon. *China Fisheries*, 2014(8): 73–74 [朱华, 胡红霞, 王巍, 等. 西伯利亚鲟与杂交鲟苗种培育对比试验. *中国水产*, 2014(8): 73–74]



## Analysis and Evaluation of Nutritive Composition in Muscles of *Acipenser baerii*, *Acipenser schrenckii*, and Their Hybrids

ZHAO Zhongmeng, ZHANG Lu, ZHAO Han, HUANG Zhipeng,  
KE Hongyu, DUAN Yuanliang, LI Qiang, ZHOU Jian<sup>①</sup>

(Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 611730, China)

**Abstract** To evaluate the quality characteristics of *Acipenser baerii*, *Acipenser schrenckii*, and their hybrids, their muscle, amino acid, and fatty acid compositions were compared. The results showed that the contents of crude ash, crude protein, and crude fat in hybrid muscle were higher than in *A. baerii* and *A. schrenckii* muscle, but not significantly ( $P>0.05$ ). Sixteen amino acids, including seven essential amino acids, were detected in the muscle of *A. baerii*, *A. schrenckii*, and their hybrids. The total amount of amino acids, essential amino acids, flavor amino acids, and nonessential amino acids in hybrid muscle were higher than in that of the parents. There was no significant difference between the muscle values ( $W_{\text{EAA}}/W_{\text{TAA}}$ ,  $W_{\text{EAA}}/W_{\text{NEAA}}$ , and  $W_{\text{DAA}}/W_{\text{TAA}}$ ) for the hybrid sturgeon and those of its parents ( $P>0.05$ ). According to the amino acid and chemistry score, the first limiting amino acid in all muscle samples was methionine plus cysteine, while the second limiting amino acid was valine. In addition, 18, 18, and 22 fatty acids were detected in the muscle of *A. baerii*, *A. schrenckii*, and their hybrids, respectively. The contents of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids in hybrid muscle were significantly higher than in that of the parents ( $P<0.05$ ). Palmitic acid (C16:0) was the most abundant saturated fatty acid, oleic acid (C18:1n9c) was the most abundant monounsaturated fatty acid, and linoleic acid (C18:2n6c) was the most abundant polyunsaturated fatty acid in all muscle samples. Additionally, the crude protein, crude fat, amino acid, and fatty acid contents in the muscle of the hybrid were higher than in that of the parents. The hybrid also has higher edible and nutritional value than the parent species, and so has more obvious production advantages.

**Key words** *Acipenser baerii*; *Acipenser schrenckii*; Hybridization; Nutritional ingredient; Comparative analysis

① Corresponding author: ZHOU Jian, E-mail: zhoujian980@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210224006

http://www.yykxjz.cn/

姜燕, 李存玉, 徐永江, 柳学周, 于超勇, 王滨, 郑伟, 史宝. 池塘养殖牙鲆肠道和环境菌群结构对益生菌制剂的响应. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 137-146

JIANG Y, LI C Y, XU Y J, LIU X Z, YU C Y, WANG B, ZHENG W, SHI B. Responses of microbiota structure in the intestinal tract and pond culture environment of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to probiotics. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 137-146

## 池塘养殖牙鲆肠道和环境菌群结构 对益生菌制剂的响应\*



姜 燕<sup>1</sup> 李存玉<sup>2</sup> 徐永江<sup>1</sup> 柳学周<sup>1①</sup> 于超勇<sup>3</sup>  
王 滨<sup>1</sup> 郑 伟<sup>4</sup> 史 宝<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 2. 沂南县水利局 山东 临沂 276300; 3. 山东省海洋生物研究院 山东 青岛 266104; 4. 山东寰达生态环境科技有限公司 山东 日照 276826)

**摘要** 为研究益生菌制剂对池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肠道及环境菌群结构的调控效果, 采用高通量测序技术和生物信息学分析手段构建牙鲆肠道、养殖水体、饵料和池塘底泥的 16S rDNA 基因测序文库, 分析不同样品中菌群组成和多样性在益生菌制剂调控过程中的变化趋势。结果显示, 添加益生菌制剂后, 池塘底泥和牙鲆肠道的菌群多样性升高, 且池塘底泥的菌群多样性依然最高; 而养殖水体的菌群多样性明显下降, 并低于牙鲆肠道的。牙鲆肠道中的肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度呈上升趋势, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)相对丰度先上升后下降; 池塘养殖水体中 NS3a\_marine\_group 代表的菌属相对丰度先下降后上升; 底泥中芽孢杆菌属相对丰度变化最为明显, 由最初的 3.78%增加到 33.64%。养殖牙鲆肠道、养殖水体和底泥中的弧菌属(*Vibrio*)相对丰度在益生菌制剂添加后出现不同程度的降低。而在水产养殖中, 不动杆菌属和弧菌属中的部分菌株通常被认为是重要病原菌。说明益生菌制剂的添加能在一定程度上优化鱼体肠道和环境(养殖水体和池塘底泥)的菌群结构。相似性分析发现, 在饵料不变的条件下, 牙鲆肠道菌群结构与底泥的更相近; 且益生菌产品对池塘底泥和牙鲆肠道菌群的影响较为明显。本研究结果可为池塘养殖过程中微生态制剂筛选和使用提供参考。

**关键词** 高通量测序; 肠道菌群; 牙鲆; 池塘养殖; 益生菌制剂

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0137-10

\* 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0501-2)、中国水产科学研究院级基本科研业务费专项课题(2019XT0402, TD47)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022021011)和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 Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0501-2), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019XT0402, TD47), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022021011), and China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47)].

姜 燕, E-mail: jiangyan@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2021-02-24, 收修改稿日期: 2021-04-02

海水鱼类池塘高密度养殖条件下,以 N、P 为主的污染性代谢产物容易积累,一旦超过养殖池塘自身净化能力,将导致养殖鱼类、微生物和环境三者所构成的动态平衡状态的失调,极易暴发各种疾病。在我国大力推行绿色养殖的背景下,对待水产生物疾病的主要措施从以“治疗”为主逐渐转变为以“防控”为主,因此,益生菌及其制剂、疫苗等生物防治方式备受关注(丁贤等, 2004; Merrifield *et al.*, 2010; Luis-Villaseñor *et al.*, 2011; Buruiană *et al.*, 2014; 徐奇友等, 2017)。益生菌制剂主要通过微生物的生态调控作用有效抑制外源菌群的入侵以维持生态环境内菌群的动态平衡,实现无机氮、磷等污染物质的降解、转化和再利用,构建良性循环的养殖生态系统。

目前,水产养殖领域常用的益生菌包括光合细菌、芽孢杆菌、硝化细菌、乳酸菌、EM 菌等,以单一或复合添加的方式应用于养殖环境的调控(丁贤等, 2004; Buruiană *et al.*, 2014)。芽孢杆菌和乳酸菌是应用较为广泛的一类益生菌,合理使用可以有效改善养殖水环境质量,并维持养殖水生动物消化道微生物的生态平衡,提高养殖动物消化和免疫能力,促进动物生长(Merrifield *et al.*, 2010; Luis-Villaseñor *et al.*, 2011; 徐奇友等, 2017)。在鱼类养殖应用方面,已有研究表明,芽孢杆菌在调控养殖水质(李健等, 2001; Fu *et al.*, 2017; 张翠绵等, 2017)、促进养殖鱼类生长(华雪铭等, 2001; Merrifield *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; 徐奇友等, 2017)和调控养殖鱼类肠道菌群(Jiang *et al.*, 2019b)等方面都起到了较好的效果。目前,国内外利用益生菌等进行海水鱼类池塘养殖方面的应用研究较少。

本团队前期研制了一种益生菌制剂,发现其能有效降解池塘养殖水体中的氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐(李存玉等, 2017)。本研究应用该益生菌制剂对池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肠道和环境菌群结构进行调控,以期揭示养殖水体和底泥沉积物以及肠道中的微生物群落变化规律与益生菌制剂调控的关系,为开发牙鲆池塘高密度养殖专用益生菌制剂和环境微生态调控技术提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验管理

益生菌制剂添加实验于 2013 年 9—10 月在山东省日照市水利养殖场(35.29°N, 119.44°E)进行,选择面积同为 3300 m<sup>2</sup>,且同为泥沙底质的 2 口养殖池塘,水深为 2.0 m,分别设为实验组和对照组。池塘内养

殖牙鲆平均体重为(282.0±24.23) g,平均体长为(28.3±1.93) cm,养殖密度均为 4.5 尾/m<sup>2</sup>。以鲜杂鱼为饵料,每天投喂 2 次,投喂量为养殖鱼体重的 3%~5%,每天换水 50%。实验期间,池塘养殖水体的水质指标:水温为 21℃~23℃,盐度为 27~29,溶解氧(DO)≥5 mg/L, pH 为 7.8~8.7。

实验所使用的益生菌制剂为本实验室与日照市生态环境研究所联合制备的产品,主要成分为肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等有益微生物,有效活菌数不低于 1.0×10<sup>9</sup> CFU/g。在前期预实验的基础上制定益生菌制剂的施用策略:按照池塘水体 1.0×10<sup>5</sup> CFU/mL 的添加量全池泼洒,每天上午添加 1 次,下午换水后补充 1 次,连续添加 10 d,在第 11~15 天继续追踪相关数据,实验共持续 15 d;实验期间,对照池塘不添加益生菌制剂,只追踪相关数据。

### 1.2 样品采集

在实验第 1 天添加益生菌制剂前、添加益生菌制剂后(第 5、10、15 天)分别对 2 个池塘的水体、底泥和养殖鱼肠道进行样品采集,分析样品中微生物菌群结构的变化。每次在上午投喂前,完成各种生物样本的采集,采集方法如下:

肠道样品:每次随机捞取 6 尾体表无任何生理学病症的健康牙鲆,采用 MS-222 (Fluka, 美国)麻醉后置于冰上,无菌条件下解剖,取其完整肠道,轻轻挤出肠道内残留的食糜,用预冷的无菌水冲洗肠道数次,分装于无菌离心管中,并迅速放入液氮中保存。

底泥样品:用采泥器采集池塘底泥,采集点分别位于进水口、排水口和增氧机附近,每处采集 3 次样品,将采集的每个池塘的底泥样品充分混匀,并分装于无菌离心管中,立即放入液氮中保存。

养殖水样:用透明的卡盖式采水器采集池塘水样,分别于池塘进水口、排水口和增氧机附近采集中层水样,每处采集 3 次样品,将采集的每个池塘的水样充分混匀,混匀后水样保留 3 L,经 0.22 μm 的滤膜真空抽滤后,将滤膜置于无菌离心管中,放入液氮保存。

饵料样品:实验期间,投喂的鲜杂鱼为购买的同批货源,使用无菌器械从中随机取完整鱼体 5~8 尾(全长为 10 cm 左右),无菌条件下剪成小段,液氮速冻后研磨成粉状,充分混匀并平均分装于无菌离心管中,液氮保存。

实验期间,将每次采集的样品进行编号、分类保存,具体采样时间与分类编号情况见表 1。

表1 样品采集统计表

组别		样品	样品编号 Sample code			
Group	Sample		1 d	5 d	10 d	15 d
实验池塘 Experimental pond	肠道 Intestinal tract		EG1	EG5	EG10	EG15
	底泥 Pond sediment		EM1	EM5	EM10	EM15
	水 Culture water		EW1	EW5	EW10	EW15
对照池塘 Control pond	肠道 Intestinal tract		G1	-	-	G15
	底泥 Pond sediment		M1	M5	-	M15
	水 Culture water		W1	W5	-	W15
饵料 Feed	鲜杂鱼 Fresh fish		F	-	-	-
益生菌制剂 Probiotics	益生菌制剂 Probiotics		P	-	-	-

### 1.3 样品微生物总 DNA 提取及高通量测序

将样本从液氮中取出,其中,肠道样本在液氮条件下研磨,每个池塘的6个平行样本充分混匀,取一小部分样品按照土壤微生物DNA提取试剂盒(OMEGA,美国)说明书进行微生物总DNA提取;其余样本置于冰上自然解冻后,参照说明书提取微生物总DNA。针对微生物16S rDNA V3~V4可变区设计含barcode的特异引物(338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3',806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),并进行PCR扩增。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒(Axygen,美国)切胶回收PCR产物,并构建测序文库,采用Miseq平台进行高通量测序。

### 1.4 测序数据生物信息学分析

高通量测序数据的分析:利用uparse(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>)软件平台对处理后的序列进行聚类操作,采用RDP classifier(v2.2)对相似水平高于97%的可操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)代表序列进行归类分析,并在各个水平上统计每个样品的群落组成;利用Mothur(version v.1.30.1 [http://www.mothur.org/wiki/Schloss\\_SOP#Alpha\\_diversity](http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity))进行稀释性曲线分析;分别利用香农指数(Shannon)和物种丰富度指数(ACE)评估微生物多样性;利用R语言进行主成分分析。利用Excel 2016软件对菌群多样性和相对丰度进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品微生物多样性水平分析

通过高通量测序与分析,平均每个样本获取15400条

有效序列,结合稀释性曲线可以看出,实验样品的测序结果是可靠的(图1)。各样品中微生物多样性由高到低依次为池塘底泥、牙鲈肠道、池塘水样、饵料、益生菌制剂。其中,池塘底泥样品的香农指数为4.96、物种丰富度指数为746,均为最高值,说明微生物多样性最高;同时,随着实验的开展,池塘底泥样品的香农指数和物种丰富度指数均呈先下降后上升的趋势,第15天的多样性指数均高于第1天。池塘水体中的微生物多样性呈先下降后上升的趋势,而肠道中微生物多样性的变化较大,整体呈上升趋势。益生菌制剂样品的香农指数和物种丰富度指数分别为1.64和80.7,均为最低值,说明微生物多样性最低(图2)。

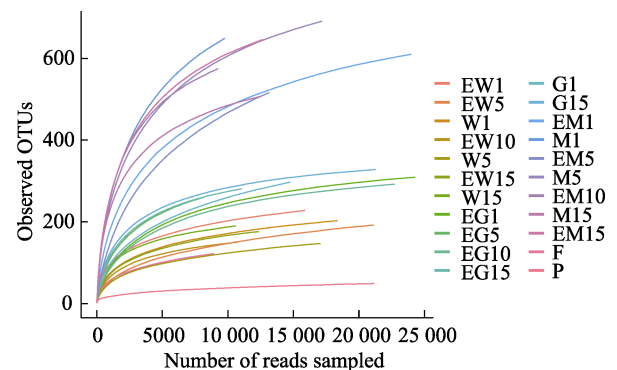


图1 实验样品菌群稀释性曲线

Fig.1 Rarefaction curve of microbiota in all samples

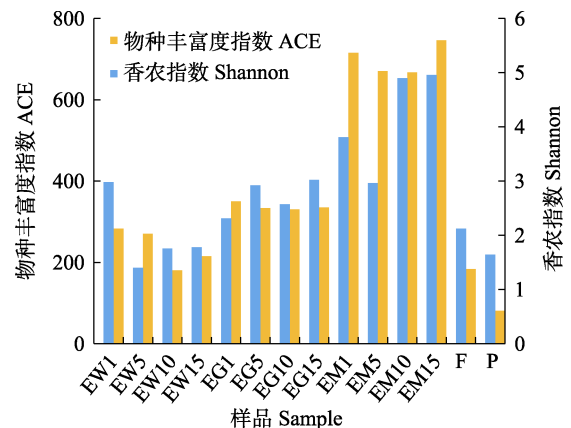


图2 基于16S rDNA基因序列的微生物多样性指数

Fig.2 Microbiota diversity index based on 16S rDNA gene sequences

### 2.2 实验池塘的牙鲈肠道、养殖水体和底泥中菌群结构的变化

在门水平上,厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteria)为牙鲈肠道主要的优势菌群,随着实验地进行,变形菌门、厚壁菌门相对丰度增大,梭杆菌门则相反(图3)。蓝藻门

(Cyanophyta)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门为养殖池塘水体中主要菌群,添加益生菌制剂后,蓝藻门相对丰度先上升后下降,与拟杆菌门相对丰度变化完全相反,变形菌门相对丰度则逐渐下降。变形菌门和厚壁菌门为池塘底泥的主要优势菌群,随着实验地进行,变形菌门呈先下降后上升的趋势,而厚壁菌门则相反。

在属水平中,益生菌制剂中芽孢乳杆菌属、肠杆菌属、乳杆菌属为主要的菌群(图 4)。池塘养殖牙鲆肠道样品中,随着实验地进行,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属的相对丰度逐渐升高,在第 15 天时,仍可检测到肠杆菌属;军团杆菌属(*Legionella*)相对丰度由 2.95%增加到 7.19%,不动杆菌属(*Acinetobacter*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)和弧菌属(*Vibrio*)相对丰度呈先上升后下降的趋势。池塘养殖水体中的 NS3a\_marine\_group 相对丰度先下降后上升。池塘底泥中,芽孢杆菌属的相对丰度在添加益生菌制剂的第

10 天,由最初的 3.78%增加到 33.64%,之后明显下降;脱硫叠球菌属(*Desulfosarcina*)由最初的 3.34%先下降后迅速增加到 8.62%;不动杆菌属相对丰度在添加益生菌制剂的第 5 天,由最初的 0.01%增加到 13.15%,随后大幅下降,至第 15 天时检测不到;*Marinicella* 相对丰度由 10.95%先下降,再上升至 2.87%。牙鲆肠道、养殖水体和底泥中的弧菌属相对丰度均呈现不同程度的下降趋势。另外,在添加益生菌制剂的第 5 天,检测到底泥样品中出现肠杆菌属(0.11%),第 10 天相对丰度为 0.05%,但在第 15 天(停止添加益生菌的第 5 天)时,底泥样品中检测不到肠杆菌属。

### 2.3 对照池塘牙鲆肠道、养殖水体和底泥菌群结构的变化

实验过程中,对照池塘养殖牙鲆肠道优势菌属中 Candidate\_division\_WS6-norank 代表的菌属相对丰度

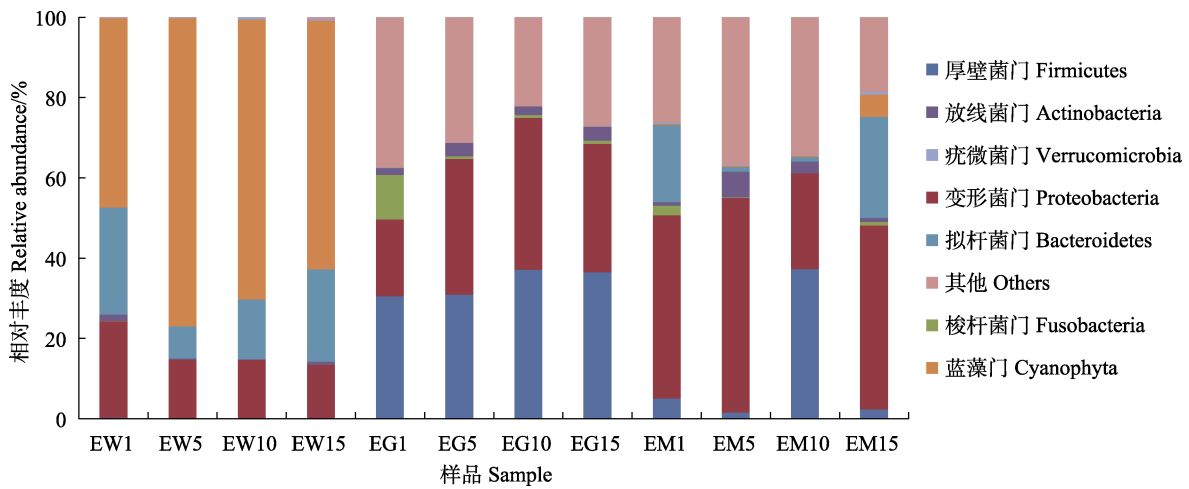


图 3 实验过程中水体、牙鲆肠道和底泥样品中的优势菌门  
Fig.3 Dominant phyla in culture water, intestinal tract and pond sediment during the experiment

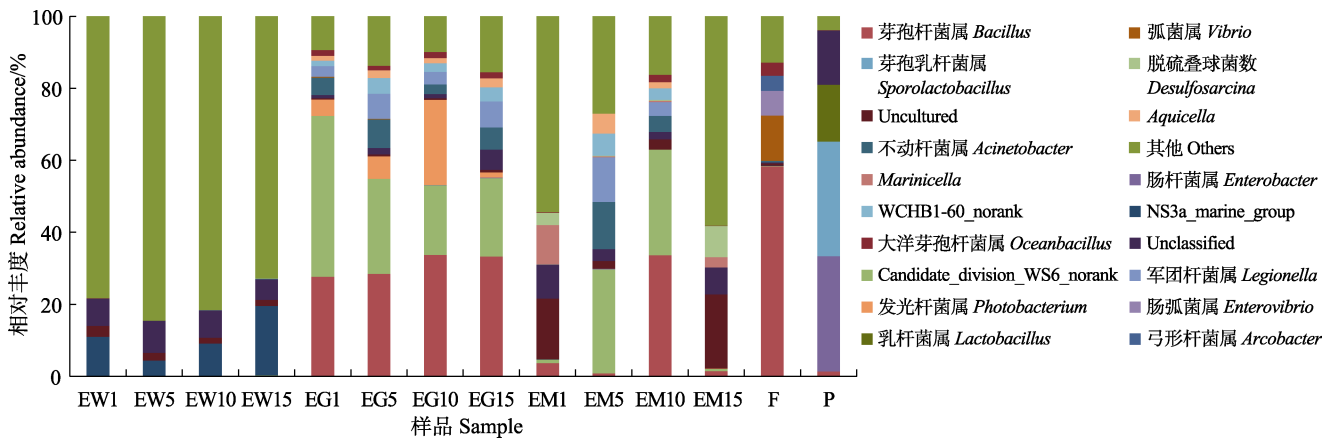


图 4 实验过程中各样品中优势菌属结构特征  
Fig.4 Dominant genera in all kinds of samples during the experiment



降低了 40.98%, 芽孢杆菌属相对丰度相对稳定, 发光杆菌属、不动杆菌属、军团杆菌属等优势菌属的相对丰度分别提高 35.46%、64.05%和 134.58% (图 5 I)。实验开始时, 实验池塘和对照池塘水体中的优势菌属组成结构相近, 随着实验地进行, 对照池塘水体中优势菌属的相对丰度变化较大, 其中, NS3a\_marine\_group、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、交替单

胞菌属(*Alteromonas*)的相对丰度变化较为明显, 整体呈先下降后上升的趋势(图 5 II)。同样, 实验开始时, 实验池塘和对照池塘底泥中的优势菌属组成结构相近, 随着实验地进行, 池塘底泥中 *Marinicella*、芽孢杆菌属、Candidate\_division\_WS6\_norank 等相对丰度变化较为明显, 其中, *Marinicella* 的相对丰度先上升后下降, 而芽孢杆菌属则完全相反(图 5 III)。

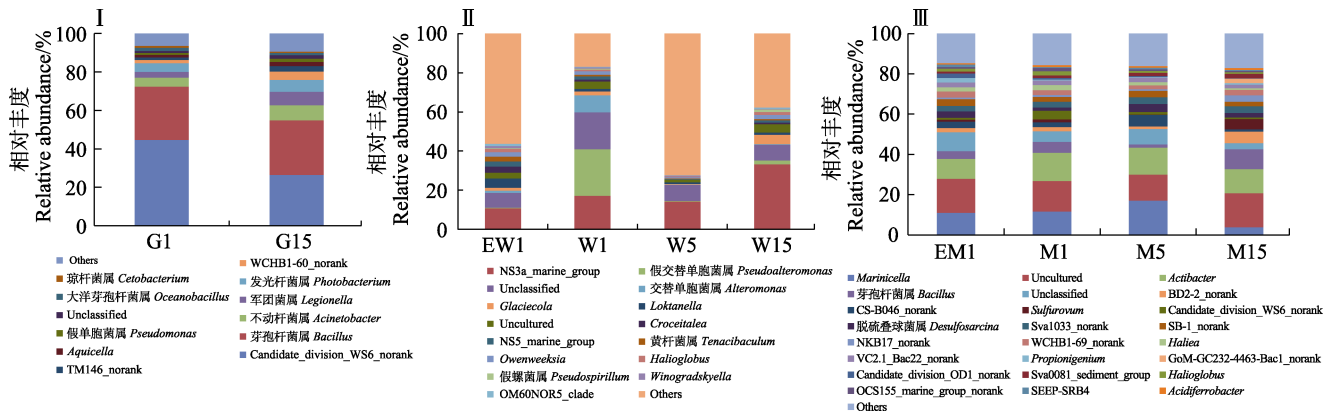


图 5 对照组牙鲈肠道 G1 与 G15 (I)、池塘水(II)、和底泥(III)优势菌属结构特征

Fig.5 Structure of the dominant genera of intestinal tracts G1 and G15 (I), culture water (II) and pond sediment (III) in the control group

### 2.4 池塘养殖牙鲈肠道菌群结构的主要影响因素

通过主成分分析(PCA)可以看出, 主成分 1 (PC1) 的贡献率为 55.98%, 远高于主成分 2 (PC2) 的 22.97%; 牙鲈肠道样品与饵料、底泥间的距离更为相近, 说明肠道中的菌群组成与饵料和底泥的相似; 同时, 与池塘水体相比, 池塘底泥样品与益生菌产品更为相近, 说明益生菌产品对池塘底泥微生物组成影响较大(图 6)。

在属水平上, 通过对各样品中菌群的组成与丰度信息进行分析, 可以看出, 牙鲈肠道样品与饵料和底

泥中的菌群组成更为相近, 其次是水环境样本, 而益生菌制剂与牙鲈肠道菌群组成相似性最小(图 7)。但益生菌制剂与底泥和水环境中菌群组成较为相近。说明益生菌产品对除饵料外的牙鲈养殖环境中的菌群影响较大。

## 3 讨论

### 3.1 微生物多样性变化

微生物多样性指数显示, 在添加益生菌制剂以后, 池塘水样和底泥样品微生物多样性呈先下降后升高的趋势, 养殖环境中菌群结构也发生了明显的改变, 这与王新等(2014)对微生态制剂改善虾池水质及微生物群落的研究结果一致。添加益生菌制剂初期, 池塘水体和底泥中微生物多样性降低, 一方面可能是添加的菌种大量繁殖, 抑制了某些定植菌的生长(张睿等, 2014); 另一方面可能是添加的益生菌虽然本身繁殖数量有限, 但可直接或间接的导致某些定植菌成为优势菌, 并抑制某些丰度极低的定植菌生长繁殖, 改变原有的菌群结构, 导致微生物多样性降低。在菌群结构与组成信息方面, 实验中施用的益生菌制剂主要由肠杆菌属和乳杆菌属等组成, 然而, 这些菌属在养殖牙鲈池塘水体和底泥中检出量极低(图 4), 表明前期微生物多样性下降的原因应为后者。添加益生菌制

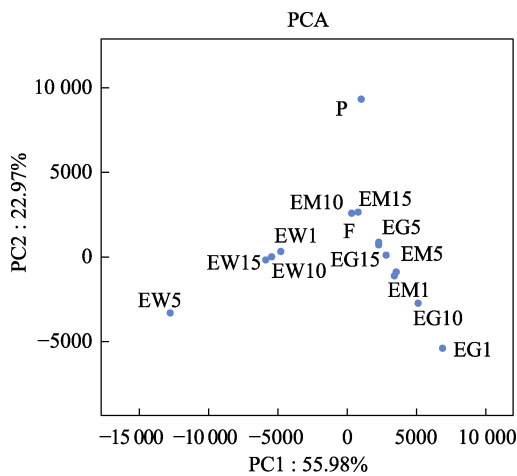


图 6 不同样品主成分分析

Fig.6 Principal components analysis (PCA) of different samples

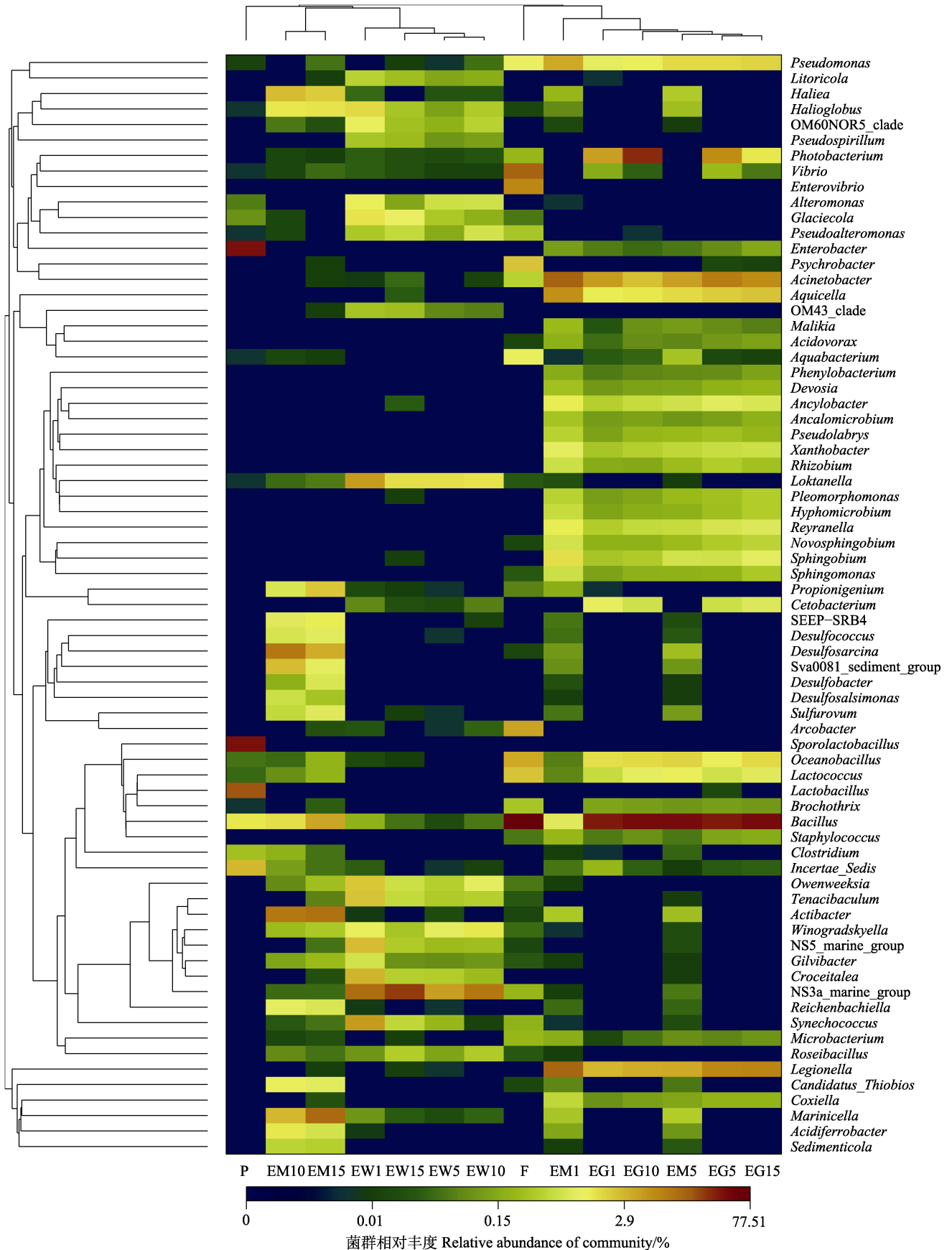


图 7 基于菌群相对丰度的 Heatmap

Fig.7 Heatmap of relative abundances of microbiota

剂后期, 池塘系统通过自我调节作用, 使得菌群结构维持在一个新的平衡状态, 微生物多样性升高。牙鲈肠道样品中微生物多样性相对比较稳定, 这可能是因为相对于池塘水体和底泥, 肠道为其定植微生物提供了一个相对封闭的微生态环境, 通过宿主的生理功能, 使肠道菌群具有能维持其定植后平衡状态的内在机制, 可抵御外部环境对其菌群结构造成的影响。

### 3.2 牙鲈肠道和环境菌群结构变化分析

本研究显示, 添加益生菌制剂后, 池塘水体中蓝藻门细菌相对丰度增加, 蓝细菌是能进行光合作用的大型原核微生物, 其相对丰度的增加在一定程度上提高了养殖水体中 DO 的含量, 能有效降低高密度集约化养殖条件下因缺氧引起的生产风险。池塘底泥中芽孢杆菌属的变化最为明显, 其相对丰度的增加有助于提高养殖鱼对饵料的利用率及其生长性能(Bairagi *et al.*, 2004); 添加益生菌制剂期间, 底泥中能检测到肠杆菌属, 停止添加益生菌制剂后检测不到肠杆菌属菌群, 研究表明, 底泥中的肠杆菌属来自添加的益生菌制剂(图 4), 之后经分离鉴定发现, 其为产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)(待发表)。关于产气肠杆菌的研究既有其致病性方面的报道(徐风亮等, 2007), 也有关于其通过发酵生产有用生物衍生品[乳酸、生物氢、多羟基烷酸酯(PHA)、鼠李糖酯等]、降低发酵成本等方面的报道(徐忠义等, 2011; Arumugam *et al.*, 2014、2020; Song *et al.*, 2020)。不动杆菌属在医学界被认为是重要的病原菌(Lynch *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017); 在鱼类养殖中也分离得到一些不动杆菌属的菌株(*A. baumannii*、*A. lwoffii*、*A. pittii* 和 *A. Schindleri* 等), 并且其中的某些致病种类能够耐受多种药物(Reddy *et al.*, 2013; Kozińska *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017)。弧菌属中的大部分菌株在水产养殖中被认为是常见的病原菌(Baker-Austin *et al.*, 2018; 胡秀彩等, 2019)。本研究中, 对照池塘牙鲈肠道中弧菌属、不动杆菌属等相对丰度明显升高, 而这些菌属相对丰度在实验池塘牙鲈肠道中则出现一定程度的降低; 同时, 实验池塘牙鲈肠道中的中肠杆菌属相对丰度升高。这可能是因为益生菌制剂中的部分微生物虽然不能在肠道中成功定植, 但是, 它们能通过产物抑制等作用一定程度调控肠道菌群的稳态; 并且能在肠道中定植的部分益生菌通过营养竞争、粘附位点竞争等模式有效抑制有害菌的繁殖。虽然牙鲈肠道内定植有弧菌、不动杆菌等多种病原菌, 并且实验过程中不动杆菌属的相对丰度在一定阶段内有所升高, 但鱼体始终未出现任何病症, 活力也非常好, 说明健康鱼体内有

病原菌的存在属正常现象(Reddy *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2019a; 姜燕等, 2020)。在正常鱼体的生理活动中, 这些病原菌的丰度在安全范围内, 并且鱼体内的微生态处于平衡状态。在添加益生菌制剂期间, 养殖鱼肠道内能检测到乳杆菌, 但其在牙鲈肠道中的相对丰度小、变化不稳定, 而肠杆菌属相对丰度升高, 反应出定植菌(肠杆菌属)和外源菌(乳杆菌属)在肠道中相对丰度变化的本质区别, 也表明肠道菌群具有维持其定植后平衡状态的本质。Skjermo 等(2015)将从大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)肠道内分离得到的益生菌通过水和饵料 2 种途径进行添加, 结果均未在鲑鱼肠道内检测到该菌。Jiang 等(2019b)以生物饵料为载体进行大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼源益生菌的添加, 发现益生菌虽未在大菱鲆仔稚幼鱼消化道中成功定植, 但其益生作用却成功传递到了仔稚幼鱼消化道中。同样, 在本研究中, 虽然益生菌制剂中的部分菌群未能在池塘各个容纳体(牙鲈、水和底泥)中成功定植, 但它们优化菌群结构的“益生”功能却得以有效传递。再者, 益生菌制剂中肠杆菌属的部分菌株为亚硝化反硝化聚磷菌, 被广泛应用于废水处理(张立成等, 2012)。可能也正是由于益生菌或其制剂的“益生”作用, 一方面改善牙鲈肠道菌群结构, 一定程度促进饲料蛋白营养的有效利用, 降低 N、P 排放; 另一方面, 益生菌本身参与到池塘养殖环境中 N、P 的降解过程, 最终使得池塘水体中 N、P 化合物(氨氮、磷酸盐等)的浓度得到有效降解。本研究认为, 一定浓度的益生菌制剂能直接或间接的影响鱼体肠道和池塘环境中菌群结构, 改善养殖环境质量, 短期效果明显, 在投喂饵料没有改变的情况下, 可加强养殖环境对牙鲈的影响, 引起牙鲈肠道菌群结构的改变, 促进牙鲈健康生长。

益生菌制剂对水产养殖动物的调控是一个复杂的过程。本研究中, 对照组池塘水环境菌群结构变化较大, 但改变属于自然水体的正常波动, 而实验组池塘水体中的优势菌属的组成在整个实验过程中相对比较稳定, 说明益生菌制剂的施用有助于养殖水环境微生物群结构的统一与稳定。对照组池塘底泥中的菌群结构相对比较稳定, 而施用益生菌制剂后底泥中菌群结构变化较明显, 尤其是芽孢杆菌属、脱硫叠球菌属等相对丰度的迅速变化, 表明益生菌制剂对池塘底泥菌群具有一定的调控作用。对照组池塘养殖牙鲈肠道菌群结构也出现一定程度的变动, 也表明了牙鲈肠道定植菌群结构虽然会同环境菌群一起出现波动, 但是这些波动在平衡状态的范围之内, 反映了肠道对其定植菌群平衡状态的维护功能; 实验组池塘养殖牙鲈

肠道菌群结构的动态变化表明了益生菌制剂的重要调控作用。本研究设置了对照组的横向比较及实验组添加益生菌制剂前后的纵向比较,使数据具有说服力,通过对牙鲆肠道及生长环境中微生物种类、数量变化及相关影响因子的测定,初步分析了益生菌制剂对池塘养殖牙鲆肠道菌群的调控机制。可能正是由于这种调控作用,使养殖牙鲆对饵料的消化吸收能力得以提高,从而排放到养殖水体中的氨氮、亚硝酸盐等的含量减少,促进水产绿色养殖的发展。对于益生菌制剂调控过程中,池塘养殖牙鲆消化和免疫等理化因子的应答变化及机制是今后研究的重点内容,将从多角度综合解析益生菌制剂的调控机制。

### 参 考 文 献

- ARUMUGAM A, FURHANA S M. Bioconversion of *Calophyllum inophyllum* oilcake for intensification of rhamnolipid and polyhydroxyalkanoates co-production by *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, 2020, 296: 122321
- ARUMUGAM A, SANDHYA M, PONNUSAMI V. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 170–176
- BAIRAGI A, SARKAR GHOSH K, SEN S K, *et al.* Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 2004, 35: 436–446
- BAKER-AUSTIN C, OLIVER J D, ALAM M, *et al.* *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 1–19
- BURUIANĂ C T, PROFIR A G, VIZIREANU C. Effects of probiotic *Bacillus* species in aquaculture—An overview. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI—Food Technology*, 2014, 38(2): 9–17
- DING X, LI Z J, CHEN Y Q, *et al.* Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes *Pennaus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(6): 580–584 [丁贤, 李卓佳, 陈永青, 等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 580–584]
- FU G, RUAN B, ZHU J, *et al.* Nutritional conditions for application of *Bacillus* in Intensive aquaculture of shrimp. *Agricultural Science and Technology*, 2017, 18(6): 1029–1032
- HU X C, WANG Y J, LÜ A J, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from *Cynoglossus semilaevis* and establishment of fluorescence quantitative PCR technique. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1359–1368 [胡秀彩, 王英杰, 吕爱军, 等. 半滑舌鳎创伤弧菌分离鉴定及其荧光定量 PCR 方法的建立. *水产学报*, 2019, 43(5): 1359–1368]
- HUA X M, ZHOU H Q, QIU X Z, *et al.* Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast on the growth and disease resistance of allogynogenetic crucian carp. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(5): 448–453 [华雪铭, 周洪琪, 邱小琮, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响. *水产学报*, 2001, 25(5): 448–453]
- JIANG Y, LIU Z, LIU X, *et al.* Structural characteristics and succession of intestinal microbiota for *Paralichthys olivaceus* during the early life stage. *Aquaculture Research*, 2019a, 50: 529–540
- JIANG Y, WANG Y, ZHANG Z, *et al.* Responses of microbial community structure in turbot (*Scophthalmus maximus*) larval intestine to the regulation of probiotic introduced through live feed. *PLoS ONE*, 2019b, 14(5): e0216590
- JIANG Y, XU Y J, YU C Y, *et al.* Analysis of microbiota structure, digestive enzyme and nonspecific immune enzyme activity in the gastrointestinal tract of large yellow croaker. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 61–72 [姜燕, 徐永江, 于超勇, 等. 大黄鱼消化道菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 61–72]
- KOZIŃSKA A, PAŹDZIOR E, PEKALA A, *et al.* *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii*—the emerging fish pathogens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58: 193–199
- LI C Y, LIU X Z, XU Y J, *et al.* Isolation, culture, and identification of two strains of probiotics and their effects on water quality control. *Progress in Fishery Sciences*, 2017a, 38(1): 120–127 [李存玉, 柳学周, 徐永江, 等. 两株有益菌的分离、培养、鉴定及其水质调控效果评价. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 120–127]
- LI J, CAO J, WANG X, *et al.* *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 6459–6471
- LI J, SUN X T, WANG Q, *et al.* Studies on the effects of probiotics in Crustacean's farming. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(2): 26–31 [李健, 孙修涛, 王群, 等. 微生态制剂在甲壳动物养殖中的应用研究. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 26–31]
- LIU C H, CHIU C H, WANG S W, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 699–706
- LUIS-VILLASEÑOR I E, MACÍAS-RODRÍGUEZ M E,

- GÓMEZ-GIL B, *et al.* Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2011, 321(1/2): 136–144
- LYNCH J P, ZHANEL G G, CLARK N M. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2017, 38(3): 311–325
- MERRIFIELD D L, DIMITROGLOU A, FOEY A, *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 2010, 302(1/2): 1–18
- REDDY M R K, MASTAN S A. Emerging *Acinetobacter schindleri* in red eye infection of *Pangasius sutchi*. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 12(50): 6992–6996
- SKJERMØ J, BAKKE I, DAHLE S W, *et al.* Probiotic strains introduced through live feed and rearing water have low colonizing success in developing Atlantic cod larvae. *Aquaculture*, 2015, 438: 17–23
- SONG W, DING L, LIU M. Improving biohydrogen production through dark fermentation of steam-heated acid pretreated *Alternanthera philoxeroides* by mutant *Enterobacter aerogenes* ZJU1. *Science of the Total Environment*, 2020, 716: 134695
- WANG X, WU Y F, YAO X H, *et al.* Effect of probiotics on water quality and bacterial community in shrimp pools at later stage of cultivation. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2014, 26(1): 40–47 [王新, 吴逸飞, 姚晓红, 等. 微生态制剂对养殖后期虾池水质及细菌群落的影响. *浙江农业学报*, 2014, 26(1): 40–47]
- WONG D, NIELSEN T B, BONOMO R A, *et al.* Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(1): 409–447
- XU F L, WU P, REN Q X. The clinical manifestation and drug sensitive of *Enterobacter aerogenes* in lower respiratory tract infection. *Medical Laboratory Science and Clinics*, 2007, 18(3): 52–54 [徐凤亮, 吴鹏, 任清霞. 产气肠杆菌下呼吸道感染的临床和耐药检测分析. *医学检验与临床*, 2007, 18(3): 52–54]
- XU Q Y, WANG J G, WANG L S, *et al.* Effect of *Bacillus megaterium* to plant protein meal on digestive enzyme activity and intestinal morphology of juvenile hybrid sturgeon. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2017, 48(5): 50–57 [徐奇友, 王金革, 王连生, 等. 巨大芽孢杆菌对杂交鲟消化酶活性和肠道形态影响. *东北农业大学学报*, 2017, 48(5): 50–57]
- XU Z Y, WANG X L, YAN Q J, *et al.* Optimization of fermentation conditions on lactic acid production from sucrose by *Enterobacter aerogenes*. *China Brewing*, 2011, 1: 78–81 [徐忠义, 王新磊, 闫巧娟, 等. 产气肠杆菌发酵蔗糖产乳酸条件的优化. *中国酿造*, 2011, 1: 78–81]
- ZHANG C M, JIA N, HU D, *et al.* Screening and application of compound bacillus for purifying freshwater aquaculture sediment. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(2): 1281–1286 [张翠绵, 贾楠, 胡栋, 等. 淡水养殖底泥净化复合芽孢杆菌的筛选与应用. *环境工程学报*, 2017, 11(2): 1281–1286]
- ZHANG L C, LI Y M, YUAN Y S, *et al.* Research on the screening and characteristics of nitrosation denitrifying dephosphorization of five strains of phosphate accumulating organisms. *Industrial Water Treatment*, 2012, 32(4): 33–35 [张立成, 李艳美, 袁雅姝, 等. 5株聚磷菌的筛选与亚硝化反硝化除磷特性研究. *工业水处理*, 2012, 32(4): 33–35]
- ZHANG R, WANG G J. Advance of control Cyanobacteria bloom with *Bacillus* in aquaculture. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(29): 27–31 [张睿, 王广军. 芽孢杆菌防控水产养殖中蓝藻水华的研究进展. *中国农学通报*, 2014, 30(29): 27–31]

(编辑 马璀璨)



## Responses of Microbiota Structure in the Intestinal Tract and Pond Culture Environment of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) to Probiotics

JIANG Yan<sup>1</sup>, LI Cunyu<sup>2</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>, LIU Xuezhou<sup>1①</sup>, YU Chaoyong<sup>3</sup>,  
WANG Bin<sup>1</sup>, ZHENG Wei<sup>4</sup>, SHI Bao<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Yinan County Water Conservancy Bureau, Linyi, Shandong 276300, China;

3. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104, China;

4. Shandong Huanda Ecological Environment Technology Co. LTD, Rizhao, Shandong 276826, China)

**Abstract** The deterioration of the aquaculture environment and disease outbreaks occur often in high-density pond cultures of fish. Probiotics are the main and efficient method to regulate the microbiota of the fish intestinal tract and pond water environments, which will improve aquaculture conditions and reduce the incidence of diseases. To investigate the effects of probiotics on the composition and diversity of microbiota in the intestinal tract and pond culture environment of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), samples from the Japanese flounder intestinal tract and environmental media (culture water, feed, and pond sediment) were collected. High-throughput sequencing of the 16S rDNA genes was performed to analyze the regulation of the microbiota of the intestinal tract and environmental samples by probiotics. Our results showed that the diversity of microbiota in the pond sediment and intestinal tract of Japanese flounder increased after the addition of probiotics, and was still in the pond sediment. Inversely, the diversity of the microbiota in the culture water declined, which was lower than that in the intestinal tract. Firmicutes, Proteobacteria, and Fusobacteria were dominant in the Japanese flounder intestinal tract, and the relative abundances of Firmicutes and Proteobacteria increased, whereas Fusobacteria decreased after the addition of probiotics. At the genus level, the relative abundances of *Enterobacter* and *Bacillus* increased, whereas *Acinetobacter* and *Photobacterium* first increased and then decreased in the intestinal tract. The relative abundance of genus represented by NS3a\_marine\_group firstly decreased and then increased in the Japanese flounder culture water. In the pond sediment, the change in the relative abundance of *Bacillus* was obvious, increasing from 3.78% to 33.64%. The relative abundances of *Vibrio* in the fish intestinal tract, culture water, and pond sediment decreased after the addition of probiotics. Some strains of *Acinetobacter* and *Vibrio* are important pathogens in aquaculture. The microbiota structure in the intestinal tract of Japanese flounder was similar to that in the pond sediment. Changes in the relative abundances of these main microbiota indicated that the addition of probiotics could optimize the microbiota structure of the Japanese flounder intestinal tract and environment. However, it is impossible that *Lactobacillus*, as the main microbiota of the probiotics, was able to colonize and persist in the fish intestinal tract, water, and pond sediment, which indicated that probiotics did not deliver bacteria but their probiotic function. Hence, the addition of probiotics could affect the microbiota structure of the Japanese flounder intestinal tract, water, and pond sediment.

**Key words** High throughput sequencing; Intestinal tract microbiota; *Paralichthys olivaceus*; Pond culture; Probiotics

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210125002

http://www.yykxjz.cn/

周钱森, 任宪云, 徐垚, 刘萍, 李健. 氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢酶和抗氧化酶活力的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 147-156

ZHOU Q S, REN X Y, XU Y, LIU P, LI J. Effects of ammonia stress on metabolic and antioxidant enzyme activities in *Panulirus ornatus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 147-156

# 氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢酶和 抗氧化酶活力的影响\*



周钱森<sup>1,2</sup> 任宪云<sup>2,3</sup> 徐垚<sup>2,4</sup> 刘萍<sup>2,3</sup> 李健<sup>2,3①</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 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 266071;

4. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005)

**摘要** 为了研究急性氨氮胁迫对锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)抗氧化系统及氨氮代谢机制的影响,通过设置对照[(0.24±0.07) mg/L]、低浓度[(1.04±0.08) mg/L]、中浓度[(9.75±0.21) mg/L]和高浓度[(19.87±0.46) mg/L]氨氮胁迫方法对锦绣龙虾进行 48 h 急性实验,测定鳃与肝胰腺中抗氧化及氨氮代谢酶的活性,同时测定相关基因 mRNA 的相对表达变化情况。结果显示,氨氮胁迫下锦绣龙虾鳃和肝胰腺组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化(SOD)活力有不同程度的升高,6~12 h 均显著高于对照组( $P<0.05$ );高浓度组胁迫 48 h 时 T-AOC、SOD 活力则均被抑制;过氧化脂质(LPO)含量随胁迫时间的延长逐渐增加,48 h 均显著高于对照组( $P<0.05$ )。氨代谢相关酶谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、谷草转氨酶(GOT)、黄嘌呤氧化还原酶(XOD)的酶活在氨氮胁迫下与对照组相比均有不同程度的上调,表明其共同参与离子氨的代谢转运。肝胰腺中 GDH、GOT 基因表达量在 12~24 h 显著高于对照组( $P<0.05$ ),在鳃组织中变化趋势基本相同。由此可见,不同浓度的氨氮胁迫会对锦绣龙虾抗氧化酶活性造成不同程度的诱导;锦绣龙虾主要通过肝胰腺 GS、GDH 等代谢相关酶的共同作用下合成无毒的谷氨酰胺以避免氨在体内过量积累。本研究结果可为锦绣龙虾氨解毒代谢机制的深入研究提供理论依据。

**关键词** 锦绣龙虾; 氨氮胁迫; 抗氧化; 氨代谢酶

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0147-10

近年来,随着养殖技术的快速发展及市场需求的增加,高密度集约化养殖已成为主流养殖模式,水体中残饵和排泄物使得氨氮超标成为一种常态化的环境

问题(Zhang *et al.*, 2018)。水体中氨氮以非离子氨(NH<sub>3</sub>)和铵离子(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)形式存在的氮,二者动态平衡,受水质的温度、盐度和 pH 等参数影响可相互转换(周平,

\* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900403)和中国水产科学研究院院级基本科研业务费(2020TD46)共同资助 [This work was supported by projects of the National Key R&D Program of China (2019YFD0900403), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 周钱森, E-mail: qiansenzhou@126.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-01-25, 收修改稿日期: 2021-02-25

2013; 蔡真珍等, 2015)。氮主要是以  $\text{NH}_3$  形式经鳃组织进入甲壳动物机体(Roumieh *et al.*, 2013)。氨氮中毒会导致甲壳动物免疫低下、生长迟缓, 同时伴随炎症反应和氧化应激等(Koo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2002)。研究发现, 由于环境胁迫因子改变诱导的生理效应可能经氧化还原途径实现(Romano *et al.*, 2007), 当机体受到氨氮胁迫且超出自身调节阈值时, 抗氧化系统被破坏, 机体清除活性自由基(reactive oxygen species, ROS)能力下降, 脂质过氧化物增加, 导致机体氧化损伤(Reinehr *et al.*, 2007)。

目前, 关于水产动物氨氮转运代谢机制的研究已有一定基础, 主要通过以下代谢途径减少生物体内氨氮的积累, 从而降低毒性: (1)通过谷氨酰胺合成途径, 如斑节对虾(*Penaeus monodon*) (周发林等, 2016)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (熊大林等, 2019)等可通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)等合成谷氨酰胺实现机体内氨的转运; (2)通过氨基酸代谢途径, 如大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) (杨洋等, 2019)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Chew *et al.*, 2001)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (孟振等, 2020)等通过相关转氨脱氢酶将氨转化为自由氨基酸储存; (3)通过鸟氨酸循环途径, 如中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (李少飞等, 2014)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (刘胜男等, 2015)等通过鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)结合精氨酸酶(arginase)等形成尿素; (4)通过嘌呤核苷酸分解途径, 如挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*) (Bernasconi *et al.*, 2011)等可经黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOD)等形成尿酸。

锦绣龙虾隶属于十足目(Decapoda)、腹胚亚目(Pleocyemata)、龙虾科(Palinoidea)、龙虾属(*Panulirus*) (梁华芳等, 2012)。锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)作为我国主要龙虾养殖品种之一, 经济价值高, 但其人工繁育尚未突破, 主要依靠捕捞野生苗种(Liu *et al.*, 2016; 梁华芳等, 2012), 利用适温的地下海水进行陆基工厂化流水养殖和循环水集约化养殖。高密度的养殖条件下, 氨氮已成为影响虾类正常生理代谢的重要环境因素之一。氨氮胁迫下, 甲壳动物解毒代谢机制方面的研究主要集中在谷氨酰胺合成酶、谷氨酸脱氢酶、谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, GOT)等(赵海涛, 2006; Qiu *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2020)。本研究侧重于锦绣龙虾的解毒代谢途径在氨氮胁迫下的响应机制, 测定了氨氮胁迫下锦绣龙虾鳃及肝胰腺组织中代谢关键酶 GS、GDH、GOT、XOD 活性和 *GDH*、

*GOT* 基因 mRNA 表达量、抗氧化酶总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化(SOD)活性及过氧化脂质(LPO)含量, 旨在为锦绣龙虾氨解毒代谢机制的深入研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用锦绣龙虾购于海南省琼海市永贺生物科技有限公司, 平均体长为(15.6±0.2) cm, 平均体重为(187.0±0.5) g, 暂养于黑色 PVC 桶中, 实验用水为过滤净化后的天然海水, 盐度为 32.57, 水温为 23.7℃, pH 为 8.14, 每日 07:00 更换砂滤海水, 连续充气, 10 d 后开始正式实验。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计** 实验浓度设置参考 Chen (1988) 和钟硕良等(1997)测定海水养殖池塘底层水的氨氮浓度(0~46 mg/L 和 0.01~29.3 mg/L)、Zhao(2020)关于氨氮对虾类生理免疫影响的汇总以及预实验结果, 选用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (分析纯,  $\text{RG} \geq 99.5\%$ ) 配置不同实验组的氨氮浓度, 分别为对照组(0.24±0.07) mg/L、低浓度组(1.04±0.08) mg/L、中浓度组(9.75±0.21) mg/L 和高浓度组(19.87±0.46) mg/L。采用奈氏试剂法测定各实验组实际氨氮浓度。每组 3 个平行, 每天 07:00 和 17:00 按照对应浓度梯度进行全换水, 实验期间不投饵。

**1.2.2 样品采集和处理** 在胁迫 0、6、12、24 和 48 h 时, 从每组的每个平行中随机挑选 3 尾龙虾, 快速解剖取得鳃、肝胰腺组织, 分别称取 0.2 g, 剪碎后加入 1:9 的预冷生理盐水, 超声波冰浴破碎, 4℃低温 4000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 置于-80℃冰箱保存, 用于酶活测定。剩余组织放于 1.5 mL EP 管投入液氮中储存, 用于基因 mRNA 表达量分析。

**1.2.3 氧化酶与氨氮代谢相关酶活性测定** 按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书测定 T-AOC、SOD、GS、GDH、GOT、XOD 酶活力和 LPO 含量。

### 1.3 基因 mRNA 的表达分析

**1.3.1 引物设计** 根据锦绣龙虾目的基因 cDNA 序列, 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 qRT-PCR 引物, 上述引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 其序列见表 1。

**1.3.2 RNA 提取** 使用总 RNA 提取试剂盒提取处理后组织 RNA, 核酸定量仪检测 RNA 浓度, 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

表 1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

基因 Gene	正反向引物 Forward and reverse primers (5'~3')
<i>GDH</i>	F: ACATTAACGCTGGAGGTGTGACTG R: CGAATCGCCGCTCAAGAGACTC
<i>GOT</i>	F: GTCTTGAATCTCCTCGGGCAGAAC R: CATCTCCACGCCATTCCACCAC
$\beta$ -actin	F: TTCCTCATGCTATCCTCCGTCTGG R: GCTCGGCGGTGGTTGTGAAG

**1.3.3 cDNA 第一链的合成** 组织 RNA 经过 RNA-free 的 DNA 酶消化后, 使用 HiScript<sup>®</sup> II Q RT superMix for qPCR(+g DNA wiper)试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。

**1.3.4 荧光定量 PCR 扩增** 按照 ChamQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Color qPCR master mix 说明书进行 PCR 扩增。反应体积 10  $\mu$ L: 5.0  $\mu$ L SYBR color qPCR master mix (2 $\times$ ), 4.0  $\mu$ L cDNA, 0.2  $\mu$ L Rox reference dye II (50 $\times$ ), 上下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 将上述试剂在 1.5 mL 离心管内混匀后, 分装入 96 孔 PCR 板中。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。每个样品 3 个重复,

加样完成后瞬时离心, 收集液体在管底, 在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算目的基因 *GDH*、*GOT* 的相对表达量。

## 1.4 数据分析

所有分析采用 SPSS 18.0.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 使用 OriginPro 2016 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨氮胁迫对锦绣龙虾氨氮代谢相关酶活性的影响

**2.1.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GS 活性的影响** 如图 1 所示, 对照组谷氨酰胺合成酶(GS)活性变化不显著( $P>0.05$ ), 各时间低、中浓度组鳃和肝胰腺 GS 活力点均显著高于对照组( $P<0.05$ ), 高浓度组 GS 活力在 48 h 受到显著抑制( $P<0.05$ )。不同浓度组鳃组织 GS 活性呈先升高后降低的变化趋势, 除 24 h 高浓度组与对照组无显著差异外( $P>0.05$ ), 其他时间点均有显著差异( $P<0.05$ )。不同浓度组肝胰腺 GS 活力均在 12 h 达到最大值, 随后低浓度组无明显变化趋势, 中、高浓度组呈下降趋势。

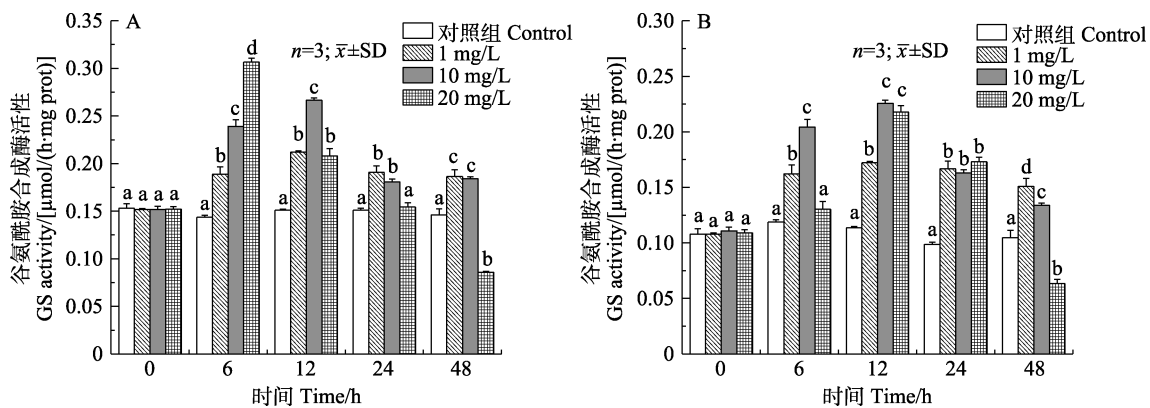


图 1 锦绣龙虾不同组织谷氨酰胺合成酶活性随氨氮胁迫时间的变化

Fig.1 Change of GS activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺。不同字母表示不同组之间差异显著( $P<0.05$ )。下同

A: Gill; B: Hepatopancreas. Different letters indicate significant difference in different groups ( $P<0.05$ ). The same as below

**2.1.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GDH 活性的影响** 如图 2 所示, 随着胁迫时间的延长, 中、高浓度组鳃和肝胰腺中的谷氨酸脱氢酶(GDH)活力呈先升高后降低的变化趋势。中浓度组鳃 GDH 活力在 12 h 达到最大值且显著高于其他组( $P<0.05$ ), 高浓度组在 48 h 时显著低于对照组( $P<0.05$ )。中、高浓度组肝胰腺 GDH 活力最大值分别出现在 6 h 和 12 h, 与对照组相比具有显著差异( $P<0.05$ )。

**2.1.3 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GOT 活性的影响** 如图 3 所示, 低浓度组鳃谷草转氨酶(GOT)活力在 6~48 h 变化规律不明显, 但与对照组均有显著差异( $P<$

0.05)。中浓度组呈先升高后下降的趋势, 高浓度组出现先降低后升高再降低的波浪式变化, 最大值均出现在 12 h 且显著高于对照组( $P<0.05$ )。48 h 高浓度组鳃 GOT 活力受到显著抑制( $P<0.05$ )。中浓度组肝胰腺 GOT 活力出现先升高后降低再升高的波浪式变化, 高浓度组呈先升高后下降的变化趋势。

**2.1.4 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 XOD 活性的影响** 如图 4 所示, 随着胁迫时间的延长, 各浓度组鳃黄嘌呤氧化酶(XOD)活力呈先上升后下降的变化趋势, 中、高浓度组 XOD 活力显著升高, 分别在 12、24 h 均达

到最大值且显著高于对照组( $P<0.05$ )。低、中浓度组各时间点肝胰腺 XOD 活力均显著高于对照组( $P<0.05$ )。

而高浓度组 6~24 h 均显著高于对照组( $P<0.05$ )，48 h 肝胰腺 XOD 活力受到显著抑制( $P<0.05$ )。

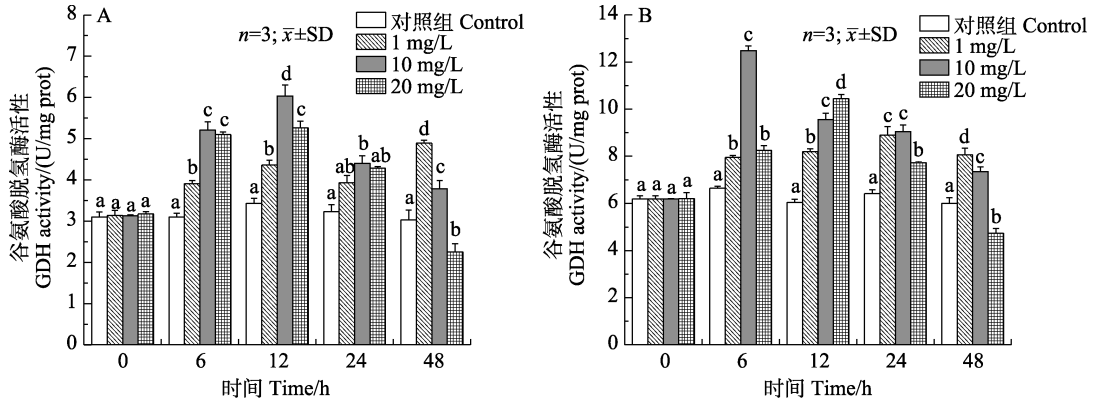


图2 锦绣龙虾不同组织谷氨酸脱氢酶活性随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.2 Change of GDH activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas

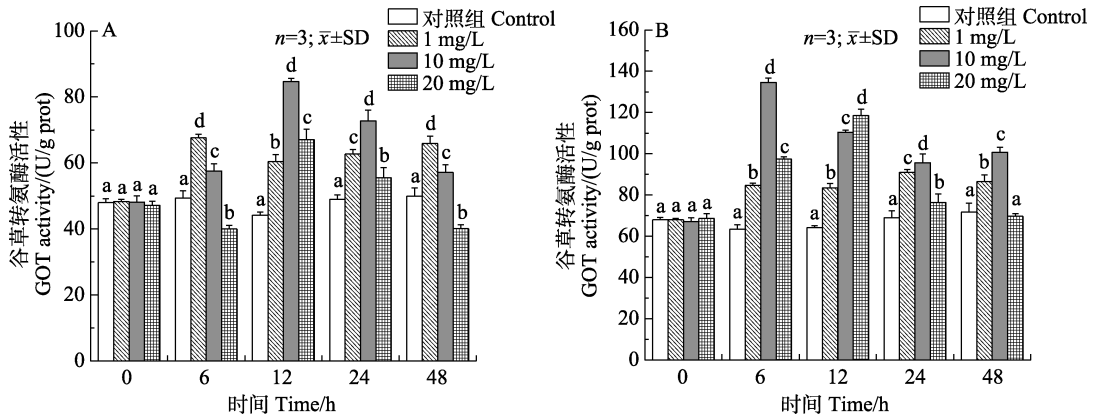


图3 锦绣龙虾不同组织 GOT 活性随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.3 Change of GOT activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas

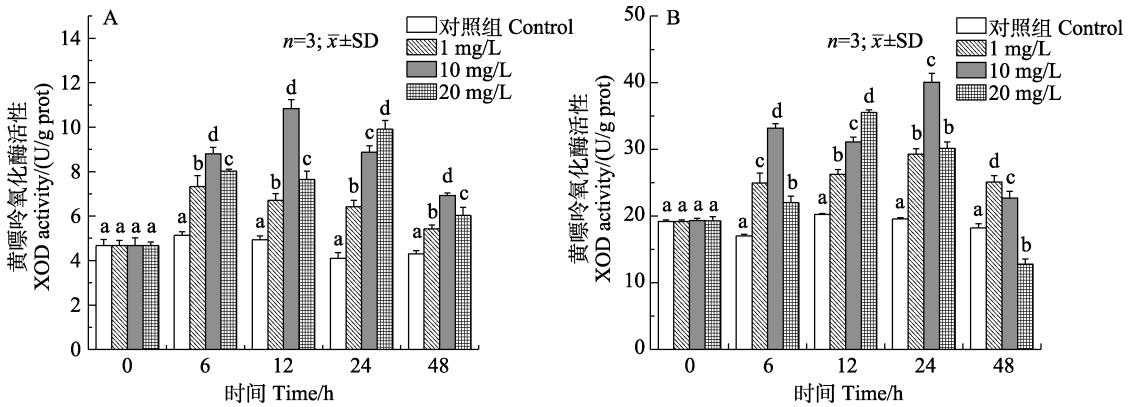


图4 锦绣龙虾不同组织黄嘌呤氧化酶活性随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.4 Change of XOD activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas



## 2.2 氨氮胁迫对锦绣龙虾氨氮代谢相关基因表达的影响

**2.2.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺中 GDH 基因表达的影响** 如图 5 所示, 各浓度组鳃和肝胰腺谷氨酸脱氢酶(GDH)基因相对表达量表现出明显的时效性。低、中浓度组鳃组织 GDH 相对表达量呈现先上升后下降再上升的变化趋势, 除 6 h 外, 各时间点均显著高于对照组( $P<0.05$ )。而高浓度组鳃组织 GDH 相对表达量则呈先上升后下降的趋势。不同浓度组肝胰腺 GDH 相对表达量均呈先上升后下降的变化趋势, 除 48 h

外, 各时间点均与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

**2.2.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺中 GOT 基因表达的影响** 如图 6 所示, 低、中浓度组鳃谷草转氨酶(GOT)基因的相对表达量呈先升高后降低再升高的波浪式变化, 高浓度组则出现先升高后下降的变化趋势, 除 6 h 外, 其余各时间点鳃 GOT 相对表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ )。随着胁迫时间的延长, 中、高浓度组肝胰腺 GOT 相对表达量最大值均出现在 12 h, 与对照组相比具有显著差异( $P<0.05$ ), 除 48 h 外, 各时间点均与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

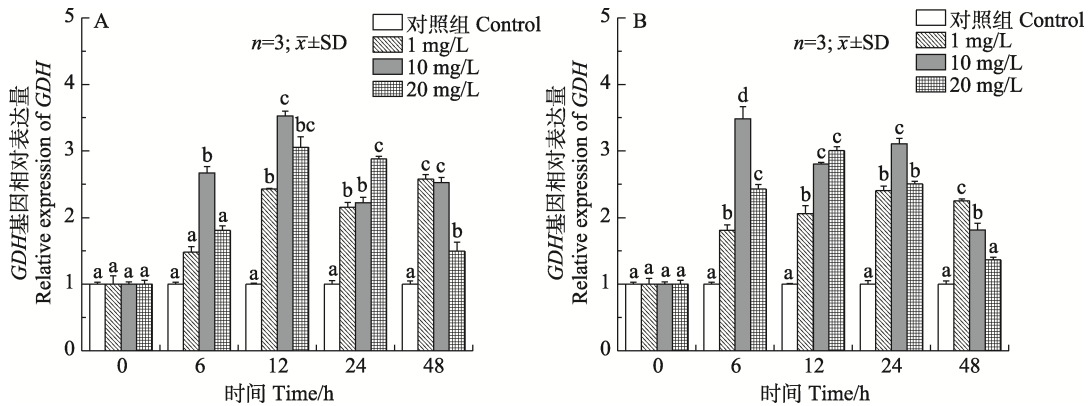


图 5 锦绣龙虾不同组织 GDH 基因相对表达量随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.5 Relative gene expression of GDH in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas

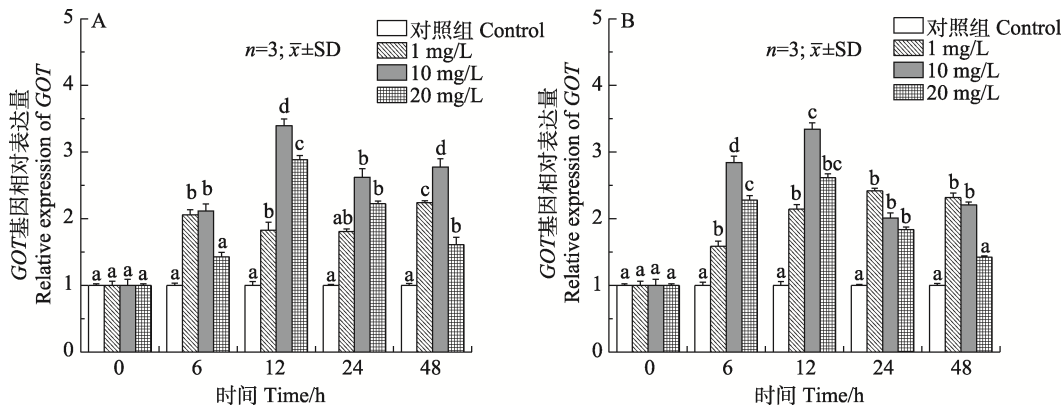


图 6 锦绣龙虾不同组织 GOT 基因相对表达量随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.6 Relative gene expression of GOT in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas

## 2.3 氨氮胁迫对锦绣龙虾抗氧化酶活性的影响

**2.3.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 T-AOC 活性的影响** 如图 7 所示, 随着胁迫时间的延长, 低浓度组鳃 T-AOC 活力呈持续升高的趋势, 而中、高浓度组均呈先升高后下降的变化趋势, 最大值均出现在 12 h 且显著高于对照组( $P<0.05$ )。中、高浓度组肝胰腺 T-AOC 活性

最大值分别出现在 12 h 和 6 h, 与对照组相比差异显著( $P<0.05$ )。低、中浓度组 48 h T-AOC 活性仍显著高于对照组( $P<0.05$ ), 高浓度组则被显著抑制( $P<0.05$ )。

**2.3.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 SOD 活性的影响** 如图 8 所示, 在胁迫过程中, 各浓度组 SOD 活性随胁迫时间的延长均呈先上升后下降的趋势。低、中浓度

组鳃 SOD 活性最高值均出现在 12 h, 高浓度组则在 6 h, 且均显著高于对照组( $P<0.05$ )。低、中浓度组肝胰腺 SOD 活性最大值均出现在 12 h, 与对照组相比有显著差异( $P<0.05$ )。高浓度组 SOD 活性在 48 h 被显著抑制( $P<0.05$ )。

### 2.4 氨氮胁迫对锦绣龙虾 LPO 的影响

锦绣龙虾肝胰腺中脂质过氧化物(LPO)含量明显高于鳃组织(图 9)。低、中浓度组鳃和肝胰腺 LPO 含量逐步提升, 高浓度组呈先升高后下降的变化趋势, 不同浓度组在 48 h 均与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

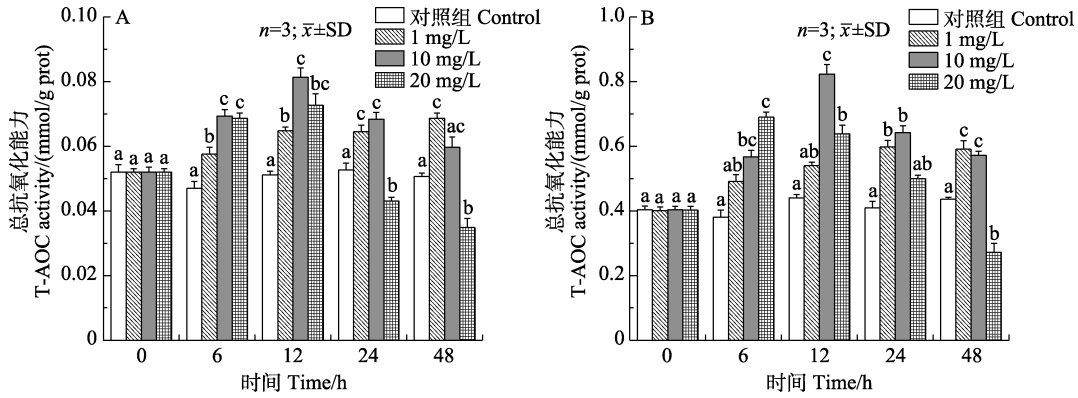


图 7 锦绣龙虾不同组织 T-AOC 活性随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.7 Change of T-AOC activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

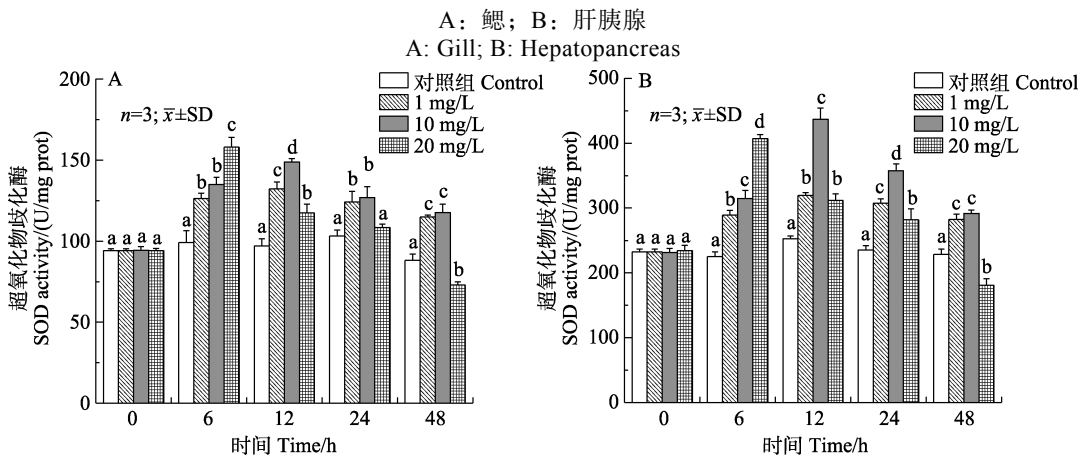


图 8 锦绣龙虾不同组织 SOD 活性随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.8 Change of SOD activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

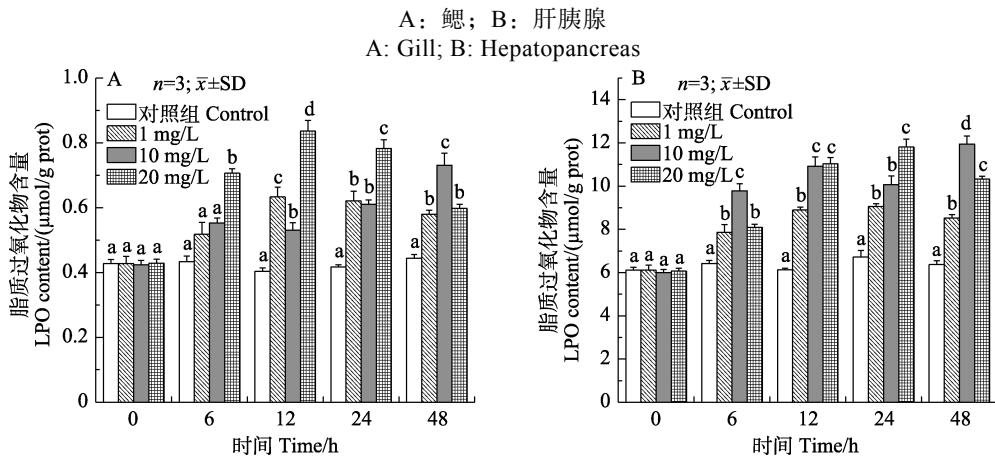


图 9 锦绣龙虾不同组织脂质过氧化物含量随氨氮胁迫时间的变化  
Fig.9 Change of LPO content in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺  
A: Gill; B: Hepatopancreas

### 3 讨论

#### 3.1 氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢机制的影响

研究表明, 当水体环境中氨氮含量发生改变时, 水生生物排泄方式也会发生变化, 尿素排泄量增加(Chen *et al*, 1995)。在浓度为 25 mmol/L 氨氮胁迫下, 砂栖胡鲶(*Clarias magur*)谷氨酰胺和尿素含量显著增加, 认为其在高氨水平下可诱导鸟氨酸-尿素循环将氨解毒为谷氨酰胺和进一步转化为尿素排泄来缓解氨氮毒性(Bodhisattwa *et al*, 2018)。金鱼(*Carassius auratus*)在浓度为 3.6 mmol/L 的高氨水平下, 脑中谷氨酰胺增加 4 倍(Wilkie *et al*, 2015)。本研究结果显示, 氨氮胁迫下, 低、中浓度组 GS 酶活在氨氮胁迫 12 h 内急速升高, 随后在 24 h 显著下降, 为了降低氨氮在体内的积累, 机体可能通过主动运输或者被动扩散的方式消除多余的氨氮, 同时启动解毒代谢机制, 表明锦绣龙虾具有一定的氨氮耐受能力。但 48 h 时, 高浓度组 GS 酶活受到抑制, 长时间氨氮胁迫使机体调节能力越来越弱, 龙虾体内会出现过多的自由基而抑制相关酶活力, 相关研究还见于中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*) (Anderson *et al*, 2002)、三疣梭子蟹(刘胜男等, 2015)等。氨氮胁迫组 GDH 活力的显著上调与周发林等(2016)的实验结果基本一致, 表明在氨氮胁迫下将氨合成中性、无毒的谷氨酰胺是锦绣龙虾重要的氨代谢途径。随着胁迫时间的延长, 锦绣龙虾体内氨氮逐渐积累, 其排泄方式发生改变, 6 h 后 GOT 表达量显著上调, 推测是其催化转氨反应生成天门冬氨酸参与尿素形成的缘故。虽然然而尿素形成十分消耗能量, 甲壳动物的主要排氨途径仍是合成谷氨酰胺, GOT 表达量再次下调。氨氮胁迫下, 各浓度组 XOD 活性显著高于对照组, 并表现出一定的剂量效应, 24 h 后, XOD 活性显著下调, 可能是胁迫前期产生的尿酸使 XOD 活性受到抑制。不同处理组 48 h XOD 活性具有显著差异, 在肝胰腺组织中尤为明显。高浓度组 XOD 活性呈逐渐下降状态, 且显著低于对照组。可能是由于水体中氨氮浓度过大, 肝细胞遭到破坏的缘故。张克俭(1993)发现, 当氨氮浓度高于 10.44 mg/L 时, 中国明对虾肝胰腺中的吸收细胞部分转化为分泌细胞, 并逐渐解体, 解体后的细胞碎片及大量的溶酶体等结构堆积于肝管部位。推测氨氮胁迫下锦绣龙虾会通过嘌呤核苷酸分解代谢途径将氨转化为尿酸。

GDH 是一种需借助辅酶实现谷氨酸生物合成的线粒体酶, 作为动物获得能量腺嘌呤核苷三磷酸

(adenosinetriphosphate, ATP)的重要途径, GDH 催化反应连接着三羧酸循环与谷氨酸, 在氨氮代谢过程中发挥重要作用(王秋菊等, 2011)。GOT 作为转氨反应的高效催化剂, 主要通过辅酶在磷酸吡哆胺(pyridoxamine photophate, PMP)和磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)之间的相互转换实现氨基的转运(严明等, 2004)。本研究发现, 氨氮胁迫下各浓度组与对照组目的基因表达量具有明显差异, 高浓度组与低、中组相比, *GDH* 和 *GOT* 基因的相对表达量后期下降明显, 可能是由于长时间高浓度的胁迫打破了体内平衡, 导致锦绣龙虾组织细胞受到损伤。研究结果显示, 各处理组 *GOT* 和 *GDH* 基因表达量与酶活性的变化趋势有部分不同, 考虑从基因表达达到蛋白合成是一个复杂的修饰加工过程, 蛋白活化会受到磷酸化等不定因素的影响, 酶的活性也会受活性位点识别及激活因子浓度等多方面的影响, 因此, 表现出基因表达量与酶活性不一致的现象。这也说明基因的 mRNA 丰度与翻译产物的表达量不一定具有线性关系(Martin *et al*, 2008)。

#### 3.2 氨氮胁迫对锦绣龙虾抗氧化系统的影响

当机体受到胁迫时, 体内 ROS 含量迅速增加, 未被抗氧化系统及时清除的 ROS 逐渐积累, 促使细胞膜脂质过氧化物形成, 从而造成氧化损伤(段亚飞等, 2014; Sun *et al*, 2011)。本研究中, 氨氮胁迫初期, 锦绣龙虾体内抗氧化酶活力显著升高。强俊等(2011)认为, 抗氧化酶活力提升可视为生物体对 ROS 的适应, 从而减轻脂质过氧化损伤。由于毒性效应, 低、中浓度组 T-AOC、SOD 活性于胁迫 12 h 内呈短暂升高趋势, 但随胁迫时间延长, 6 h 后逐渐受到抑制, 高浓度组 T-AOC、SOD 活性在 12 h 后呈显著下降趋势。原因可能与氨氮胁迫过程中有毒物质(如 LPO)积累量超过机体的耐受上限有关。胁迫初期, 较低浓度的氨氮对机体抗氧化酶具有诱导作用, 这种诱导作用是由于 ROS 增加引起的机体代偿。一定时间后, 由于歧化反应产生超出了其承受量的  $H_2O_2$ , 导致其活力受到抑制(王贞杰等, 2017)。洪美玲等(2007)认为, 随着氨氮胁迫时间的延长氨氮的增益效应消失, 导致机体抗氧化酶活性下降, 与任海等(2014)报道的氨氮胁迫对脊尾白虾抗氧化系统酶活力的影响以及强俊等(2011)报道的氨氮与密度胁迫对罗非鱼幼鱼肝脏抗氧化指标的联合影响结果相似。结合本研究高浓度组鳃和肝胰腺 T-AOC 和 SOD 活力在 48 h 时显著低于对照组, 也说明较高浓度的氨氮胁迫对机体产生了一定程度的毒害作用。

LPO 作为脂质过氧化反应产生的细胞毒性物质,

其含量一定程度反映机体脂质过氧化水平和细胞损伤程度,同时间接反映生物体内 ROS 含量(何吉祥等, 2016)。本研究发现,不同浓度氨氮胁迫后,肝胰腺 LPO 含量明显大于鳃组织,可能由于肝胰腺是锦绣龙虾主要的代谢组织。胁迫前期生物体内抗氧化系统被激活,但 LPO 含量仍在显著上升,说明机体仍然处于脂质过氧化状态。各浓度组鳃和肝胰腺 LPO 含量均有不同程度的升高,推测由于水中氨氮浓度的升高,导致脂质过氧化作用增强,也进一步提示氨氮胁迫下 LPO 积累可能是氨氮对锦绣龙虾产生毒害作用的主要原因之一。

### 参 考 文 献

- ANDERSON P M, BRODERIUS M, FONG K C, *et al.* Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* in response to a high exogenous ammonia concentration. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(14): 2053–2053
- BERNASCONI C J, UGLOW R F. Purineolytic capacity response of *Nephrops norvegicus* to prolonged emersion: An ammonia detoxification process. *Aquatic Biology*, 2011, 11(3): 263–270
- BODHISATTWA B, DEBAPRASAD K, GITALEE B, *et al.* Differential expression of multiple glutamine synthetase genes in air-breathing magur catfish, *Clarias magur* and their induction under hyper-ammonia stress. *Gene*, 2018, 671: 85–95
- CAI Z Z, ZHENG S H, WANG X. The relationship between  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N and environmental factors in coastal aquaculture water. *Journal of Quanzhou Normal University*, 2015, 33(6): 45–50 [蔡真珍, 郑盛华, 王宪. 近海养殖水体中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和环境因子的关系. *泉州师范学院学报*, 2015, 33(6): 45–50]
- CHEN J C, LIN C Y. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture*, 1995, 136(3/4): 243–255
- CHEN J C, LIU P C, LIN Y T, *et al.* Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1988, 19(3): 127–131
- CHENG W, CHEN J C. The virulence of enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 97–109
- CHEW S F, JIN Y, IP Y K. The loach *Misgurnus anguillicaudatus* reduces amino acid catabolism and accumulates alanine and glutamine during aerial exposure. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2001, 74(2): 226–237
- DUAN Y F, ZHANG J S, DONG H B, *et al.* The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1557–1564 [段亚飞, 张家松, 董宏标, 等. 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响. *水产学报*, 2014, 38(9): 1557–1564]
- GENG Z, LIU Q, WANG T, *et al.* Changes in physiological parameters involved in glutamine and urea synthesis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed *Ampithoe* sp. meal and exposed to ammonia stress. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 2725–2734
- HE J X, PAN T S, JIANG Y Y, *et al.* Effects of dietary carbohydrate to protein ratios and feeding rate on growth and lipid metabolism index of *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(2): 198–206 [何吉祥, 潘庭双, 蒋阳阳, 等. 饲料糖蛋白质比和投喂率对异育银鲫生长及脂质代谢指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(2): 198–206]
- HONG M L, CHEN L Q, GU S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412–418]
- KOO J G, KIM S G, JEE J H, *et al.* Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 2005, 36(1): 79–85
- LI S F, HE Y Y, LI J T, *et al.* Cloning and expression analysis of aspartate aminotransferase cDNA in *Fenneropenaeus chinensis* following ambient ammonia stresses. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1125–1133 [李少飞, 何玉英, 李吉涛, 等. 中国明对虾天门冬氨酸转氨酶基因的克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1125–1133]
- LIANG H F, HE J G. Growth model for one-year old *Panulirus ornatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 364–370 [梁华芳, 何建国. 实验条件下 1 龄锦绣龙虾的生长特性. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 364–370]
- LIANG H F, HE J G. Study on the artificial propagation and embryonic development of *Panulirus ornatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(2): 236–245 [梁华芳, 何建国. 锦绣龙虾人工繁殖和胚胎发育的研究. *水生生物学报*, 2012, 36(2): 236–245]
- LIU L, YANG X L, LIU C W. Eleven novel polymorphic microsatellite loci in the ornate spiny lobster *Panulirus ornatus* (Decapoda: Palinuridae). *Journal of Genetics*, 2016, 93(2): 65–67
- LIU S N, PAN L Q, LIU M Q. Effects of ammonia exposure on key detoxification metabolism associated genes expression in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Transactions of*

- Oceanology and Limnology, 2015(2): 97–104 [刘胜男, 潘鲁青, 刘茂琪. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹解毒代谢关键基因表达的影响. 海洋湖沼通报, 2015(2): 97–104]
- MARTIN R G, BARTLETT E S, ROSNER J L, *et al.* Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. Journal of Molecular Biology, 2008, 380(2): 278–284
- MENG Z, ZHANG H L, LIU X F, *et al.* Toxic effects of acute ammonia stress on young turbot *Scophthalmus maximus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 51–60 [孟振, 张鸿丽, 刘新富, 等. 氨氮急性胁迫对大菱鲆幼鱼的毒性效应. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 51–60]
- QIANG J, XU P, HE J, *et al.* The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1837–1848 [强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响. 水产学报, 2011, 35(12): 1837–1848]
- QIU L, SHI X, YU S, *et al.* Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 211
- REINEHR R, GÖRG B, BECKER S, *et al.* Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. Glia, 2007, 55(7): 758–771
- REN H, LI J, LI J T, *et al.* Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(4): 647–655 [任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响. 农业环境科学学报, 2014, 33(4): 647–655]
- ROMANO N, ZENG C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. Aquaculture, 2007, 266(1/2/3/4): 246–254
- ROUMIEH R, BARAKAT A, ABDELMEGUID N E, *et al.* Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskål 1775). Aquaculture Research, 2013, 44(11): 1777–1790
- SUN H, YANG W, CHEN Y, *et al.* Effect of purified microcystin on oxidative stress of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* larvae under different ammonia concentrations. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4/5/6): 536–543
- WANG Q J, XU L, FAN M Z. Recent advances in transport systems of glutamate and glutamine. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(6): 901–907 [王秋菊, 许丽, 范明哲. 谷氨酸和谷氨酰胺转运系统的研究进展. 动物营养学报, 2011, 23(6): 901–907]
- WANG Z J, CHEN S Q, CAO D Z, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 59–69 [王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 59–69]
- WILKIE M P, STECYK J A W, COUTURIER C S, *et al.* Reversible brain swelling in crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius auratus*) in response to high external ammonia and anoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular and Integrative Physiology, 2015, 184: 65–75
- XIONG D L, DUAN Y F, XU J M, *et al.* Physiological responses in gills of *Litopenaeus vannamei* exposed to the combined stress of temperature and ammonia. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(9): 2296–2303 [熊大林, 段亚飞, 徐敬明, 等. 凡纳滨对虾鳃组织对高温和氨氮胁迫的生理响应. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2296–2303]
- YAN M, XU W, CHEN F. Advances in structure and function of *E. coli* AspAT. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2004, 2(3): 14–18 [严明, 许伟, 陈菲. *E. coli* 天冬氨酸转氨酶结构与功能关系的研究进展. 生物加工过程, 2004, 2(3): 14–18]
- YANG Y, MENG F X, WANG R X. On the detoxification metabolic pathways of *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to acute ammonia-nitrogen stress. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(11): 72–81 [杨洋, 孟繁星, 王日昕. 急性氨氮胁迫下大弹涂鱼解毒代谢途径的研究. 生物技术通报, 2019, 35(11): 72–81]
- ZHANG K J. Toxication of Zn<sup>2+</sup> and NH<sub>3</sub>-N on hepatopancreas of *Penaeus orientalis*. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(1): 52–59 [张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰腺的毒性作用. 水产学报, 1993, 17(1): 52–59]
- ZHANG L, XU E G, LI Y, *et al.* Ecological risks posed by ammonia nitrogen (AN) and unionized ammonia (NH<sub>3</sub>) in seven major river systems of China. Chemosphere, 2018, 202(1): 136–144
- ZHAO H T. Effects of ammonia on haematological and immune parameters of juvenile Southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). Master's Thesis of Southwest University, 2006 [赵海涛. 氨氮对南方鲶(*Silurus meridionalis* Chen)幼鱼血液生理, 生化及非特异性免疫指标的影响. 西南大学硕士学位论文, 2006]
- ZHAO M M, YAO D F, LI S K, *et al.* Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: A review. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(4): 2194–2211
- ZHONG S L, CHEN Y Z, LIN K B, *et al.* Studies on variations of contents of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, S<sup>2-</sup> and heterotrophic bacteria in substrate of shrimp ponds and their correlations. Journal of Applied Oceanography, 1997, 16(4): 449–454 [钟硕良, 陈



- 月忠, 林克冰, 等. 虾池底质中  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{S}^{2-}$  和异养细菌含量的变化及其相关性研究. 台湾海峡, 1997, 16(4): 449–454]
- ZHOU F L, CHEN J S, HUANG J H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Penaeus monodon* under ammonia nitrogen stress. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1236–1246 [周发林, 陈劲松, 黄建华, 等. 斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1236–1246]
- ZHOU P. The harm of ammonia nitrogen to aquaculture and its prevention measures. China Fisheries, 2013(8): 63–64 [周平. 氨氮对水产养殖的危害及防治措施. 中国水产, 2013(8): 63–64]

(编辑 冯小花)

## Effects of Ammonia Stress on Metabolic and Antioxidant Enzyme Activities in *Panulirus ornatus*

ZHOU Qiansen<sup>1,2</sup>, REN Xianyun<sup>2,3</sup>, XU Yao<sup>2,4</sup>, LIU Ping<sup>2,3</sup>, LI Jian<sup>2,3①</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, 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 266071, China; 4. Bioresources and Environment/Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

**Abstract** In this study, in order to explore the effects of acute ammonia stress on the antioxidant and ammonia-nitrogen metabolism systems of *Panulirus ornatus*, lobsters were exposed to different concentrations of ammonia (0.24±0.07, 1.04±0.08, 9.75±0.21, and 19.87±0.46 mg/L) for up to 48 h. The activity of antioxidant and ammonia-nitrogen metabolizing enzymes and related gene expression were assessed in the gills and hepatopancreas at 0, 6, 12, 24, and 48 h after ammonia stress. From 6 to 12 h, total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) activity in the gills and hepatopancreas of *P. ornatus* under ammonia nitrogen stress increased to varying degrees, and was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). In the high-concentration group, T-AOC and SOD activity was inhibited for 48 h. The LPO content gradually increased with prolonged stress and was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ) at 48 h. The activities of the ammonia metabolism enzymes glutamine synthetase (GS), glutamate dehydrogenase (GDH), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), and xanthine oxidoreductase (XOD) were all up-regulated to varying degrees under ammonia stress compared with those of the control group, indicating that they are jointly involved in the metabolic transport of  $\text{NH}_4^+$ . Additionally, from 12 to 24 h, the expression of GDH and GOT genes in the hepatopancreas was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ); the same trend was identified in gill tissue. In brief, different concentrations of ammonia stress induce different levels of antioxidant enzyme activity. *Panulirus ornatus* mainly synthesizes glutamine under the combined action of hepatopancreas GS, GDH, and other metabolic enzymes to avoid excessive ammonia in the body.

**Key words** *Panulirus ornatus*; Ammonia nitrogen stress; Antioxidant; Ammonia metabolic enzyme

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210108001

http://www.yykxjz.cn/

于振兴, 任宪云, 邵慧鑫, 刘萍, 李健. 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和细胞凋亡的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 157-166

YU Z X, REN X Y, SHAO H X, LIU P, LI J. Effect of low temperature stress on antioxidant system and apoptosis of *Marsupenaeus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 157-166

# 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和 细胞凋亡的影响\*



于振兴<sup>1,2</sup> 任宪云<sup>2,3</sup> 邵慧鑫<sup>1,2</sup> 刘萍<sup>2,3①</sup> 李健<sup>2,3</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 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. 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)

**摘要** 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)适宜生长温度为 23℃~32℃, 由于北方地区冬季温度较低, 严重影响日本对虾养殖周期, 因此, 培育耐低温的新品种非常重要。将(14.24±1.12) g 的日本对虾暴露于 10℃、16℃、22℃水体中 72 h, 以 28℃水体中的对虾为对照组。结果显示, 对虾鳃和肝胰腺的总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(SOD)活性、还原型谷胱甘肽含量总体分别呈先下降后升高再降低的变化趋势, 而丙二醛含量、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)活性一直呈上升趋势; SOD 和 Caspase-3 基因的相对表达量分别呈先下降后升高再降低和持续升高的趋势, 与各自对应的酶活变化趋势相似。TUNEL 检测发现, 随胁迫时间的延长, 机体细胞凋亡率显著增加, 其中, 对照组、3 h 10℃组和 72 h 10℃组鳃组织细胞凋亡率分别为 2.03%、6.20%和 26.27%, 肝胰腺细胞凋亡率分别为 1.06%、25.65%和 42.33%。综上所述, 低温胁迫降低了日本对虾的抗氧化能力, 破坏了内环境原有的平衡, 进而导致机体出现氧化损伤。本研究可为耐低温新品种的培育提供参考。

**关键词** 日本对虾; 低温胁迫; 总抗氧化能力; 细胞凋亡; TUNEL 检测

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0157-10

日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)食性杂、生长快、离水不易死亡, 适于活虾上市和长途运输, 是我国海水养殖的重要虾类之一(赵先银等, 2006)。

日本对虾适宜生长温度为 23℃~32℃, 最适温度为 25℃~30℃, 在 8℃~10℃出现倒伏现象并停止摄

食, 5℃以下死亡(李凤晨等, 2006; 宋晓红等, 2014)。北方地区冬季温度过低, 严重影响日本对虾养殖周期。有研究表明, 低温胁迫诱导斑节对虾(*Penaeus monodon*)活性氧的产生, 导致体内氧化代谢紊乱(Jiang *et al*, 2019)。细胞凋亡是受基因调控、主动的

\* 山东省农业良种工程重大课题(2019LZGC014 号)、农业农村部农业国际合作交流项目“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD46)共同资助 [This work was supported by Major Project of Agricultural Improved Variety Project in Shandong Province (2019LZGC014), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China-Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries along the Belt and Road, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 于振兴, E-mail: 1149330153@qq.com

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

收稿日期: 2021-01-08, 收修改稿日期: 2021-01-22

生理性细胞自杀行为,当机体受到外来刺激时,通过细胞凋亡来清除体内受损伤、衰老和多余的细胞,以保持机体内环境平衡和维持正常生理活动(董自梅等, 2020)。Caspase (cysteiny l aspartate specific proteinase) 又称天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,是执行动物细胞凋亡的主要蛋白酶家族,通常情况下以无活性的酶原形式存在于活细胞中,当受到凋亡刺激时,被激活成具有活性的 Caspase,在不同的凋亡阶段发挥重要作用(Wang *et al*, 2020)。其中以 Caspase-3 最为重要, Caspase-3 是细胞凋亡的参与者之一,它的激活标志着细胞凋亡进入不可逆转的阶段(Scatena *et al*, 2007)。TUNEL (原位末端切口标记法)为一种新型的细胞凋亡检测方法,其原理是在脱氧核糖核苷酸末端转移酶作用下将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到凋亡细胞中断裂 DNA 形成的 3-OH 末端游离羟基上,进行原位凋亡细胞的检测,而正常细胞几乎无断裂 DNA (李进军等, 2017)。有关低温对日本对虾抗氧化及凋亡影响的研究尚未见报道,本研究通过 TUNEL 检测直观地呈现出低温胁迫下对日本对虾细胞凋亡率,并通过检测低温胁迫对日本对虾抗氧化系统及凋亡通路的影响,从体内抗氧化酶活力、凋亡通路酶活力、脂质过氧化产物以及基因表达水平探讨了日本对虾对低温胁迫的生理应答反应,以期为耐低温新品种的培育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用日本对虾均取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司,湿体重为(14.24±1.12) g 的健康虾。对虾于 200 L 的 PVC 桶中暂养 3 d,暂养期间,持续

充氧,每天早晚投喂蛤蜊肉并更换 30%的水,以保持水质良好,保持水温为(28±2)℃、盐度为 30、pH=8.2。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计** 本实验使用冷水机(GRTE-HXB10N, 格瑞特节能设备有限公司)对日本对虾所生存的水域进行降温。设置 10℃ (不摄食温度)、16℃、22℃和 28℃(对照组) 4 个温度梯度,采用调节冷水机自动降温,使 4 个温度组均在 12 h 时由 28℃同时降至所设置的温度,每组 3 个平行,每个平行 20 尾虾。开始降温时的样品为 0 h 样品(对照组),在降至所设置 28℃、22℃、16℃和 10℃后,分别于 3、24、72 h 取部分虾的鳃和肝胰腺,分别放入 4%甲醛固定液中保存,最后进行 TUNEL 检测。剩余鳃和肝胰腺放入液氮中速冻,测定其酶活和基因表达。

**1.2.2 样品处理** 将鳃和肝胰腺加液氮研磨成粉末,取 50 mg 样品迅速转至已加入 1 mL TRIzol 的 1.5 mL 离心管中,于-80℃保存,用于总 RNA 提取;剩余样品,称取 1 g 组织(鳃和肝胰腺),加入 9 mL (pH 7.2)预冷的 PBS 缓冲液,用匀浆器将标本匀浆充分。离心(4℃, 2000 g, 20 min),收集上清液。分装 1 份用于组织抗氧化酶活测定,其余置于-80℃冰箱备用。

**1.2.3 酶活性的测定** 总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、Caspase-3 活性、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量测定均根据试剂盒说明书进行(上海酶联生物科技有限公司)。

### 1.2.4 SOD 和 Caspase-3 基因的表达分析

**1.2.4.1 引物设计** 根据日本对虾 SOD 和 Caspase-3 基因 cDNA 序列,通过 Primer Premier 5.0 设计 Real-time PCR 扩增特异性引物,引物合成和 cDNA 序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成,序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物

Tab.1 Primers used in this study

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
SOD	TCAATCCTCTCCCACACA	CACAGACAGGCAGAGCAGT
Caspase-3	CTCTCACGACGCCTACAT	TTCCTGTGTTCTCTGTTT
$\beta$ -actin	TCCACGAGACCACATACAAC	CACTTCCTGAACGATTGA

**1.2.4.2 RNA 提取及 cDNA 合成** 按照 TRIzol 法提取总 RNA,使用核酸定量仪(Thermo Scientific)检测 RNA 含量和纯度,1%非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用 M-MLV(AG)试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链,-20℃保存备用。

**1.2.4.3 实时定量 PCR 扩增** 采用 Real-time PCR

(SYBR Green)相对定量法,按照 SYBR Green Pro Taq HS II (AG)试剂盒说明书,在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应体系为 10  $\mu$ L: 5.0  $\mu$ L SYBR Green Pro Taq HS premix (2 $\times$ ), 3.0  $\mu$ L RNA-free 水, 0.2  $\mu$ L Rox 参比染料,上、下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L),模板 cDNA 1.0  $\mu$ L。每个样品设 3 个重

复,加完样品瞬时离心将液体集中在管底。反应程序:扩增曲线,95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环;熔解曲线,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 *SOD* 和 *Caspase-3* 基因的相对表达量,使用 Origin Pro 2016 软件绘制柱状图。

**1.2.5 TUNEL 检测** 将固定在 4%甲醛固定液中的鳃和肝胰腺分别进行石蜡包埋,然后按照 4~5  $\mu\text{m}$  厚度进行连续切片。

将石蜡切片脱蜡至水,稍甩干后用蛋白酶 K 工作液覆盖组织,37℃ 孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后用破膜工作液覆盖组织,室温孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。采用 TUNEL 试剂盒(罗氏公司)内适量试剂 1 (TdT)和试剂 2 (dUTP)按 1:9 混合覆盖组织,切片平放于湿盒内,37℃ 恒温箱孵育 2 h,盒内加少量水保持湿度。孵育后的切片 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。甩干后滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次,

每次 5 min。甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

**1.2.6 数据统计** 所得实验数据均用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和邓肯(Duncan's)多重比较, $P<0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温胁迫对日本对虾鳃和肝胰腺抗氧化系统影响

**2.1.1 低温胁迫对日本对虾 T-AOC 的影响** 如图 1 所示,低温组(10℃和 16℃)日本对虾鳃和肝胰腺 T-AOC 整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ ); 22℃ 组鳃组织和肝胰腺 T-AOC 呈先升高再降低的变化趋势,分别在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ )。

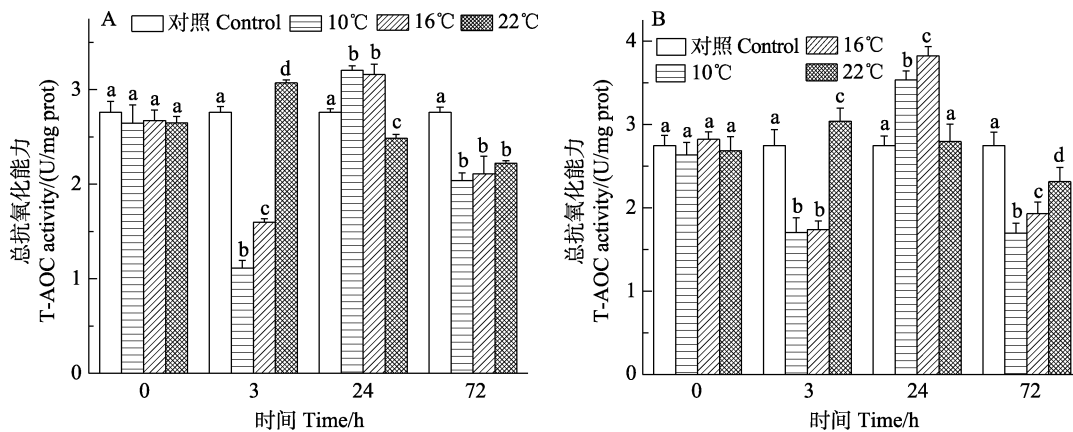


图 1 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) T-AOC 随低温胁迫时间的变化

Fig.1 Changes of T-AOC in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

Different superscript indicated significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

**2.1.2 低温胁迫对日本对虾 SOD 的影响** 如图 2 所示,低温(10℃和 16℃)组日本对虾鳃和肝胰腺 SOD 活性整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ ); 22℃ 组鳃组织和肝胰腺 SOD 活性呈先升高再降低的变化趋势,分别在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ ),72 h 肝胰腺 22℃ 组 SOD 活性与对照组相比差异不显著。

**2.1.3 低温胁迫对日本对虾 GSH 的影响** 如图 3 所示,低温(10℃和 16℃)组日本对虾鳃和肝胰腺 GSH

含量整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ ); 22℃ 组鳃组织和肝胰腺 GSH 含量呈先升高再降低的变化趋势,在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ )。

**2.1.4 低温胁迫对日本对虾 MDA 含量的影响** 如图 4 所示,3 个实验组 MDA 含量都呈上升趋势,在 72 h 达到最大值( $P<0.05$ )。低温组(10℃和 16℃)日本对虾鳃和肝胰腺 MDA 含量在各时间点变化趋势明显,且显著高于对照组( $P<0.05$ ); 22℃ 组各组织在 0 和 3 h MDA 含量与对照组相比差异均不显著。

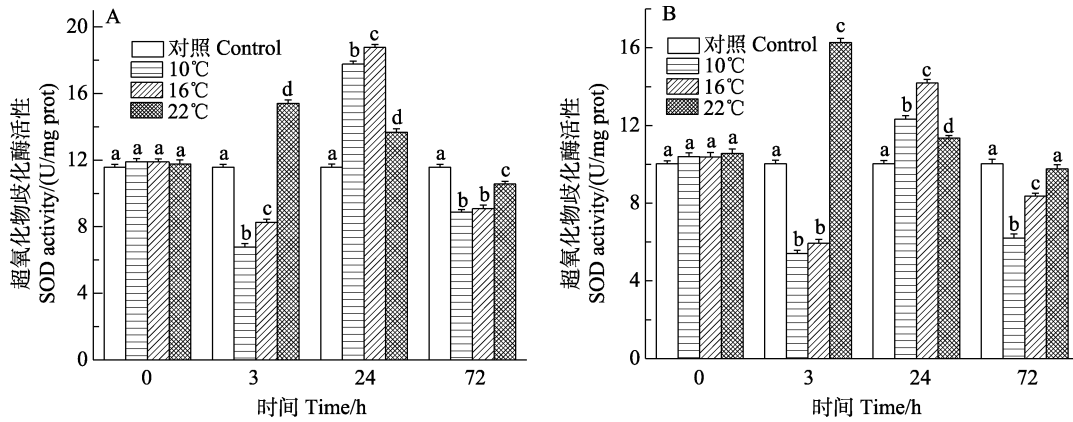


图2 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) SOD 随低温胁迫时间的变化

Fig.2 Changes of SOD activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

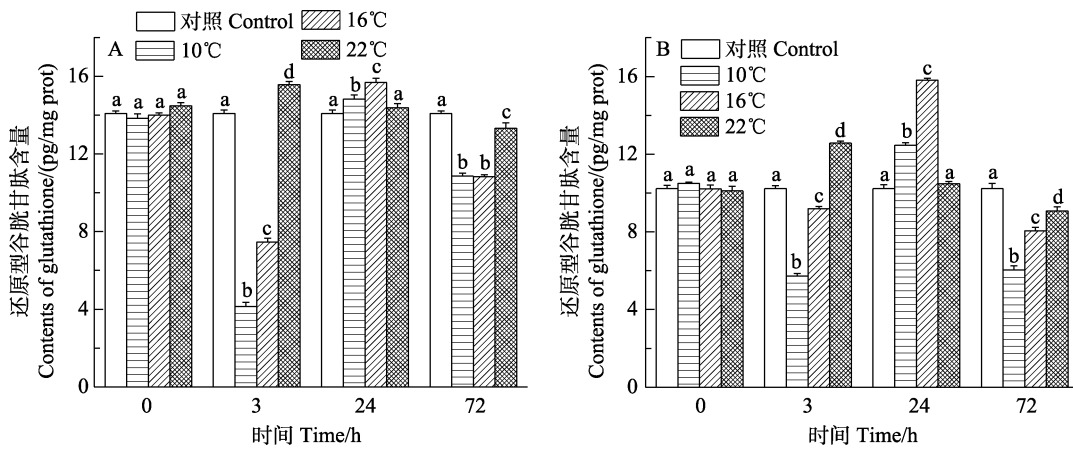


图3 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) GSH 随低温胁迫时间的变化

Fig.3 Changes of GSH activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

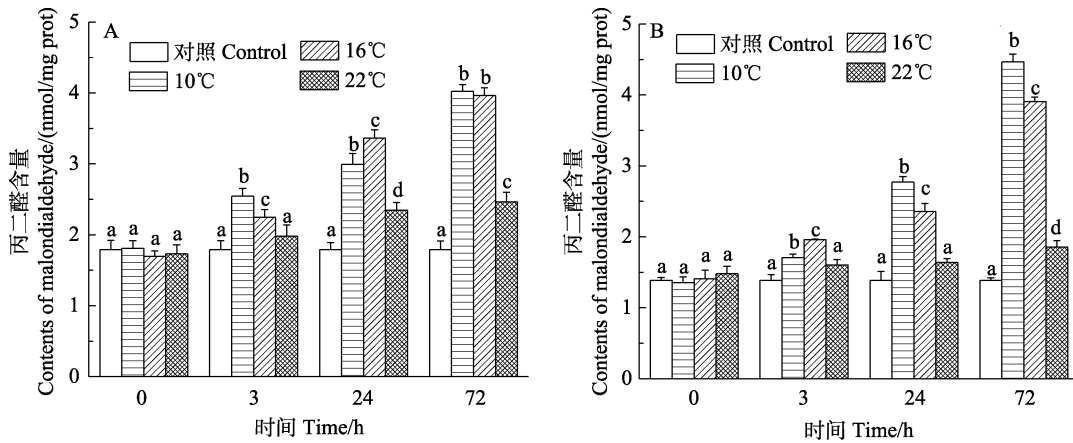


图4 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) MDA 含量随低温胁迫时间的变化

Fig.4 Changes of MDA content in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

2.1.5 低温胁迫对日本对虾 Caspase-3 活性的影响

如图5所示,低温组(10°C和16°C)日本对虾鳃和肝胰腺 Caspase-3 活性变化呈上升趋势,72 h 达到峰值,在各时间点变化趋势明显,且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );22°C 鳃和肝胰腺 Caspase-3 活性变化呈上升

趋势,在72 h 达到峰值,与对照组相比差异不显著。

2.2 低温胁迫对 SOD 和 Caspase-3 表达量的影响

2.2.1 低温胁迫对日本对虾 SOD 基因相对表达量的影响 10°C 和 16°C 低温胁迫组日本对虾鳃和肝胰



腺 *SOD* 基因相对表达量呈先降低后上升再降低的变化趋势(图 6), 均在 24 h 达到峰值, 且显著高于对照组( $P<0.05$ ); 22°C 实验组 *SOD* 基因相对表达量在各个时间点与对照组相比无显著差异。

**2.2.2 低温胁迫对日本对虾 *Caspase-3* 基因表达量的影响** 如图 7 所示, 10°C 和 16°C 低温胁迫组日本对虾鳃和肝胰腺 *Caspase-3* 基因相对表达量呈上升趋势, 72 h 达到峰值, 在各时间点均显著高于对照组( $P<0.05$ ); 22°C 实验组 *Caspase-3* 基因相对表达量在各时间点均与对照组相比无显著差异。

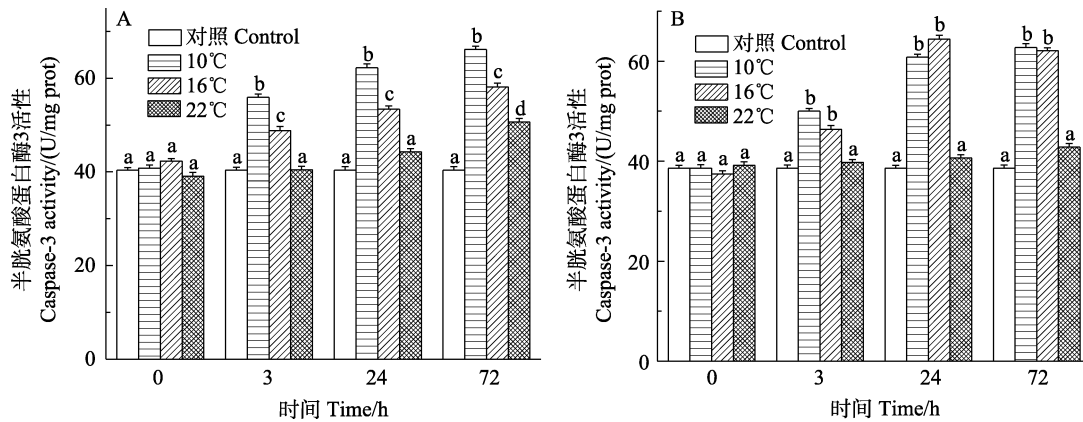


图 5 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) *Caspase-3* 活力随低温胁迫时间的变化

Fig.5 Changes of *Caspase-3* activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

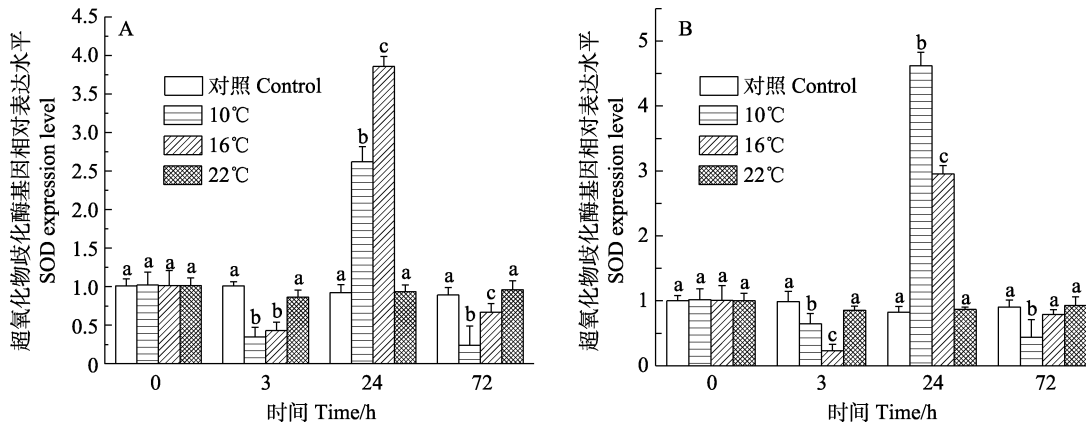


图 6 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) *SOD* 基因相对表达水平随低温胁迫时间的变化

Fig.6 Relative expression of *SOD* gene in gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

### 3 讨论

温度是甲壳动物常见的非生物应激源, 几乎影响甲壳类所有生理生化过程(Huang *et al*, 2017)。例如, 对冷应激反应的热休克蛋白(Meng *et al*, 2019)、蜕皮和存活率都受到水温变化的影响(Hewitt *et al*, 2001)。环境因子(如低温、盐度和 pH 等)变化引发的生理效

### 2.3 TUNEL 检测结果

为了更直观地表现低温对日本对虾机体的影响, 取 10°C 低温胁迫 3 h 和 72 h 的日本对虾鳃和肝胰腺进行 TUNEL 检测, 将室温 28°C 水温中的日本对虾作为对照。分析发现, 对照组中只有少量凋亡细胞, 而随 10°C 低温胁迫时间的增加, 凋亡细胞数量不断增加(图 8A、B)。图 8C、D 分别为鳃和肝胰腺细胞凋亡率统计结果, 其中, 鳃对照组、3 h 10°C 组和 72 h 10°C 组的细胞凋亡率分别为 2.03%、6.20% 和 26.27%, 肝胰腺细胞凋亡率分别为 1.06%、25.65% 和 42.33%。

应可能经由氧化还原途径实现(Assefa *et al*, 2005; Richier *et al*, 2006; Ryter *et al*, 2007), 即环境胁迫因子造成活性氧自由基大量积累(Lushchak *et al*, 2006), 从而影响抗氧化系统的功能。低温胁迫导致凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺总抗氧化能力下降(吴萌, 2017)。冷应激可以抑制红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的新陈代谢, 引起氧化损伤和免疫

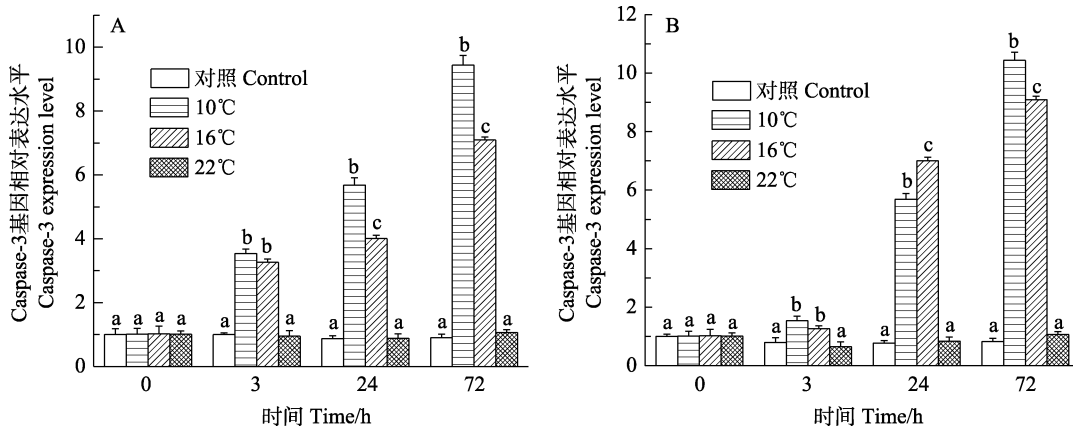


图7 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) Caspase-3 基因相对表达水平随低温胁迫时间的变化

Fig.7 Relative expression of Caspase-3 gene in gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

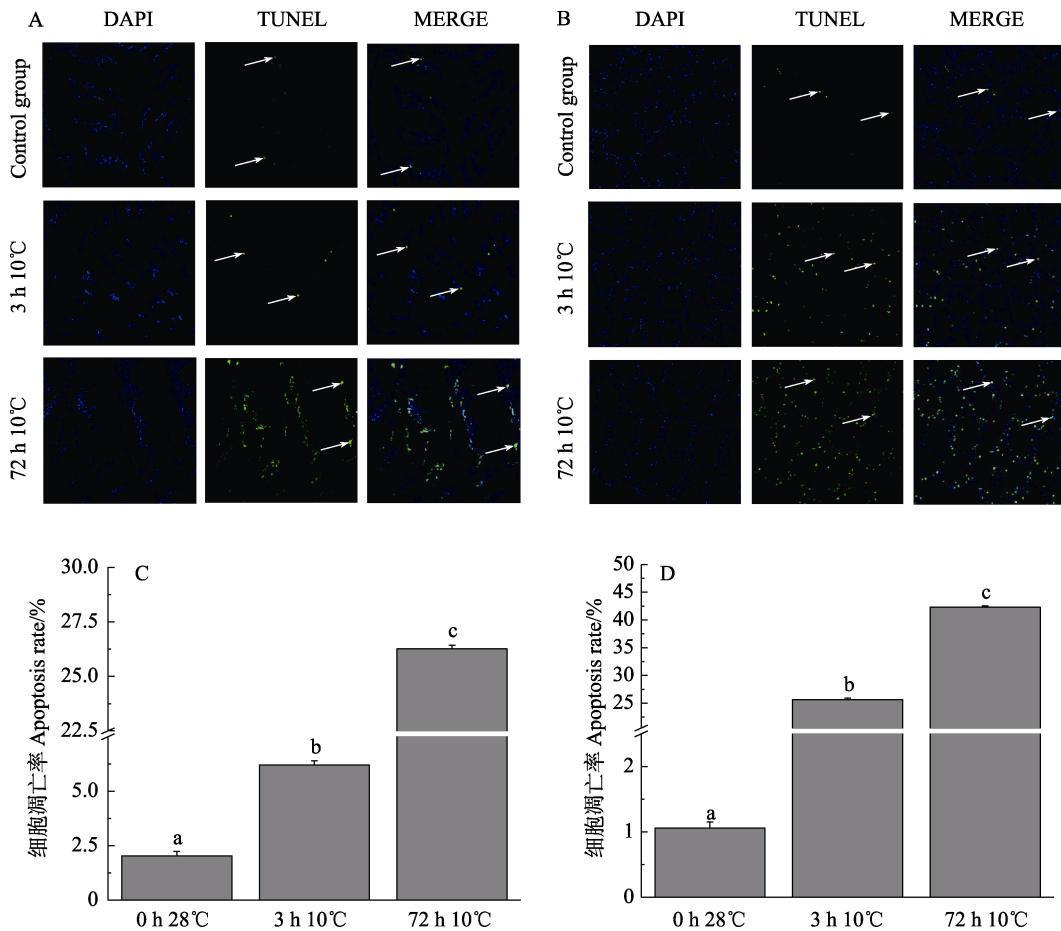


图8 细胞凋亡检测结果

Fig.8 Cell apoptosis detection result

A: 鳃检测结果; B: 肝胰腺检测结果; C: 鳃统计结果; D: 肝胰腺统计结果

A: Gill detection result; B: Hepatopancreas detection result; C: Gill statistical results; D: Hepatopancreas statistical results

缺陷(Wu *et al.*, 2019)。低温胁迫导致点篮子鱼(*Siganus guttatus*)幼鱼肝脏抗氧化酶活性下降(宋志明等, 2015)。岩扇贝(*Crassadoma gigantea*)在低温胁迫下,

T-AOC 显著下降(王潇等, 2018)。过量的活性氧也会影响 ATP 的产生, 破坏线粒体膜电位以及细胞电子传递链, 从而影响机体呼吸作用, 最终导致细胞凋亡

(Dandapat *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2007)。

### 3.1 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统的影响

抗氧化系统由酶促体系及非酶类组成, 其中, 酶促体系包括过氧化物还原酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等, 由抗氧化系统清除体内过量的活性氧, 保护机体不受氧化损伤(Mathew *et al.*, 2007; 陈梓聪等, 2020)。SOD 活性可以反映机体清除氧自由基的能力(李彦等, 2008)。GSH 能将脂质过氧化物还原成醇, 减少脂类被氧化的机率及 MDA 对细胞的损伤(李勇等, 2008)。本研究中, 低温胁迫 3 h 后, 日本对虾鳃和肝胰腺 T-AOC、SOD 活力和 GSH 含量下降, 可能是组织中抗氧化酶活性储备减弱。随着胁迫时间的延长, 各指标基本在 24 h 达到峰值, 说明低温胁迫导致机体中的活性氧自由基大量增加, 进而启动日本对虾抗氧化系统, 生成大量 SOD, 以清除体内多余的活性氧。这与 Stebbing (1982)提出的“毒物兴奋效应”相似。胁迫后期, 日本对虾 T-AOC、SOD 活性、GSH 含量下降, 可能是长时间低温胁迫打破了体内平衡, 导致肝胰腺受到损伤而不能及时恢复, 这与张德康等(2020)的研究结果相似。而 22℃组实验结果与低温组相反, 在 3 h 达到峰值, 随后逐渐下降, 接近对照组, 28℃为日本对虾最适生长温度, 22℃虽然不属于其最适生长温度, 但也处于日本对虾可生长温度范围内, 当水温由 28℃降至 22℃时, 日本对虾可以通过提高 SOD 活性来应对低温应激反应对虾体的影响; 但当水温降至 10℃和 16℃时, 虾体抗氧化酶活性受到显著抑制, 使得低温组 SOD 活性显著低于 22℃组, 而随着时间的延长, 抗氧化能力最终不如对照组, 各项指标逐渐下降, 这与管敏等(2018)的研究结果相似。

MDA 是一种脂质过氧化产物, 可以反映机体脂质过氧化速率和强度, 也能间接反映组织过氧化损伤程度(刘晓华等, 2007)。低温组日本对虾鳃和肝胰腺中 MDA 含量随胁迫时间的延长大幅增加, 且显著高于对照组, 这与孙学亮等(2010)的研究结果基本一致。MDA 主要在肝胰腺中分解, 随着胁迫时间的延长, 肝胰腺中 MDA 含量不断增加(王奇等, 2010), 这也表明低温胁迫下, MDA 的增加可能是低温对日本对虾机体产生危害的主要原因之一。TUNEL 检测也证明低温胁迫确实对鳃和肝胰腺产生损伤, 造成细胞凋亡。

### 3.2 低温胁迫对日本对虾细胞凋亡的影响

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 而 Caspase-3 作为关键的执行分子, 它

在凋亡信号传导途径中发挥主导功能, 因此, 细胞或组织中 Caspase-3 基因的表达量是检测细胞是否发生凋亡的重要方法(Zvereva *et al.*, 2003)。本研究中, 低温胁迫后, 鳃和肝胰腺中 Caspase-3 基因的相对表达量随胁迫时间的增加而不断上升, 显著高于对照组, 并且 Caspase-3 活性随胁迫时间的延长显著升高, 说明低温胁迫激活细胞凋亡的执行因子—Caspase-3, 进而引发细胞凋亡。这与贾旭颖等(2014)报道的温度突变后凡纳滨对虾 Caspase-3 活性显著升高的结果相似。生物体受到逆境胁迫时, 体内活性氧代谢的平衡被打破, 如不及时消除就会造成生物体活性氧伤害(West, 2000), 同时, 会导致细胞组分变成异物或者机体生物合成机制被破坏, 进而诱发细胞凋亡的发生。推测是低温胁迫过程细胞不断受到氧化损伤, 进而诱导细胞凋亡。

组织动力学研究表明, 如果只能观察到少量的凋亡细胞, 就意味着有大量的凋亡细胞已经被清除。一旦这种识别机制受损, 凋亡细胞不能被吞噬细胞及时清除, 就会导致凋亡细胞大量积累, 最终引起组织结构和功能的损害(彭黎明, 1999)。本研究中, 低温胁迫后, 日本对虾鳃和肝胰腺中的凋亡细胞数量随低温胁迫时间的延续而大幅度增加, 可能是低温胁迫导致上述组织动力学研究中的识别机制受损, 进而导致凋亡细胞不能及时清除, 在组织内不断积累。

## 4 结论

低温(10℃和 16℃)胁迫能影响日本对虾抗氧化酶、细胞凋亡酶活力及其基因表达水平, 导致脂质过氧化产物 MDA 含量的增加, 最终诱导细胞凋亡, 并表现出一定的时间量效关系。低温胁迫前期能诱导机体抗氧化酶活力增加, 进而促进机体清除过多的活性氧自由基, 短期内表现出积极的作用, 但随胁迫时间的延长, 低温抑制了抗氧化系统, 导致脂质过氧化加剧, 细胞凋亡率大幅增加, 最终造成各组织器官受损。因此, 在实际养殖过程中, 要尽量避免日本对虾长期处于 16℃以下低温环境中。

## 参 考 文 献

- ASSEFA Z, AN V L, GARMYN M, *et al.* Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1755(2): 90–106
- CHEN Z C, CHEN P M, YUAN H R, *et al.* Effect of recovery time on antioxidant capacity of juvenile *Penaeus*

- monodon* after exhaustive exercise. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 41(6): 58–65 [陈梓聪, 陈丕茂, 袁华荣, 等. 恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾的抗氧化功能的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 58–65]
- DANDAPAT J, CHAINY G B N, RAO K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2003, 135(3): 221–233
- DONG Z M, WANG J, GAO S, *et al.* Apoptosis in the regeneration of animal. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2020, 48(2): 87–93 [董自梅, 王静, 高帅, 等. 细胞凋亡与动物再生. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(2): 87–93]
- GUAN M, ZHANG H B, WANG L, *et al.* The effects of acute low temperature stress on antioxidative and immune indices of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(6): 17–22 [管敏, 张厚本, 王龙, 等. 急性低温胁迫对史氏鲟幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 17–22]
- HEWITT D R, DUNCAN P F. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 305–313
- HUANG W, REN C, LI H, *et al.* Transcriptomic analyses on muscle tissues of *Litopenaeus vannamei* provide the first profile insight into the response to low temperature stress. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178604
- JIA X Y, ZHANG D, LU Y L, *et al.* Effects of abrupt change in temperature and non-ionic ammonia on the cyt-C and caspase-3 of *Litopenaeus vannamei* in freshwater. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 700–710 [贾旭颖, 张丹, 路允良, 等. 温度突变和非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾 cyt-C 和 caspase-3 的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 700–710]
- JIANG S, ZHOU F L, YANG Q B, *et al.* Impact of temperature stress on oxygen and energy metabolism in the hepatopancreas of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 2019, 51(1): 141–148
- LI F C, GONG C G, SU L. Low temperature resistance test of *Marsupenaeus japonicus*. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(4): 35–48 [李凤晨, 宫春光, 苏利. 日本对虾耐低温试验. *水利渔业*, 2006, 26(4): 35–48]
- LI J J, DU Y, PANG P, *et al.* Lymphocyte apoptosis in PCV2-infected piglets was detected by TUNEL assay. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017(5): 7–9 [李进军, 杜耀, 庞培, 等. TUNEL 法检测 PCV2 感染仔猪的淋巴细胞凋亡. *上海畜牧兽医通讯*, 2017(5): 7–9]
- LI Y, KONG L Q, GAO H, *et al.* Progress on free radical and diseases. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(4): 85–88 [李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29(4): 85–88]
- LI Y, YANG Z B, YANG W R, *et al.* Effects of different supplemental levels of vitamin A and vitamin E in diets on antioxidation and immune performance in broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(4): 417–422 [李彦, 杨在宾, 杨维仁, 等. 日粮维生素 A 和维生素 E 水平对肉鸡抗氧化和免疫性能的影响. *动物营养学报*, 2008, 20(4): 417–422]
- LIU X H, CAO J M, YANG D W, *et al.* Distribution of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in the tissues of *Litopenaeus vannamei* before and after ammonia nitrogen stress. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6): 24–26 [刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. *水利渔业*, 2007, 27(6): 24–26]
- LUSHCHAK V I, BAGNYUKOVA T V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. I. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2006, 143(1): 30–35
- MATHEW S, KUMAR K A, ANANDAN R, *et al.* Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2007, 145(3): 315–320
- MENG X H, DONG L J, SHI X L, *et al.* Screening of the candidate genes related to low-temperature tolerance of *Fenneropenaeus chinensis* based on high-throughput transcriptome sequencing. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0211182
- OTT M, GOGVADZE V, ORRENIUS S, *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 2007, 12(5): 913–922
- PENG L M. Recognition and phagocytosis of apoptotic cells by phagocytes. *Chinese Journal of Pathology*, 1999, 28(4): 304–306 [彭黎明. 吞噬细胞对凋亡细胞的识别与吞噬. *中华病理学杂志*, 1999, 28(4): 304–306]
- RICHER S, SABOURAULT C, COURTIADÉ J, *et al.* Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS Journal*, 2010, 273(18): 4186–4198
- RYTER S W, KIM H P, HOETZEL A, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2007, 9(1): 49–89
- SCATENA R, BOTTONI P, BOTTA G, *et al.* The role of mitochondria in pharmacotoxicology: A reevaluation of an old, newly emerging topic. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 2007, 293(1): 12–21

- SONG X H, MAO Y, DONG H B, *et al.* The thermotolerance of the two morphologically similar varieties of juvenile kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 84–90 [宋晓红, 毛勇, 董宏标, 等. 两种形态变异类型日本囊对虾稚虾高温耐受性的比较. *水产学报*, 2014, 38(1): 84–90]
- SONG Z M, LIU J Y, ZHUANG P. Influence of low-temperature stress on the antioxidant enzymes activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Siganus guttatus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 142–150 [宋志明, 刘鉴毅, 庄平. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 142–150]
- STEBBING A R D. Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(3): 213–234
- SUN X L, XING K Z, CHEN C X, *et al.* The effects of acute temperature stress on blood parameters in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fisheries Science*, 2010, 29(7): 387–392 [孙学亮, 邢克智, 陈成勋, 等. 急性温度胁迫对半滑舌鳎血液指标的影响. *水产科学*, 2010, 29(7): 387–392]
- WANG Q, FAN C P, CHEN K C, *et al.* Effects of three kinds of sulfa drugs on the glutathione transferase (GST) and malondialdehyde (MDA) in the liver tissues of tilapia. *Ecological and Environmental Sciences*, 2010, 19(5): 1014–1019 [王奇, 范灿鹏, 陈焜慈, 等. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响. *生态环境学报*, 2010, 19(5): 1014–1019]
- WANG X, CAO S M, LIU G, *et al.* Effects of temperature on keeping-alive without water and antioxidant enzyme of the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Science Bulletin*, 2018, 20(1): 1–20 [王潇, 曹善茂, 刘钢, 等. 温度对岩扇贝无水保活及抗氧化酶活力的影响. *海洋通报(英文版)*, 2018, 20(1): 1–20]
- WANG Y N, HU S M, TUERDI M, *et al.* Initiator and executioner caspases in salivary gland apoptosis of *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Parasites and Vectors*, 2020, 13(1): 288
- WEST I C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Medicine*, 2000, 17(3): 171–180
- WU D L, HUANG Y H, CHEN Q, *et al.* Effects and transcriptional responses in the hepatopancreas of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* under cold stress. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 85(1): 102404
- 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]
- ZHANG D K, GAO J C, WANG Y Y, *et al.* Influences of low temperature stress on antioxidant status and expression of stress-related genes of American shad, *Alosa sapidissima*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2020, 173(2): 146–153 [张德康, 高建操, 王裕玉, 等. 低温胁迫对美洲鲟抗氧化状态及应激相关基因表达的影响. *海洋湖沼通报*, 2020, 173(2): 146–153]
- ZHAO X Y, LI J, LI J T, *et al.* Effects of pH stress on non-specific immune factors and RNA/DNA ratio of *Marsupenaeus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 60–66 [赵先银, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对日本对虾非特异性免疫因子及RNA/DNA比值的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 60–66]
- ZVEREVA E, SEREBROV V, GLUPOV V, *et al.* Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology and Pharmacology*, 2003, 135(4): 383–391

(编辑 冯小花)



## Effect of Low Temperature Stress on Antioxidant System and Apoptosis of *Marsupenaeus japonicus*

YU Zhenxing<sup>1,2</sup>, REN Xianyun<sup>2,3</sup>, SHAO Huixin<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>2,3</sup><sup>①</sup>, LI Jian<sup>2,3</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, 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 Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** *Marsupenaeus japonicus* is an important cultured species of marine shrimp in China. Its characteristics include a varied diet, fast growth, and tolerating periods out of water, as well as being suitable for live shrimp marketing and long-distance transportation. The suitable growth temperature of *M. japonicus* is 23°C~32°C. The culture cycle of *M. japonicus* is seriously affected by low winter temperatures in northern China, which increases the costs of parent shrimp overwintering. Therefore, it is necessary to breed new varieties with low temperature tolerances. *M. japonicus* was exposed to water at 10°C, 16°C, and 22°C for 72 h, with *M. japonicus* exposed to water at 28°C used as the control group. The results showed that the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, and GSH content in the gill and hepatopancreas decreased first, then increased and then decreased, while the MDA content and caspase-3 enzyme activity increased over time. The relative expression of the *SOD* and *Caspase-3* genes decreased first, then increased, then decreased, and continued to increase, which was similar to their corresponding changes in enzyme activity. In order to prove that low temperature stress caused damage to the body of *M. japonicus*, a TUNEL test was performed. It was found that the apoptosis rate increased significantly with the extension of the stress time. The apoptotic rates of the gill control group, 3 h at 10°C, and 72 h at 10°C were 2.03%, 6.20%, and 26.27%, respectively. The apoptotic rates of the hepatopancreas cells were 1.06%, 25.65%, and 42.33% for these exposure times, respectively. In conclusion, low temperature stress reduced the antioxidant capacity of *M. japonicus*, destroyed the original balance of the internal environment, and then led to oxidative damage. In this study, the changes in cell apoptosis and the antioxidant status of *M. japonicus* under low temperature conditions provided data that support the need to cultivate new varieties with low temperature tolerances.

**Key words** *Marsupenaeus japonicus*; Low temperature stress; T-AOC; Apoptotic; TUNEL

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210525001

http://www.yykxjz.cn/

刘洋, 朱建新, 陈小傲, 段骄阳, 薛致勇, 曲克明. 凡纳滨对虾动态能量收支模型参数的测定. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 167-174

LIU Y, ZHU J X, CHEN X A, DUAN J Y, XUE Z Y, QU K M. Determining the parameters of the dynamic energy budget model of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 167-174

# 凡纳滨对虾动态能量收支模型参数的测定\*



刘洋<sup>1,2</sup> 朱建新<sup>2①</sup> 陈小傲<sup>2,3</sup> 段骄阳<sup>2,3</sup> 薛致勇<sup>4</sup> 曲克明<sup>2</sup>

(1. 大连海洋大学海洋科技与环境学院 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

3. 上海海洋大学 上海 201306; 4. 海阳市黄海水产有限公司 山东 烟台 265100)

**摘要** 为更好地掌控工厂化高密度养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的个体动态生长状况,本研究基于动态能量收支(dynamic energy budget, DEB)理论,获取了构建凡纳滨对虾动态能量收支模型的 5 个必需参数。通过生物学测量得到凡纳滨对虾的体长和湿重,将二者进行转化回归,得到形状系数  $\delta m$ ; 根据凡纳滨对虾在不同实验温度条件下的单位干重耗氧率,计算得到 Arrhenius 温度  $T_A$  的值; 根据凡纳滨对虾干重和呼吸耗氧率在饥饿实验中保持稳定时的值,经公式计算得到形成单位体积结构物质所需能量  $[E_G]$ 、单位体积最大储能  $[E_M]$  和单位时间单位体积维持耗能率  $[\dot{p}_M]$  3 个参数。结果显示,凡纳滨对虾的体长和体积呈三次函数关系:  $V=0.0093L^{3.1094}$  ( $R^2=0.9987$ ), 对虾的湿重立方根和体长线性回归所得斜率即为形状系数  $\delta m$  ( $\delta m=0.23$ )。3 组不同规格的凡纳滨对虾在  $22^\circ\text{C}\sim 34^\circ\text{C}$  的实验温度范围内与单位干重耗氧率呈正比关系,超过  $34^\circ\text{C}$  后呈反比关系。在  $34^\circ\text{C}$  拐点前,单位干重耗氧率的  $\ln$  值与温度  $T$  (热力学温度, K) 的倒数呈线性关系,3 组回归方程斜率绝对值的平均值为 Arrhenius 温度  $T_A$  值 ( $T_A=6156\text{ K}$ )。饥饿实验结束后,凡纳滨对虾的干重由初始的  $(2.36\pm 0.32)\text{ g}$  降低至  $(1.23\pm 0.24)\text{ g}$ ,有机物含量则从 82% 降至 62%,经公式计算得到  $[E_G]$  和  $[E_M]$  的值分别为  $5826$  和  $2211\text{ J/cm}^3$ ; 呼吸耗氧率由初始的  $0.95\text{ mg}/(\text{ind}\cdot\text{h})$  稳定至  $0.58\text{ mg}/(\text{ind}\cdot\text{h})$ ,经公式计算得到  $[\dot{p}_M]$  的值为  $31.47\text{ J}/(\text{cm}^3\cdot\text{d})$ 。本研究获得的 5 个必需参数 ( $\delta m$ 、 $T_A$ 、 $[E_G]$ 、 $[E_M]$  和  $[\dot{p}_M]$ ) 为后续凡纳滨对虾动态能量收支模型的构建奠定了基础,以期为凡纳滨对虾的工厂化高密度养殖提供理论指导。

**关键词** DEB 理论; 凡纳滨对虾; 工厂化; 模型参数

**中图分类号** S966.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0167-08

Kooijman (2000)在 1986 年首次提出了基于  $\kappa$  原则的动态能量收支(dynamic energy budget, DEB)理论,用于描述生物在个体层面上对于能量的吸收、储备和利用。它叙述的是生物将摄食同化能量的一部分

用于维持身体结构的生长,另一部分用于性腺的发育和繁殖储备(Sousa *et al*, 2006; Ren *et al*, 2001)。基于 DEB 理论研究生理机制与环境关系而模拟出的个体生长模型称作动态能量收支模型,简称为 DEB 模

\* 国家“十三五”蓝色粮仓重点研发计划(2019YFD0900505)和国家“十三五”重点研发专项(2017YFD0701701)共同资助 [This work was supported by National “13th Five-Year” Blue Granary Key Research and Development Plan (2019YFD0900505) and National “13th Five-Year” Key Research and Development Project (2017YFD0701701)]. 刘洋, E-mail: 1341984564@qq.com

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

收稿日期: 2021-05-25, 收修改稿日期: 2021-07-12

型(Marinov *et al*, 2007; Kooijman, 2009), 该模型可在个体层面上预测特定物种的体长、体重和性腺等动态生长的变化(Bourlès *et al*, 2009; Bernard *et al*, 2011)。通过假设食物和温度是生物新陈代谢机制的主要驱动力, 为理解生物的整体生理表现提供了一个全面的框架。DEB 理论基于不同物种在新陈代谢上的一致性而具有非常广泛的应用范围, 准确获得特定条件下的模型参数即能得到目标物种的 DEB 模型(张继红等, 2016)。DEB 理论作为国内外的研究热点, 已被成功地应用到鱼类(Ren *et al*, 2020)、贝类(Fuentes-Santos *et al*, 2019; 段骄阳等, 2020)、藻类(蔡碧莹等, 2019)等水生生物, 构建起多种 DEB 模型。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)原产于东太平洋暖水海域, 系热带性虾类。作为世界上公认的优良养殖品种之一, 因其具有耐低盐、耐高温、生长快、抗病力强等优点而深受人们的喜爱。凡纳滨对虾自 1988 年引入我国后便迅速发展并风靡全国, 历经海湾养殖、池塘养殖和温棚养殖等几种养殖模式后, 已成为我国重要的海水养殖品种(邓伟等, 2013)。如今, 随着凡纳滨对虾养殖技术的成熟, 全国各地掀起凡纳滨对虾养殖浪潮, 尤其是工厂化高密度养殖成为凡纳滨对虾新的养殖模式(汪珂等, 2019)。但随着养殖规模和密度的扩大, 种质退化、水质恶化和病害频发等一系列问题也随之浮现(姚晖, 2020), 因此, 迫切需要养殖容量方面的理论指导。通过建立凡纳滨对虾动态能量收支模型并进一步建立其养殖容量模型, 对于指导养殖管理和评估养殖容量具有重要意义(Sato *et al*, 2007; 刘慧等, 2018)。国外关于虾类 DEB 模型的研究已有多篇报道, 建立了南极磷虾(*Euphausia superba*) (Jager *et al*, 2016)、褐虾(*Brown shrimp*) (Campos *et al*, 2009)和蓝虾(*Litopenaeus stylirostris*)等的 DEB 模型, 但目前国内虾类 DEB 理论研究尚属空白, 有待于进一步补充完善。

因此, 本研究以工厂化高密度养殖的凡纳滨对虾为实验对象, 参考国外已报道有关虾类 DEB 模型的研究方法, 通过相关实验获得构建凡纳滨对虾 DEB 模型的 5 个必需参数, 包括形状系数(shape coefficient,  $\delta m$ )、Arrhenius 温度(arrhenius temperature,  $T_A$ )、形成单位体积结构物质所需能量(volume-specific costs for structure,  $[E_G]$ )、单位体积最大储能(maximum storage density,  $[E_M]$ )和单位时间单位体积维持耗能率(volume-specific maintenance costs per unit of time,  $[\dot{p}_M]$ )。此项研究为后续凡纳滨对虾动态能量收支模型的构建奠定了基础, 以期对凡纳滨对虾的工厂化高

密度养殖容量和布局管理提供科学规划。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料与管理

实验所用凡纳滨对虾均取自山东省海阳市黄海水产有限公司同一工厂化养虾车间。实验用虾经地笼捞出后迅速转移至实验桶内进行充气暂养, 实验用桶容量为 200 L, 上口口径为 82 cm, 下口径为 68 cm, 高度为 53 cm, 上覆黑色网布, 防止对虾受刺激跳出。实验用水为天然海水, 经沉淀、砂滤、调温、增氧处理后使用, 水温为(28.0±0.5)℃, 盐度为 31, pH 为 7.8~8.2, 溶氧保持在 5 mg/L 以上, 与车间养殖环境保持一致。暂养期间, 投喂青岛正大农业发展有限公司生产的凡纳滨对虾配合饲料, 投喂时间分别为 07:00、12:00、17:00 和 22:00。驯养至实验用虾成活率稳定后开始各个生理实验。

实验于 2020 年 9 月初至 2021 年 1 月中旬在海阳市黄海水产有限公司标准实验室进行。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 生物学测量** 凡纳滨对虾经中间培育后, 每隔 7 d 从虾池随机捞取 10 尾虾直接用于形状系数测量, 分别测定凡纳滨对虾的体长和湿重, 共计 78 尾。体长用刻度尺(精度 0.01 mm)测量, 湿重用电子天平(龙蓓电子天平, I2000, 精度 0.01 g)称量, 湿重即为用卫生纸擦干体表水分, 阴干 0.5 h 后的虾全重。根据湿重与虾体密度的乘积得到体积( $V$ )。

$$V = (\delta m \times L)^3 \quad (1)$$

式中,  $V$  为虾的体积( $\text{cm}^3$ );  $\delta m$  为形状系数;  $L$  为虾的体长( $\text{cm}$ )。

**1.2.2 Arrhenius 温度** 在凡纳滨对虾的不同生长阶段, 选取经暂养后不同规格的 3 组[A 组体长为:(5.04±0.13) cm, B 组:(7.09±0.18) cm, C 组:(9.13±0.29) cm]用于测定不同实验温度对凡纳滨对虾单位干重耗氧率的影响。在 22℃、26℃、30℃、34℃、38℃ 5 个实验温度条件下, 将 3 组不同规格的凡纳滨对虾设 5 组重复, 3 组空白对照。实验开始后在每个装满海水的密闭塑料瓶(1.5 L)中缓慢放入 1 尾虾, 挤出多余气泡确保没有空气。塑料瓶置于水温为 28℃的海水实验桶中, 将水温逐步升温至 30℃、34℃、38℃或自然降温至 22℃、26℃, 进行各个不同温度梯度的耗氧实验。凡纳滨对虾在升温或降温过程中调节自身代谢以逐渐适应环境变化, 达到所需温度后在加热棒的维

持下完成耗氧实验。耗氧时间持续 1 h, 利用便携式溶氧仪(希玛, AR8010+)测定实验前后密闭塑料瓶中的溶解氧(DO)浓度。耗氧实验结束后, 测定每尾虾的干重, 干重为在 60℃电热恒温鼓风干燥箱(尚诚, 101-2B)中烘干 72 h 至无水分的重量。根据实验前后 DO 的浓度变化计算单位干重呼吸耗氧率[OR, mg/(g·h)]:

$$OR = (DO_0 - DO_t) \times V_L / (DW \times t_1) \quad (2)$$

式中,  $DO_0$ 、 $DO_t$  为各组实验开始和结束时瓶中 DO 的含量(mg/L),  $V_L$  为塑料瓶体积(L),  $DW$  为虾干重(g),  $t_1$  为耗氧实验时间(h)。

**1.2.3 饥饿实验** 用地笼捞取 300 尾虾, 暂养后随机平均分配, 置于 4 个水桶进行饥饿实验, 将水温控制在凡纳滨对虾生长的最适温度(28℃), 连续 24 h 不间断充气以确保氧气充足。实验桶设计为微流水, 进水口套紧纱布过滤海水中的杂藻。随着实验的进行, 及时清理桶底的粪便和桶壁附着的污物并及时隔离病虾, 清除死虾和虾壳。饥饿实验每隔 5 d 取 8 只凡纳滨对虾, 测定其单位干重呼吸耗氧率, 另取 10 只凡纳滨对虾, 测定湿重、干重和有机物含量。有机物含量用灰分测定法测定, 即将称过干重的虾放入坩埚, 置于马弗炉(分体式 SX2-2.5-10A)中, 450℃灼烧 4 h 后称重。根据质量差, 计算获得有机物含量。饥饿实验在实验用虾干重不再降低、呼吸耗氧率基本保持恒定时结束(约 31 d)。

实验期间, 虾干重随体内储存能量的消耗而逐渐降低。而当虾的储备能量完全耗尽时, 虾的干重将不再随饥饿时间而变化, 此时的重量即为虾的结构物质, 由此计算形成单位体积结构物质所需能量[ $E_G$ ]:

$$[E_G] = W_t \times C_t \times k / (T_r \times V) \quad (3)$$

式中,  $W_t$  为实验结束时保持恒定的虾干重(g),  $C_t$  为实验结束时虾的有机物含量(%),  $k$  为有机物的能值(8000 J/g),  $T_r$  为生长效率的转换系数( $T_r = 40\%$ ) (van der Veer *et al.*, 2006),  $V$  为虾体积( $\text{cm}^3$ )。

虾初始能量与饥饿后的结构物质能量之差即为虾的最大储能[ $E_M$ ]:

$$[E_M] = k \times (W_0 \times C_0 - W_t \times C_t) / V \quad (4)$$

式中,  $W_0$  为虾干重的初始值(g),  $C_0$  为实验初始时虾有机物含量(%)。

由虾不随饥饿时间变化的呼吸耗氧率计算单位时间单位体积维持耗能率[ $\dot{p}_M$ ]:

$$[\dot{p}_M] = OR \times E_o \times t / (\rho_o \times V) \quad (5)$$

式中, OR 为虾饥饿后基本恒定的单位干重呼吸耗氧率[mg/(ind·h)],  $E_o$  为  $O_2$  的能值(1 mL  $O_2 = 20.3$  J) (Ren *et al.*,

2008),  $t$  为时间转化系数(1 d=24 h),  $\rho_o$  为  $O_2$  在 28℃下的密度(1.295 mg/mL)。

### 1.3 数据分析

实验数据采用 Excel 2010 进行统计分析并回归并作图; 采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理获取标准差, 最终结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 形状系数 $\delta m$

通过 Excel 2010 软件进行凡纳滨对虾体长与体积的拟合回归, 结果符合三次函数(图 1):  $V=0.009 3L^{3.109 4}$  ( $R^2=0.998 7$ ), 根据公式(1)将体长与体积的立方根进行线性回归, 所得斜率(图 1)即为形状系数  $\delta m$  的值(0.23)。

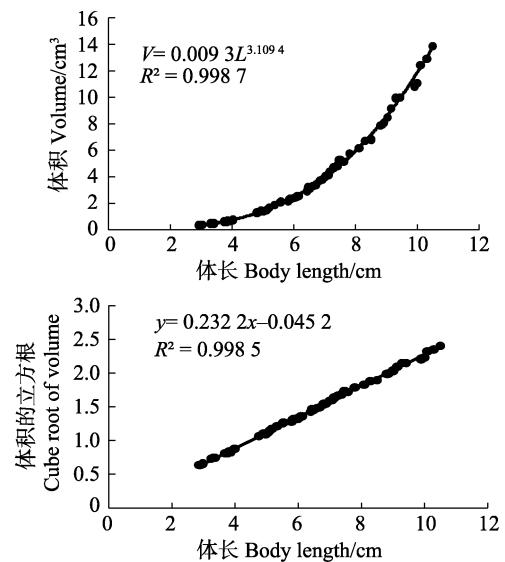


图 1 凡纳滨对虾体长与湿重的关系

Fig.1 Relationship between wet weight and body length of *L. vannamei*

### 2.2 Arrhenius 温度

统计作图后得到 3 组凡纳滨对虾(表 1)的单位干重耗氧率随个体规格的增大而减小(图 2), 随实验温度的上升呈先增大后减小的变化趋势。在 22℃~34℃实验温度范围内, 单位干重耗氧率随温度的升高而增大, 在 34℃达到最大; 之后随温度的升高而减小。在 34℃拐点前, 根据 3 组凡纳滨对虾单位干重耗氧率的 ln 值与温度  $T$  (热力学温度, K) 的倒数进行线性回归得到 3 组方程, 分别为  $\ln R = -6 470.6T^{-1} + 22.118$  ( $R^2=0.963 3$ )、 $\ln R = -5 770.9T^{-1} + 19.502$  ( $R^2=0.952 8$ )、 $\ln R = -6 230.5T^{-1} + 20.849$  ( $R^2=0.977 3$ ) (图 3)。3 组方程斜率绝对值的平均值为 6157 K, 即凡纳滨对虾的  $T_A$  值。

表1 3组凡纳滨对虾生物学特征  
Tab.1 Biological characteristics of three groups of *L. vannamei*

指标 Indices	组别 Group		
	A	B	C
体长 Shell length/cm	5.04±0.13	7.09±0.18	9.13±0.29
湿重 Wet weight/g	1.45±0.10	3.85±0.15	8.74±0.19
干重 Dry weight/g	0.29±0.07	1.02±0.11	2.43±0.15

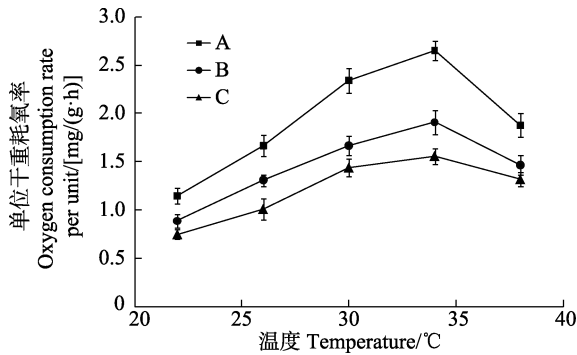


图2 3组不同规格凡纳滨对虾在不同温度下的单位干重耗氧率

Fig.2 Oxygen consumption rate per unit dry weight of three groups of different sizes of *L. vannamei* at different temperatures

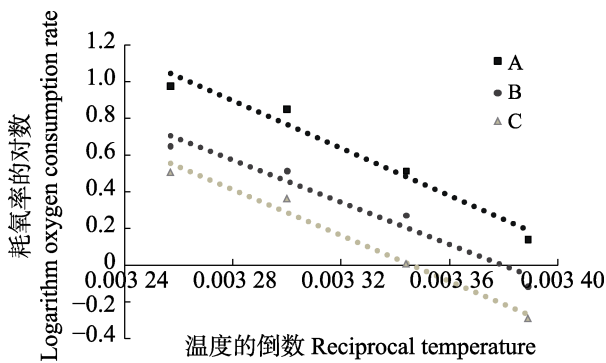


图3 凡纳滨对虾单位干重耗氧率的ln值与温度的倒数线性关系

Fig.3 Linear relationship between the ln value of the oxygen consumption rate per unit dry weight of *L. vannamei* and the reciprocal temperature

### 2.3 饥饿实验所获参数

饥饿实验共进行31 d, 实验所用凡纳滨对虾初始平均体长为(8.97±0.35) cm、平均体重为(8.87±0.22) g, 实验期间凡纳滨对虾无能量摄入。随着实验时间的推移, 凡纳滨对虾的干重不断下降并在第26天趋于恒定, 测得对虾干重由(2.36±0.89) g降至(1.23±0.22) g (图4); 呼吸耗氧率由最初的0.95 mg/(ind·h)逐渐下降, 并在第31天左右稳定在0.58 mg/(ind·h)(图5)。对虾干重和呼吸耗氧率的降幅分别为47.9%和38.9%, 有机物含量则从82%降至62%(表2)。

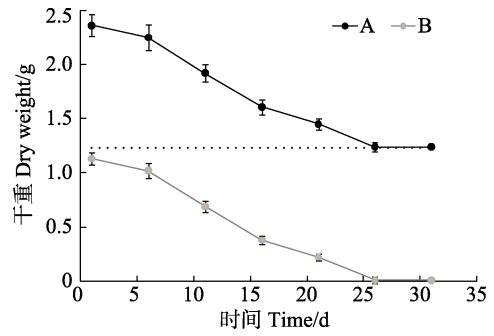


图4 凡纳滨对虾干重(A)和存储物质(B)随饥饿时间的变化

Fig.4 Changes of dry weight (A) and storage of reserves (B) in *L. vannamei* during starvation

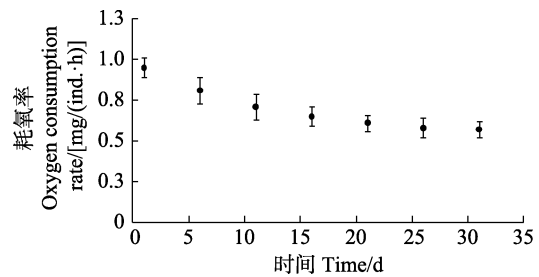


图5 凡纳滨对虾耗氧率随饥饿时间的变化

Fig.5 Changes of oxygen consumption rate of *L. vannamei* at different starvation time

表2 饥饿实验相关参数计算值  
Tab.2 Parameter calculated value related to the starvation experiment

参数 Parameter	初始值 Initial value	终末值 Final value	结果 Result
干重 Dry weight/g	2.35±0.29	1.23±0.12	
有机物含量 Organic content/%	82.00±4.25	62.00±2.76	
形成单位体积 结构物质所需能量 [E <sub>G</sub> ]/(J/cm <sup>3</sup> )			5826±258
单位体积最大储能 [E <sub>M</sub> ]/(J/cm <sup>3</sup> )			2211±112
单位时间单位体积 维持耗能率 [p <sub>M</sub> ]/[J/(cm <sup>3</sup> ·d)]			31.47±3.54

根据凡纳滨对虾饥饿实验结束后基本恒定的干重和有机物含量, 利用公式(3)计算形成单位体积结构物质所需能量[E<sub>G</sub>]的值, 为5826 J/cm<sup>3</sup>(表2); 利用公式(4)计算单位体积最大存储能量[E<sub>M</sub>]的值, 为2211 J/cm<sup>3</sup>(表2)。根据对虾不随饥饿时间变化而保持稳定的呼吸耗氧率, 利用公式(5)计算单位时间单位体积维持耗能率[p<sub>M</sub>]的值, 为31.47 J/(cm<sup>3</sup>·d)(表2)。



### 3 讨论

尽管 DEB 模型所需参数的数量较少, 但参数的获取相对复杂, 对参数精准度要求较高(Ren *et al.*, 2008)。体积是 DEB 模型输出体长、干重等变量的关键因素且较难测量, 综合考量本研究通过对虾湿重与密度的乘积获得(Sablani *et al.*, 2004)。而形状系数  $\delta m$  是表征体积的重要参数, 通过对虾湿重的立方根和体长进行线性回归得出。在目前已有虾类 DEB 模型参数的报道中, 形状系数取值范围主要为 0.2~0.3, 如南极磷虾(Jager *et al.*, 2016)的  $\delta m$  值为 0.21, 褐虾(Campos *et al.*, 2009)为 0.21, 蓝虾为 0.28 等。但 Mehner 等(1994)研究显示, 绿虎虾(*Penaeus semisulcatus*)的  $\delta m$  值为 0.81, 主要是因为其湿重与体长的比值远高于其他虾类。本研究为使形状系数更加准确有效, 选取的样本覆盖整个生长过程, 最终测得凡纳滨对虾的形状系数  $\delta m$  值为 0.23, 与大多数报道相近。

水温不仅是构建海洋物种 DEB 模型的重要强制函数, 而且对凡纳滨对虾的能量收支也有重要意义。因为虾的摄食、生长、排氨、耗氧和同化等生理活动在很大程度上都受制于温度, 所以模型参数中的 Arrhenius 温度  $T_A$  值可通过测定温度对生物这几项指标的影响获得(张继红等, 2017)。在实验室中, 进行摄食、生长和同化实验需要的周期过长且繁琐, 排氨实验由于虾粪便、饲料残渣的溶失和不易收集导致结果不准确。而耗氧实验往往实验周期短且结果精准(陈琴等, 2001), 因此本研究选择耗氧方案来获得凡纳滨对虾 Arrhenius 温度  $T_A$  值。大多数虾类  $T_A$  值主要在 5500~9000 范围内, 例如南极磷虾(Jager *et al.*, 2016)为 5630, 蓝虾为 8000, 褐虾(Campos *et al.*, 2009)为 9000。本研究测得凡纳滨对虾的  $T_A$  值为 6156, 位于已知研究报道范围内。常亚青(2007)研究分析  $T_A$  值差异较大的主要原因是不同地域、不同种群对温度的响应适应能力有差异。水温在 DEB 模型中的赋值比较模糊, 一般都是参考当地的水文条件, 但天然水域的水温不仅随季节时间变化且随深度变化(Campos *et al.*, 2009)。凡纳滨对虾的生活习性是昼伏夜出, 昼夜所待的水层温度不一。Saborowski 等(2000)研究表明, 南极磷虾每天要接受 6 h 的表层水温和 18 h 的深层水温。而本研究中的工厂化养虾车间配有专业的供暖设备, 使水温维持在 27℃~28℃, 水温不随时间和深度变化, 因此本研究的  $T_A$  值比传统天然大水面模型更准确有效。

$[E_G]$ 、 $[E_M]$ 和 $[\dot{p}_M]$ 是构建凡纳滨对虾 DEB 模

型必需的 3 个参数, 本研究参考 van der Veer 等(2006)测取双壳类的方法, 通过饥饿实验获取数据转化求得这 3 个参数。根据凡纳滨对虾饥饿实验结束后的干重来计算  $[E_G]$  的值, 但饥饿时间不能过长, 否则会造成结构物质分解以致参数值偏低; 根据凡纳滨对虾初始和饥饿后的能量之差计算  $[E_M]$  值, Kooijman (2000)研究指出, 可通过比较个体在生长旺盛季节和在冬季的能量之差间接估计得出, 但这种方法周期过长且所得参数值偏低; 根据凡纳滨对虾饥饿后基本恒定的呼吸耗氧率来计算  $[\dot{p}_M]$  的值。不同虾类的  $[E_G]$ 、 $[E_M]$ 和 $[\dot{p}_M]$ 值都有一定差异, 其主要原因是不同虾类对饥饿胁迫的响应程度不同, 导致最终的参数值不同。Kooijman (2000)研究表明, 物种维持和生长所用能量的比例、单位结构体积的生长成本和最大储存密度与温度无关, 并将在物种分布区保持不变。虾类  $[E_G]$ 和 $[E_M]$ 的值一般分别在 2500~6000 和 800~3000 范围内, 本研究得到的  $[E_G]$ 和 $[E_M]$ 均在此范围内。

Campos 等(2009)研究将褐虾饥饿 24 d 后, 发现干重和耗氧率分别降低了 54%和 45%, 而本研究测得凡纳滨对虾在饥饿 31 d 后干重和耗氧率较初始值分别下降 47.8%和 38%。其中, 耗氧率下降是因为在食物密度和储备能量变低时, 对虾会通过调节自身代谢水平来适应环境的变化, 减少能量的消耗(Mehner *et al.*, 1994)。van der Veer 等(2006)研究发现, 虾类  $[\dot{p}_M]$  的值一般在 15~60 范围内, 差异主要与不同虾类的单位体积大小密切相关, 本研究获得的  $[\dot{p}_M]$  在此范围内。

目前, 关于虾类 DEB 模型参数的报道较少, 一个重要的因素是甲壳类物种的体长不是持续增加, 而是通过周期性蜕壳完成的, 而以往大都假设建模物种的各个尺寸指标是持续增长的。蜕去的虾壳也意味着同化的一部分能量流失, 王吉桥等(2004)研究指出, 这部分能量在 3%左右, 这也是模型模拟出的体长、干重比实测值偏小的原因之一。在以后的研究中, 需要对虾类的蜕壳机制进行细致的探究来解决这一问题, Talbot 等(2019)进行过甲壳类物种蜕壳的探索性研究。为解释清楚这一点, 研究人员将 DEB 模型扩展到跟踪碳质量的持续增加以及物理尺寸的间歇性增加, 为下一步研究指明了方向。本研究凡纳滨对虾的 DEB 建模研究中, 整体生长仍被假设为连续的。

### 4 结论

本研究得到的 5 个模型参数精准度虽有待提高, 但都是有效的。在最优食物、水温条件下构建的凡纳

滨对虾 DEB 模型是成功的, 更加细致地模拟了凡纳滨对虾生长对环境的反馈。DEB 模型作为国内外研究热点已广泛应用于多种海洋生物, 但对于对虾等甲壳类研究较少。本研究通过相关实验获得了构建凡纳滨对虾动态能量收支模型的 5 个必需参数, 为后续凡纳滨对虾动态能量收支模型的构建奠定了基础, 也为进一步研究其他甲壳类动物提供了理论依据, 以期为进一步研究其他甲壳类动物提供了理论依据, 以期为进一步研究其他甲壳类动物提供了理论依据, 以期为进一步研究其他甲壳类动物提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- BERNARD I, DE KERMOYSAN G, POUVREAU S. Effect of phytoplankton and temperature on the reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Investigation through DEB theory. *Journal of Sea Research*, 2011, 66(4): 349–360
- BOURLÈS M, ALUNNO-BRUSCIA S, POUVREAU G, *et al.* Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research*, 2009, 62(2/3): 62–71
- CAI B Y, ZHU C B, LIU H, *et al.* Model simulated growth of kelp *Saccharina japonicain* Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 31–41 [蔡碧莹, 朱长波, 刘慧, 等. 桑沟湾养殖海带生长的模型预测. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 31–41]
- CAMPOS J, VAN DER VEER H W, FREITAS V, *et al.* Contribution of different generations of the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) in the Dutch Wadden Sea to commercial fisheries: A dynamic energy budget approach. *Journal of Sea Research*, 2009, 62(2/3): 106–113
- CHANG Y Q. Mollusc culture. Beijing: China Agriculture Press, 2007 [常亚青. 贝类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 2007]
- CHEN Q, CHEN X H, LUO Y J, *et al.* Preliminary determination of oxygen consumption rate and suffocation point of *Penaeus vannamei*. *Reservoir Fisheries*, 2001, 21(2): 14–15 [陈琴, 陈晓汉, 罗永巨, 等. 南美白对虾耗氧率和窒息点的初步测定. *水利渔业*, 2001, 21(2): 14–15]
- DENG W, HUANG T S, ZHANG Z D. The development status and countermeasures of the seed industry of *Penaeus vannamei* in China. *China Fisheries*, 2013(12): 22–25 [邓伟, 黄太寿, 张振东. 我国南美白对虾种业发展现状及对策建议. *中国水产*, 2013(12): 22–25]
- DUAN J Y, LIU H, CHEN S Q, *et al.* The measurement of parameters for the dynamic energy budget (DEB) model in *Haliotis discus hannai* Ino (disk abalone). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 110–117 [段娇阳, 刘慧, 陈四清, 等. 基于 DEB 理论的皱纹盘鲍个体生长模型参数的测定. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 110–117]
- FUENTES-SANTOS I, LABARTA U, ÁLVAREZ-SALGADO X A. Modelling mussel shell and flesh growth using a dynamic net production approach. *Aquaculture*, 2019, 506: 84–93
- JAGER T, RAVAGNAN E. Modelling growth of northern krill (*Meganctiphanes norvegica*) using an energy-budget approach. *Ecological Modelling*, 2016, 325: 28–34
- KOOIJMAN S A L M. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
- KOOIJMAN S A L M. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge University Press, 2009
- LIU H, CAI B Y. Advance in research and application on aquaculture carrying capacity. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 158–166 [刘慧, 蔡碧莹. 水产养殖容量研究进展及应用. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 158–166]
- MARINOV D, GALBIATI L, GIORDANI P, *et al.* An integrated modelling approach for the management of clam farming in coastal lagoons. *Aquaculture*, 2007, 269(1/2/3/4): 306–320
- MEHNER T, WIESER W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Fish Biology*, 1994, 45(2): 325–333
- REN J S, JIN X, YANG T, *et al.* A dynamic energy budget model for small yellow croaker *Larimichthys polyactis*: Parameterisation and application in its main geographic distribution waters. *Ecological Modelling*, 2020, 427: 109051
- REN J S, ROSS A H. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling*, 2001, 142(1/2): 105–120
- REN J S, SCHIEL D R. A dynamic energy budget model: Parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 361(1): 42–48
- SABLANI S S, KASAPIS S, RAHMAN M S, *et al.* Sorption isotherms and the state diagram for evaluating stability criteria of abalone. *Food Research International*, 2004, 37(10): 915–924
- SABOROWSKI R, SALOMON M, BUCHHOLZ F. The physiological response of Northern krill (*Meganctiphanes norvegica*) to temperature gradients in the Kattegat. *Hydrobiologia*, 2000, 426(1): 157–160
- SATO T, IMAZU Y, SAKAWA T, *et al.* Modeling of integrated marine ecosystem including the generation-tracing type scallop growth model. *Ecological Modelling*, 2007, 208(2/3/4): 263–285
- SOUSA T, MOTA R, DOMINGOS T, *et al.* Thermodynamics of organisms in the context of dynamic energy budget theory. *Physics Review E*, 2006, 74(5): 051901
- TALBOT S E, WIDDICOMBE S, HAUTON C, *et al.* Adapting the dynamic energy budget (DEB) approach to include non-continuous growth (moulting) and provide better predictions of biological performance in crustaceans. *Journal of Marine Science*, 2019, 76(1): 192–205
- VAN DER VEER H, CARDOSO J F M F, VEN DER MEER J.

- The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*, 2006, 56(2): 107–124
- WANG J Q, LUO M, ZHANG D Z, *et al.* Effects of water temperature and salinity on energy budget of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(2): 161–166 [王吉桥, 罗鸣, 张德治, 等. 水温和盐度对南美白对虾幼虾能量收支的影响. *水产学报*, 2004, 28(2): 161–166]
- WANG K, GAO S C, XU X, *et al.* Preliminary study on the application effect of energy-saving in-situ circulating aquaculture system in the industrialized farming of *Penaeus vannamei*. *Scientific Fish Farming*, 2019(9): 28–29 [汪珂, 高少初, 徐旭, 等. 节能型原位循环水养殖系统在凡纳滨对虾工厂化养殖中应用效果初探. *科学养鱼*, 2019(9): 28–29]
- YAO H. Technical analysis of industrial circulating aquaculture of *Penaeus vannamei*. *Agriculture and Technology*, 2020, 40(16): 112–114 [姚晖. 南美白对虾工厂化循环水养殖技术分析. *农业与技术*, 2020, 40(16): 112–114]
- ZHANG J H, WU W G, LIU Y, *et al.* A dynamic energy budget (DEB) growth model for Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* cultured in China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 497–506 [张继红, 吴文广, 刘毅, 等. 虾夷扇贝动态能量收支生长模型. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 497–506]
- ZHANG J H, WU W G, XU D, *et al.* The estimation of dynamic energy budget (DEB) model parameters for scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 703–710 [张继红, 吴文广, 徐东, 等. 虾夷扇贝动态能量收支模型参数的测定. *水产学报*, 2016, 40(5): 703–710]

(编辑 马璀艳)

## Determining the Parameters of the Dynamic Energy Budget Model of *Litopenaeus vannamei*

LIU Yang<sup>1,2</sup>, ZHU Jianxin<sup>2①</sup>, CHEN Xiaobao<sup>2,3</sup>, DUAN Jiaoyang<sup>2,3</sup>, XUE Zhiyong<sup>4</sup>, QU Keming<sup>2</sup>

(1. School of Marine Science, Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China;

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

3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Haiyang Yellow Sea Fisheries Co., Ltd., Yantai, Shandong 265100, China)

**Abstract** With the breeding technology development and progression of the breeding industry for *Litopenaeus vannamei*, their breeding has increased across the world, and high-density factory farming has become a new breeding mode for *L. vannamei*. However, with the scale and density expansion of breeding, there are a series of problems, such as germplasm degradation, water quality deterioration, and the emergence of frequent diseases. However, relevant research is insufficient at this stage in China, the layout of shrimp breeding is unreasonable, and planning is relatively poor, which severely restricts the survival and development of the *L. vannamei* breeding industry. Therefore, theoretical guidance on breeding capacity improvements is urgently needed. The establishment of a dynamic energy budget (DEB) model, an individual growth model based on the DEB theory to study the relationship between biological and physiological mechanisms and the environment, for *L. vannamei*, and further establishment of its aquaculture capacity, is of considerable significance for guiding aquaculture management and evaluating aquaculture capacity. Kooijman first proposed the theory of DEB based on the  $\kappa$  principle in 1986, which was used to describe the absorption, storage, and utilization of energy by organisms at the individual level. This indicates that a portion of the assimilated energy is used by organisms to maintain the growth of their own body, and the portion is used for development and reproduction. The DEB model can predict the dynamic growth of specific species' body length, weight, and gonads at the individual level. Assuming

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

that food and temperature are the main driving forces of biological metabolism, it provides a comprehensive framework for understanding the overall physiological performance of organisms. Therefore, to better control the individual dynamic growth status of the industrialized high-density culture of *L. vannamei*, this research utilized the DEB theory. With regard to the shrimp DEB model research method, five necessary parameters for constructing the DEB model of *L. vannamei* were obtained. The body length and wet weight of *L. vannamei* were obtained through biological measurements, and the shape coefficient ( $\delta m$ ) was obtained by transforming and regressing the two values. According to the oxygen consumption rate per dry weight of *L. vannamei* under different experimental temperature conditions, the Arrhenius temperature ( $T_A$ ) was calculated. According to the dry weight value of *L. vannamei* and the respiratory oxygen consumption rate in a starvation experiment, the values of three parameters (volume-specific costs for structure [ $E_G$ ], maximum storage density [ $E_M$ ] and volume-specific maintenance costs per unit of time [ $\dot{p}_M$ ]) were calculated using the measured energy. The experimental results showed that the body length and volume of *L. vannamei* exhibited a cubic function relationship as per the statistical analysis:  $V=0.009 3L^{3.109 4}$  ( $R^2=0.998 7$ ), and the linear regression slope of the wet weight cube root and body length of the shrimp is the shape coefficient  $\delta m$  ( $\delta m=0.23$ ). Three different experimental groups revealed a positive relationship of the oxygen consumption of *L. vannamei* per unit dry weight within the experimental temperature range of 22°C~34°C, with an inverse relationship after the temperature exceeded 34°C. Before the inflection point of 34°C, the  $\ln$  value of the oxygen consumption rate per unit dry weight had a linear relationship with the reciprocal of the temperature  $T$  (thermodynamic temperature, K). The average value of the absolute slope values of the three regression equation sets was the Arrhenius temperature ( $T_A$ ) value ( $T_A=6156$  K). After the starvation experiment, the dry weight of *L. vannamei* decreased from the (2.36±0.32) g to (1.23±0.24) g, and the organic matter content decreased from 82% to 62%. The formula calculated the values of [ $E_G$ ] and [ $E_M$ ] were 5826 and 2211 J/cm<sup>3</sup> respectively; the respiratory oxygen consumption rate stabilized from the initial 0.95 mg/(ind·h) to 0.58 mg/(ind·h), The value of [ $\dot{p}_M$ ] (volume-specific maintenance costs per unit of time) is 31.47 J/(cm<sup>3</sup>·d), calculated by the formula. To improve the accuracy and effectiveness of the study parameters, samples were collected over the entire growth process, and the values obtained were consistent with those of previous studies, within a reasonable range. Although the accuracy of the five model parameters obtained in this study needs to be improved, they are all effective. The *L. vannamei* DEB model constructed under optimal food and water temperature conditions is successful, and it simulates the feedback of the growth of *L. vannamei* to the environment in a detailed manner. The DEB model has been widely used for a variety of marine organisms worldwide; however, there is minimal research on crustaceans, such as shrimp. In this study, five necessary parameters for constructing the DEB model of *L. vannamei* were obtained through related experiments, which laid the foundation for the subsequent construction of the *L. vannamei* DEB model, and provided a reference for research on other crustaceans. The theoretical basis can provide support for the industrialized high-density farming of *L. vannamei*.

**Key words** DEB theory; *Litopenaeus vannamei*; Industrialization; Model parameters

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201209002

http://www.yykxjz.cn/

杨泽禹, 万夕和, 史文军, 王李宝, 黎慧, 沈辉, 乔毅, 蒋葛, 成婕. 凡纳滨对虾不同生长阶段肠道可培养细菌耐药性研究. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 175-184

YANG Z Y, WAN X H, SHI W J, WANG L B, LI H, SHEN H, QIAO Y, JIANG G, CHENG J. Study on bacterial resistance in *Litopenaeus vannamei* intestinal culturable bacteria at different growth stages. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 175-184

# 凡纳滨对虾不同生长阶段肠道 可培养细菌耐药性研究\*



杨泽禹<sup>1,2</sup> 万夕和<sup>1①</sup> 史文军<sup>1</sup> 王李宝<sup>1</sup> 黎慧<sup>1</sup>  
沈辉<sup>1</sup> 乔毅<sup>1</sup> 蒋葛<sup>1</sup> 成婕<sup>1</sup>

(1. 江苏省海洋水产研究所 江苏 南通 226007; 2. 高邮市水产技术指导站 江苏 高邮 225600)

**摘要** 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中多使用微生态制剂来调节水质, 为避免破坏池塘菌群结构, 很少使用抗生素。为了解凡纳滨对虾肠道细菌耐药性与不同生长阶段的关系, 本研究选取江苏地区 4 种主要养殖模式凡纳滨对虾成虾和虾苗作为研究对象, 利用 K-B 纸片法和 qRT-PCR 技术, 研究对虾样本肠道可培养细菌对四环素等 12 种抗生素的耐药性和 *tetA* 等 9 种抗生素耐药基因(ARGs)的丰度。结果显示, 不同养殖模式中的凡纳滨对虾肠道可培养细菌优势属为弧菌属(*Vibrio*); 成虾肠道内可培养细菌种类和数量较虾苗显著上升( $P<0.05$ ), 耐药菌(antibiotics resistant bacteria, ARB)占比降低, ARGs 丰度显著下降( $P<0.05$ ); 不同养殖模式之间规律不明显。研究表明, 各模式下成虾肠道细菌耐药性和 ARGs 丰度均低于虾苗, 提示, 养殖过程中通过施用微生态制剂来减少抗生素使用量的方法能降低凡纳滨对虾肠道可培养细菌的耐药性。

**关键词** 凡纳滨对虾; 细菌耐药性; 抗生素耐药基因(ARGs); qRT-PCR

**中图分类号** S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0175-10

近年来, 对虾养殖已成为我国水产行业的重要组成部分(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020)。经过多年的发展, 江苏沿海地区形成了多种凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖模式, 包括池塘鱼虾混养、小型温棚养殖等, 经济效益显著。

随着对虾养殖业的迅猛发展, 各种病害频发(Lee *et al*, 2015)。为推进水产养殖绿色发展, 农业农村部大力开展用药减量行动, 益生菌(Chumpol *et al*, 2017;

刘文亮等, 2017)、中草药(朱璐丹等, 2019; Zhang *et al*, 2021)等新型无抗化防病技术不断被运用到生产实践中。目前, 国务院兽医行政管理部门批准的水产养殖用抗菌药有 12 种(农业农村部, 2020)。研究表明, 抗生素在水产养殖上使用后部分被养殖对象吸收, 不能吸收的部分则被排出体外(张寿月等, 2015), 残留在土壤、水源中(D'costa *et al*, 2006), 对动物体内以及环境中的细菌耐药性产生定向选择作用(Österblad

\* 江苏省第十六批“六大人才高峰”高层次人才项目(NY-106)和江苏省农业科技自主创新资金-农产品产业发展关键技术创新[CX(18)2010]共同资助 [This work was supported by 16th Batch of “Six Talent Peaks” High-Level Talents Project in Jiangsu Province (NY-106), and Independent Innovation Fund for Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province-Key Technological Innovations in the Development of Agricultural Products Industry [CX(18)2010]]. 杨泽禹, E-mail: 779287258@qq.com

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

收稿日期: 2020-12-09, 收修改稿日期: 2021-01-27



et al, 2001), 诱导耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的产生(Fridman et al, 2014; Frimodt-Møller et al, 2019)与传递(Frost et al, 2005; Mazel, 2006), 改变环境和生物体内微生态结构, 最终威胁人类健康与安全。

本课题组前期调研发现, 江苏地区凡纳滨对虾养殖过程多使用微生态制剂来调节水质, 为避免破坏池塘菌群结构, 生产中很少施用抗生素。本研究选择 4 种不同养殖模式的凡纳滨对虾虾苗和成虾作为研究对象, 利用 K-B 纸片法研究其肠道可培养细菌对 6 大类 12 种抗生素(四环素、多西环素、氟苯尼考、氯霉素、磺胺异恶唑、复方新诺明、新霉素、庆大霉素、环丙沙星、诺氟沙星、头孢曲松和头孢噻肟)的耐药性, 并通过 qRT-PCR 技术检测肠道细菌总 DNA 中 5 大类 9 种 ARGs (*tetA*、*tetG*、*qnrA*、*qnrS*、*cmle3*、*floR*、*aadA*、*sul1*、*sul2*)的丰度, 探究江苏地区常见 4 种养殖模式下凡纳滨对虾不同生长阶段肠道耐药菌(antibiotics resistant bacteria, ARB)和 ARGs 污染的变化情况, 为

后续防控细菌耐药性产生以及水产养殖科学用药提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究选取江苏地区 12 家养殖场凡纳滨对虾 4 种主要养殖模式苗种投放前和成虾上市前 2 个时间节点的对虾为研究对象, 苗种来源于省外不同虾苗生产企业, 每种模式苗种、成虾样品各 3 份, 共 8 组 24 个样品。4 种养殖模式分别为: 模式 1 [M1, 土塘养殖: 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)主养, 凡纳滨对虾混养]、模式 2 (M2, 土塘养殖: 凡纳滨对虾主养, 斑点叉尾鲷混养)、模式 3 (M3, 小棚凡纳滨对虾精养)、模式 4 [M4, 大水面养殖: 凡纳滨对虾、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)和鲫鱼(*Carasus anratus*)混养]。样品详细信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab.1 Sample information ( $n=10$ ; Mean $\pm$ SD)

养殖阶段 Culture stage	组别 Group	样品编号 Sample ID	采样时间 Sampling time	对虾重量 Shrimp weight/g	养殖模式 Aquaculture model
苗种 Postlarvae	P-TTY	P-TTY-1	2019-05-30	0.023 0 $\pm$ 0.002 7	M1
		P-TTY-2		0.018 0 $\pm$ 0.005 8	
		P-TTY-3		0.028 0 $\pm$ 0.011 0	
	P-TTX	P-TTX-1	2019-05-30	0.015 0 $\pm$ 0.007 1	M2
		P-TTX-2		0.015 0 $\pm$ 0.002 7	
		P-TTX-3		0.017 0 $\pm$ 0.004 3	
	P-XP	P-XP-1	2019-08-13	0.012 0 $\pm$ 0.006 7	M3
		P-XP-2		0.021 0 $\pm$ 0.009 1	
		P-XP-3		0.013 0 $\pm$ 0.001 1	
P-DSM	P-DSM-1	2019-06-05	0.020 0 $\pm$ 0.001 7	M4	
	P-DSM-2		0.019 0 $\pm$ 0.000 9		
	P-DSM-3		0.016 0 $\pm$ 0.002 9		
成虾 Adult shrimp	C-TTY	C-TTY-1	2019-09-06	12.60 $\pm$ 1.82	M1
		C-TTY-2		12.20 $\pm$ 1.22	
		C-TTY-3		10.40 $\pm$ 0.47	
	C-TTX	C-TTX-1	2019-09-06	13.20 $\pm$ 1.31	M2
		C-TTX-2		11.50 $\pm$ 1.66	
		C-TTX-3		12.60 $\pm$ 2.03	
	C-XP	C-XP-1	2019-11-13	11.30 $\pm$ 0.76	M3
		C-XP-2		12.00 $\pm$ 0.33	
		C-XP-3		13.10 $\pm$ 0.64	
	C-DSM	C-DSM-1	2019-09-16	15.30 $\pm$ 2.07	M4
		C-DSM-2		14.70 $\pm$ 1.34	
		C-DSM-3		14.70 $\pm$ 2.84	

## 1.2 可培养细菌平板计数、分离、纯化及鉴定

对虾体表用 75%酒精擦拭消毒,并用灭菌生理盐水漂洗后再进行肠道细菌分离培养。每组成虾样品取 10 只成虾的肠道,混匀称重后,加入 1 mL 灭菌生理盐水充分研磨,取 100  $\mu$ L 适当稀释后的研磨液于 2216E 平板上均匀涂布,每个样品做 3 个重复,28 $^{\circ}$ C 培养过夜后进行计数。每组虾苗样品取 10 只虾苗重复上述操作。取均值作为各组凡纳滨对虾肠道可培养细菌含量。在平板上挑取形态不同的单菌落纯化培养 2 代后,利用细菌 *16S rDNA* 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后,通过 Blast 检索系统对细菌序列同源性进行分析。

## 1.3 可培养细菌耐药性检测

以大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株(ATCC 25922)为质控菌,利用 K-B 纸片法测定上述分离纯化的细菌对四环素类、氯霉素类、磺胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类和  $\beta$ -内酰胺类 6 大类 12 种抗生素的耐药性,每株菌做 3 个重复。药物敏感性实验方法

及判读标准参考美国临床与实验室标准化研究所(CLSI)操作手册(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017)和《全国临床检验操作规程》(尚红等, 2015)。药敏纸片和 MH 培养基购于杭州微生物试剂有限公司。耐药菌占比计算公式如下:

$$\text{虾苗(成虾)耐药菌占比(\%)} = \frac{\text{虾苗(成虾)肠道可培养细菌中耐药菌株数}}{\text{虾苗(成虾)肠道可培养细菌总株数}}$$

## 1.4 ARGs 丰度检测

**1.4.1 ARGs 标准质粒构建及标准曲线绘制** 利用 ARGs 引物(目的基因信息详见表 2),对本研究室储存的对虾源细菌 DNA 样品进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳法检测目的条带。挑选出强阳性样本,用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (TaKaRa)回收目的条带。用 pMD18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa)对目的基因进行克隆。利用蓝白斑筛选、通用引物 M13 普通 PCR 扩增以及菌液测序的方法来验证克隆成功与否。用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0 (TaKaRa)提取克隆成

表 2 目的基因信息  
Tab.2 Target gene information

类别 Category	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'~3')	$T_m/^{\circ}\text{C}$	扩增长度 Amplicon length/bp	参考文献 Reference
四环素类 Tetracyclinas	<i>tetA</i>	F: GGTGGATGAGGAACGTCAGG	58	100	李壹等(2016)
		R: CGCATAGATCGCCGTGAAGA			
	<i>tetG</i>	F: GCACTCTATTCTGCCACC	58	95	李壹等(2016)
		R: GGTCTGCGTAGTATTGGCA			
喹诺酮类 Quinolones	<i>qnrA</i>	F: AGTGGCCAATGCCTGGAAAA	58	166	李壹等(2016)
		R: CCAGATCGGCAAAGGTTAGG			
	<i>qnrS</i>	F: AAAGGTGCCAACTTTTCCCG	57	113	李壹等(2016)
		R: ACCCTCTCCATATTGGCAT			
氯霉素类 Chloramphenicol	<i>cmle3</i>	F: ACGTTTATGCCAACCGTCCT	58	132	李壹等(2016)
		R: TGAATATCGCCTGC CATCCC			
	<i>floR</i>	F: TATCTCCCTGTCGTTCCAG	56	399	李壹等(2016)
		R: AGAACTCGCCGATCAATG			
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aadA</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	56	284	王慧平等(2017)
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1</i>	F: CAC CGG AAA CAT CGC TGC A	58	158	He 等(2014)
		R: AAGTTCCGCCGCAAGGCT			
	<i>sul2</i>	F: TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	61	190	Pei 等(2006)
		R: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
内参基因 Reference genes	<i>16S rDNA</i>	F: GGTAGTCYAYGCMSTAAACG	62	265	Bach 等(2002)
		R: GACARCCATGCASCACCTG			

功菌液的质粒,并以此质粒为标准品模板,利用 Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR System 进行 qRT-PCR 分析,绘制标准曲线。

目的基因 PCR 程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s,  $T_m$  45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环 72℃ 10 min。qRT-PCR 程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。溶解曲线程序: 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s。20 L 反应体系: 10  $\mu$ L TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa), 上、下游引物各 0.4  $\mu$ L, ROX 0.4  $\mu$ L, 模板 0.2  $\mu$ L。

#### 1.4.2 样品 DNA 提取及 qRT-PCR 检测 ARGs 丰度

用 3S DNA Isolation Kit for Environment Samples (上海博彩生物)提取样品肠道细菌 DNA(每组成虾样品取 10 只成虾的肠道研磨混匀后提取, 每组虾苗样品取 10 只虾苗研磨混匀后提取), 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 Thermo Nanodrop 2000 检验 DNA 质量, 以合格的 DNA 为模板, 进行 qRT-PCR 检测, 条件与反应体系同 1.4.1。根据标准曲线计算各基因拷贝数的绝对含量, 以 *16S rDNA* 为内参基因作归一化处理, 计算各 ARGs 的相对含量, 并以该相对含量进行下一步数据统计和分析。

#### 1.5 数据统计方法

采用 Excel 2019 进行可培养细菌数量统计、药物敏感性分析、ARGs 标准曲线绘制以及 ARGs 样品  $C_t$  值归一化处理等。用 TBtools 对基因相对含量进行聚类热图分析(Chen *et al*, 2020)。

## 2 结果

### 2.1 可培养细菌平板计数及分类鉴定结果

苗种样品中可培养细菌总数最小值为 33 CFU/g, 最大值为  $2.73 \times 10^4$  CFU/g; 成虾样品可培养细菌总数最小值为  $6.33 \times 10^4$  CFU/g, 最大值为  $1.12 \times 10^7$  CFU/g。按不同养殖模式分类, 4 种养殖模式苗期至成虾期细菌总数分别上升 1832.1 (M1)、206.1 (M2)、610.0 (M3) 和 81.8 (M4) 倍。各组对虾肠道可培养细菌含量对数值见图 1。

共分离纯化得到 17 种、49 株可培养细菌, 来源于 8 个不同属, 分别为弧菌属(*Vibrio*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、西瓦氏菌属(*Shewanella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)(表 3)。其中, 数量最多的为弧菌属, 共计 30 株, 占 61.2%。弧菌属主要种类为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和副溶血弧菌

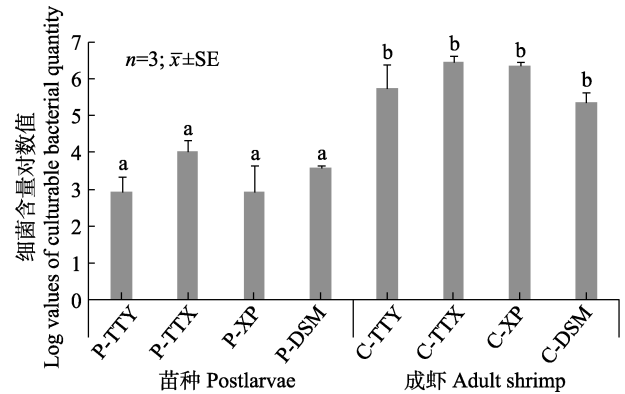


图 1 各组对虾肠道可培养细菌含量对数值  
Fig.1 Log values of culturable bacterial quantity in shrimp intestinal tract of different groups

柱形图上方不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

纵坐标为对应组别 3 个样品可培养细菌含量对数值均值。Different letters on the column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The ordinate represents mean log values of three samples' culturable bacterial quantity in the corresponding group

(*V. parahaemolyticus*), 分别为 11 株和 9 株, 占比为 36.7%和 30%。苗种样品中分离到 3 属, 10 种, 21 株细菌。其中, 数量最多的为溶藻弧菌(9 株), 占 42.9%。成虾样品中共分离到 8 属, 12 种, 28 株细菌, 其中副溶血弧菌 8 株, 占 30.8%。

### 2.2 可培养细菌耐药性检测结果

对虾肠道耐药菌占比结果见表 4。虾苗和成虾肠道耐药菌占比均较低, 对氯霉素、庆大霉素、头孢曲松等药物的耐药菌占比都为 0, 对四环素类和磺胺类抗生素耐药的菌株占比稍高, 但最大也只有 19.05%。同时, 成虾肠道耐药菌占比均低于虾苗。

### 2.3 ARGs 丰度检测结果

**2.3.1 ARGs 标准曲线** 以 ARGs 拷贝数对数值为横坐标, 样品  $C_t$  值为纵坐标绘制标准曲线, 结果见表 5。各 ARGs 标准曲线斜率( $a$ )介于 -3.388 6~3.142 8 之间, 截距( $b$ )介于 40.647~46.469 之间, 相关系数( $R^2$ )介于 0.991 3~0.998 5 之间, 引物扩增效率( $E\%$ )介于 97.3~108.1 之间, 溶解曲线无杂峰。结果表明, 标准曲线线性良好, 且引物扩增效率高, 能够用于相对拷贝数的计算。

**2.3.2 ARGs 丰度及分布特征** 结果显示, 所有耐药基因丰度在凡纳滨对虾肠道中表现较低, 以样品 P-TTY-2 中 *cmle3* 丰度稍高, 为 84.6; *tetA* 在 C-TTY-1 和 C-DSM-1 两份样品中未被检出; *qnrA* 在 C-TTX-1、C-XP-1、C-XP-2、C-XP-3、C-DSM-1、C-DSM-2 和 C-DSM-3 七份样品中未被检出。*sul2* 在

表 3 可培养细菌分类及数量  
Tab.3 Classification and quantity of culturable dominant bacteria

养殖阶段 Culture stage	属名 Genus	种名 Species	数量/株 Quantity/strains
虾苗 Postlarvae	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	甘瓜发光杆菌 <i>P. ganghwense</i>	3
	西瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	海藻希瓦氏菌 <i>S. algae</i>	1
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	溶藻弧菌、河流弧菌、解蛋白弧菌、副溶血弧菌、新喀里多尼亚弧菌、弗氏弧菌、创伤弧菌、需钠弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. neocaledonicus</i> , <i>V. furnissii</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. natriegens</i>	17
成虾 Adult shrimp	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	1
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	2
	微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>	2
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	甘瓜发光杆菌 <i>P. ganghwense</i>	2
	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	拟互生单胞菌 <i>P. fenneroopenaei</i>	1
	西瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	利托里氏沙瓦氏菌、亚马逊雪旺菌 <i>S. litorisediminis</i> , <i>S. amazonensis</i>	4
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	溶藻弧菌、河流弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	13
	盐芽孢杆菌属 <i>Halobacillus</i>	达坂喜盐芽孢杆菌 <i>H. dabanensis</i>	1
	无法归类的 Unclassified		2

表 4 对虾肠道耐药菌占比  
Tab.4 Antibiotics resistant bacteria (ARB) proportion in shrimp intestinal tract

种类 Category	抗生素 Antibiotic	耐药菌占比 ARB proportion/%	
		虾苗 Postlarvae	成虾 Adult shrimp
四环素类 Tetracyclinas	四环素 Tetracycline, TE	19.05	10.71
	强力霉素 Doxycycline, DO	19.05	7.14
氯霉素类 Chloramphenicol	氟苯尼考 Fluorobenicol, FFC	4.76	0
	氯霉素 Chloromycetin, C	0	0
磺胺类 Sulfonamides	磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole, SF	14.29	7.14
	复方新诺明 Cotrimoxazole, SXT	14.29	7.14
氨基糖苷类 Aminoglycosides	新霉素 Neomycin, N	9.52	7.14
	庆大霉素 Gentamicin, CN	0	0
喹诺酮类 Quinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin, CIP	4.76	0
	诺氟沙星 Norfloxacin, NOR	4.76	0
β-内酰胺类 β-lactams	头孢曲松 Ceftriaxone, CRO	0	0
	头孢噻肟 Cefotaxime, CTX	4.76	3.57

样品 C-DSM-1 中未被检出。样品中 9 种 ARGs 相对含量范围见表 6。

ARGs 丰度检测结果见图 2。由 ARGs 丰度聚类分析结果可见，苗种和成虾样品聚在不同的分支，养

成后的对虾中的 ARGs 丰度均较养殖前虾苗中低，表明经过 1 个养殖周期，ARGs 丰度降低。氯霉素类 (*cmle3*、*floR*)、四环素类(*tetG*)和磺胺类(*sul2*) 4 种 ARGs 在虾苗样品中出现。

表 5 抗生素 ARGs 标准曲线  
Tab.5 Standard curves of drug antibiotic resistance genes

基因 Gene	标准曲线 Standard curve	相关系数 $R^2$ Correlation coefficient	扩增效率 Amplification efficiency/%
<i>tetA</i>	$y=-3.204 8x+44.127$	0.991 3	105.1
<i>tetG</i>	$y=-3.142 8x+42.512$	0.997 1	108.1
<i>qnrA</i>	$y=-3.288 5x+42.602$	0.996 0	101.5
<i>qnrS</i>	$y=-3.303 1x+41.402$	0.998 5	100.8
<i>cmle3</i>	$y=-3.239 8x+40.647$	0.994 3	103.5
<i>floR</i>	$y=-3.388 6x+45.541$	0.995 4	97.3
<i>aadA</i>	$y=-3.195 1x+43.851$	0.996 1	98.6
<i>sul1</i>	$y=-3.283 1x+43.174$	0.996 5	101.6
<i>sul2</i>	$y=-3.261 3x+41.066$	0.997 1	102.6
<i>16S rDNA</i>	$y=-3.278 9x+46.469$	0.991 7	101.8

表 6 9 种 ARGs 相对含量范围  
Tab.6 Relative contents range of 9 antimicrobial resistant genes/(copies/16S rDNA)

基因 Gene	虾苗 Postlarvae		成虾 Adult shrimp	
	最小值 Minimum	最大值 Maximum	最小值 Minimum	最大值 Maximum
<i>tetA</i>	$3.82 \times 10^{-5}$	$1.29 \times 10^{-2}$	0	$3.35 \times 10^{-4}$
<i>tetG</i>	$6.15 \times 10^{-4}$	$4.78 \times 10^{-2}$	$4.62 \times 10^{-6}$	$8.83 \times 10^{-5}$
<i>qnrA</i>	0	$8.34 \times 10^{-4}$	0	$3.68 \times 10^{-3}$
<i>qnrS</i>	$1.10 \times 10^{-5}$	$3.41 \times 10^{-3}$	$3.33 \times 10^{-7}$	$1.82 \times 10^{-4}$
<i>cmle3</i>	$1.05 \times 10^{-2}$	$8.46 \times 10^{-1}$	$5.90 \times 10^{-5}$	$4.61 \times 10^{-3}$
<i>floR</i>	$3.87 \times 10^{-4}$	$6.27 \times 10^{-2}$	$5.51 \times 10^{-6}$	$9.64 \times 10^{-5}$
<i>aadA</i>	$1.37 \times 10^{-4}$	$7.19 \times 10^{-3}$	$2.72 \times 10^{-6}$	$2.13 \times 10^{-3}$
<i>sul1</i>	$1.57 \times 10^{-4}$	$1.61 \times 10^{-3}$	$3.53 \times 10^{-5}$	$6.28 \times 10^{-4}$
<i>sul2</i>	$6.98 \times 10^{-4}$	$2.93 \times 10^{-2}$	0	$6.12 \times 10^{-5}$

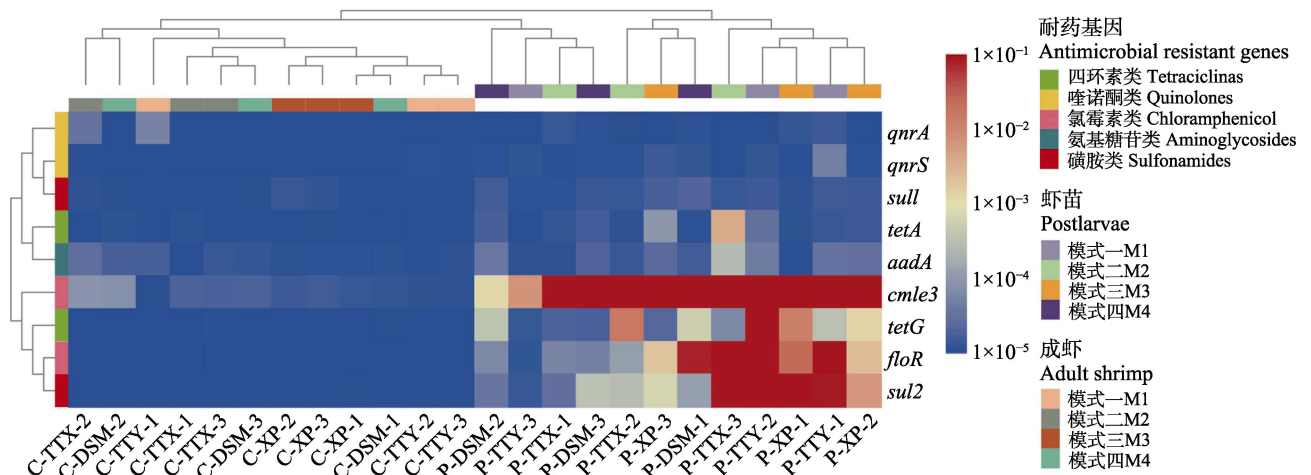


图 2 9 种 ARGs 的丰度热图  
Fig.2 Heat map of abundance of 9 antimicrobial resistant genes



### 3 讨论

#### 3.1 凡纳滨对虾肠道可培养细菌

张盛静等(2015)研究表明, 凡纳滨对虾在苗种阶段肠道内可培养的细菌属包括弧菌属、发光杆菌属、芽孢杆菌属和盐单胞菌属(*Halomonas*)等, 其中弧菌属占绝对优势, 养成阶段肠道内可培养的细菌属包括乳球菌属(*Lactococcus*)、弧菌属、芽孢杆菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属、节杆菌属(*Arthrobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)等。本研究结果与其相似, 部分种属之间的差异可能与养殖过程中微生态制剂使用较多(吴定心, 2016)和抗生素使用较少有关。

#### 3.2 可培养细菌抗生素耐药性

目前, 国内已批准的水产养殖用抗微生物药物有 12 种(农业农村部, 2020), 在鱼类细菌病的防控中起着重要作用。在我国部分养殖区(王志芳等, 2019; 李兆新等, 2018)的环境中能检出喹诺酮类、磺胺类、四环素类等抗生素残留, 且距离养殖区越近浓度越高, 呈现明显的时空分布特征(连璐璐, 2016)。持续性的低剂量抗生素胁迫, 会增强细菌耐受性和耐药性, 降低抗生素治疗效率。研究显示, 间歇性将 *E. coli* 群体暴露于氨苄青霉素(ampicillin)中, 其群体会对氨苄青霉素产生耐受性(Fridman *et al.*, 2014), 诱发菌株突变产生耐药性(Frimodt-Møller *et al.*, 2019)。给日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)长期投饲含安全剂量抗生素的日粮后, 会增加其体内细菌耐药性选择压力(Sun *et al.*, 2020)。因此, 必须重视细菌的耐药性。

本研究分离所得可培养细菌中对常见抗生素的耐药性均较低, 仅对四环素类和磺胺类抗生素存在一定的耐药性, 这与现实环境抗生素残留污染趋势类似(王志芳等, 2019; 李兆新等, 2018; 连璐璐, 2016), 提示, 这些细菌的耐药能力可能与自然环境中抗生素污染情况有关。另外, 成虾耐药菌占比较虾苗降低, 表明成虾肠道耐药菌污染程度较虾苗轻。

#### 3.3 ARGs 丰度差异

抗生素使用可增加 ARGs 丰度和多样性(Fridman *et al.*, 2014; Frimodt-Møller *et al.*, 2019)。已有文献报道在对虾体内、肠道及养殖环境中检测出多种抗生素 ARGs (Su *et al.*, 2017; 洪斌等, 2019), 整合子等一些移动基因原件(mobile genetic element, MGE)可促进 ARGs 在细菌间的传播(Mazel, 2006; Frost *et al.*, 2005)。天津地区水产养殖环境中, 磺胺类 ARGs *sul1* 和 *sul2* 丰度较高(Gao *et al.*, 2012); 对虾体内和养殖水

环境中优势 ARGs 分别为 *sul1*、*qnrD*、*cmlA*、*floR* (Su *et al.*, 2017)。本研究结果与前人研究结果类似, 其中, *floR* 和 *cml3* 丰度稍高, 可能与动物专用抗菌药氟苯尼考的使用有关, 而磺胺类和四环素类 ARGs 则可能来源于环境污染。另外, 研究还发现, 成虾样品的 ARGs 丰度均显著低于苗种样品( $P < 0.05$ ), 提示经过 1 个养殖周期, 对虾体内 ARGs 污染程度下降。

#### 3.4 细菌耐药性和 ARGs 关系分析

研究结果显示, 菌株对各大类抗生素的敏感性与其所对应的 ARGs 丰度并不能呈现完全一一对应的关系, 这与闫倩倩等(2020)、牛丽等(2019)和赵姝等(2019)等研究结果类似。如氟苯尼考和氯霉素的耐药菌占比都很低, 但 *floR* 和 *cml3* 丰度高。这可能是由于对虾肠道可培养细菌占肠道菌群的比例低, 且本研究仅针对肠道中可培养细菌展开耐药性研究, 因此二者结果存在差异。又如, 新霉素耐药菌占比较高, 但 *aadA* 丰度较低。这可能是由于细菌受到脂质层(Lambert, 2002)和抗渗屏障(Mcdonnell *et al.*, 1999)等因素的影响而表现出较强的耐药性, 或者该耐药能力由氨基糖苷类其他的 ARGs 所赋予。

研究发现, 多数细菌耐药性和 ARGs 丰度呈现出对应关系。如磺胺异恶唑、复方新诺明的耐药菌占比和 *sul2* 丰度表现相一致, 其来源可能与自然环境污染有关。环丙沙星、诺氟沙星耐药菌占比和 *qnrS*、*qnrA* 丰度都较低, 提示本地区凡纳滨对虾养殖业中, 这 2 类药物可能使用较少, 符合国家禁用这 2 种抗生素的规定, 也表明我国自 2017 年开展的水产养殖用药减量行动的效果逐步显现。

### 4 结论

本研究阐述了江苏地区 4 种养殖模式下, 凡纳滨对虾肠道细菌耐药性和 ARGs 丰度与不同生长阶段的关系。研究表明, 江苏地区 4 种养殖模式凡纳滨对虾肠道可培养细菌属为弧菌属; 成虾肠道可培养细菌种类和数量较虾苗显著上升( $P < 0.05$ ), 耐药菌占比降低, ARGs 丰度显著降低( $P < 0.05$ ); 各模式之间未发现明显规律。研究结果显示, 各模式下成虾肠道细菌耐药性污染程度均小于虾苗, 提示, 科学、合理的养殖方法可能会降低凡纳滨对虾肠道可培养细菌的耐药性。

### 参 考 文 献

BACH H J, TOMANOVA J, SCHLOTTER M, *et al.* Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic

- activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(3): 235–245
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020. Beijing: China Agriculture Press, 2020, 21–27 [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. 2020 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020, 21–27]
- CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202
- CHUMPOL S, KANTACHOTE D, RATTANACHUAY P, *et al.* *In vitro* and *in vivo* selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. *Aquaculture Research*, 2017, 48(6): 3182–3197
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017, 20–36
- D’COSTA V M, MCGRANN K M, HUGHES D W, *et al.* Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, NY)*, 2006, 311(5759): 374–377
- FRIDMAN O, GOLDBERG A, RONIN I, *et al.* Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, 2014, 513(7518): 418–421
- FRIMODT-MØLLER J, LØBNER-OLESEN A. Efflux-pump upregulation: From tolerance to high-level antibiotic resistance? *Trends in Microbiology*, 2019, 27(4): 291–293
- FROST L S, LEPLAE R, SUMMERS A O, *et al.* Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 722–732
- GAO P, MAO D, LUO Y, *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, 2012, 46(7): 2355–2364
- HE L Y, LIU Y S, SU H C, *et al.* Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: Identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(22): 13120–13129
- HE X L, XU Y B, CHEN J L, *et al.* Evolution of corresponding resistance genes in the water of fish tanks with multiple stresses of antibiotics and heavy metals. *Water Research*, 2017, 124: 39–48
- HONG B, NIU B, CHEN P, *et al.* Diversity of gut microbiota and antibiotic resistance genes in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1347–1358 [洪斌, 牛犇, 陈萍, 等. 凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物及抗生素抗性基因多样性分析. *水产学报*, 2019, 43(5): 1347–1358]
- LAMBERT P A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(S1): 46S–54S
- LEE C, CHEN I, YANG Y, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- LI Y, QU L Y, ZHU P F, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistance bacteria and related resistance genes in mariculture area of Shandong. *Marine Environmental Science*, 2016, 35(1): 55–62 [李壹, 曲凌云, 朱鹏飞, 等. 山东地区海水养殖区常见抗生素耐药菌及耐药基因分布特征. *海洋环境科学*, 2016, 35(1): 55–62]
- LI Z X, DONG X, WU M M, *et al.* Quinolone residues in seawater of aquaculture area, Sanggou Bay, Yellow Sea, China. *Marine Environmental Science*, 2018, 37(2): 182–186, 192 [李兆新, 董晓, 吴蒙蒙, 等. 黄海桑沟湾养殖区海水中喹诺酮类抗生素的残留状况. *海洋环境科学*, 2018, 37(2): 182–186, 192]
- LIAN L L. Distribution of antibiotics in surface and core sediments from aquaculture areas. Master’s Thesis of Dalian University of Technology, 2016, 28–61 [连璐璐. 抗生素在滨海养殖区表层及柱状沉积物中的分布特征. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2016, 28–61]
- LIU W L, XU H, TANG Y, *et al.* The effect of diet with *Bacillus cereus* biofilm on the growth rate, disease resistance and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 87–95 [刘文亮, 许华, 唐杨等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 87–95]
- MAZEL D. Integrins: Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(8): 608–620
- MCDONNELL G, RUSSELL A D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(1): 147–179
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Guidance on aquaculture drug application, No.1, No.2, 2020. 2020, 3–4 [农业农村部. 水产养殖用药明白纸 2020 年 1,2 号. 2020, 3–4]
- NIU L, BA Y B, BAI F J, *et al.* Comparison of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(12): 9–16 [牛丽, 巴永兵, 白凤佳, 等. 不同来源副溶血性弧菌耐药情况比较. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(12): 9–16]
- ÖSTERBLAD M, NORRDAHL K, KORPIMÄKI E, *et al.* How wild are wild mammals? *Nature*, 2001, 409: 37–38
- PEI R, KIM S C, CARLSON K H, *et al.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and

- corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 2006, 40(12): 2427–2435
- SHANG H, WANG Y S, SHEN Z Y. National guide for clinical laboratory procedures. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015, 21–33 [尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 21–33]
- SU H C, LIU S, HU X J, *et al.* Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms. *Science of the Total Environment*, 2017, 607–608: 357–366
- SUN S, KORHEINA D K A, FU H, *et al.* Chronic exposure to dietary antibiotics affects intestinal health and antibiotic resistance gene abundance in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), and provokes human health risk. *Science of the Total Environment*, 2020, 720: 137478
- WANG H P, YAN H, ZHAO J R, *et al.* Quantitative detection of six classes of antibiotic resistance and class I integrin genes in aquatic products. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(5): 270–276 [王慧平, 闫鹤, 赵俊仁, 等. 水产品中 6 类抗生素抗性基因和 I 类整合子的定量检测. *现代食品科技*, 2017, 33(5): 270–276]
- WANG Z F, LEI Y, XIAO J, *et al.* Residue status of antibiotics in aquaculture ponds of main tilapia aquaculture areas in Guangxi. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(4): 891–897 [王志芳, 雷燕, 肖俊, 等. 广西罗非鱼主产区养殖池塘抗生素残留状况分析. *南方农业学报*, 2019, 50(4): 891–897]
- WU D X. Studies of effects on *Litopenaeus vannamei* bacterial ecology caused by probiotics application and mechanism of interactin between microalgae and probiotics. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2016, 40–72 [吴定心. 微生物制剂对南美白对虾养殖体系微生物生态的影响及其与藻类关系的研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2016, 40–72]
- YAN Q Q, LI B, LIAO M J, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and antimicrobial resistant genes in the intestine of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) seedlings in Shandong Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 134–143 [闫倩倩, 李彬, 廖梅杰, 等. 山东主要刺参养殖区幼参肠道抗生素耐药菌及耐药基因分布特征. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 134–143]
- ZHANG Q Y, ZHAO W W, WU W. Antibiotics resistance gene pollution and its research progress achieved in aquaculture environment. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(6): 125–134 [张骞月, 赵婉婉, 吴伟. 水产养殖环境中抗生素抗性基因污染及其研究进展. *中国农业科技导报*, 2015, 17(6): 125–134]
- ZHANG S J, ZHAO X J, SONG X L, *et al.* Analysis of the culturable bacteria's quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(2): 211–218 [张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(2): 211–218]
- ZHANG Z, YANG Z Y, WANG Y G, *et al.* Effectiveness of garden burnet, *Sanguisorba officinalis* L., in controlling acute hepatopancreatic necrosis disease caused by infection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp farming. *Aquaculture*, 2021, 531: 735875
- ZHAO S, LI J, MA L C, *et al.* Analysis of phenotype and genotype in quinolone resistance in *Vibrio* from mariculture. *Marine Fisheries*, 2019, 41(4): 463–471 [赵姝, 李健, 马立才, 等. 海水养殖动物源弧菌喹诺酮类药物耐药表型与基因型分析. *海洋渔业*, 2019, 41(4): 463–471]
- ZHU L D, CHEN K, XI B W, *et al.* *In vitro* antibacterial effect of fraxetin on pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 984–992 [朱璐丹, 陈凯, 习丙文, 等. 秦皮素的抑菌作用及其对嗜水气单胞菌毒力的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(5): 984–992]

(编辑 马瑾艳)

## Study on Bacterial Resistance in *Litopenaeus vannamei* Intestinal Culturable Bacteria at Different Growth Stages

YANG Zeyu<sup>1,2</sup>, WAN Xihe<sup>1</sup>①, SHI Wenjun<sup>1</sup>, WANG Libao<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>,  
SHEN Hui<sup>1</sup>, QIAO Yi<sup>1</sup>, JIANG Ge<sup>1</sup>, CHENG Jie<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu 226007, China;  
2. Aquatic Product Technology Extension Station of Gaoyou, Gaoyou, Jiangsu 225600, China)

**Abstract** *Litopenaeus vannamei* culturing industry is an important part of the rural economy in coastal areas. With the development of the shrimp farming industry, diseases breakout frequently. Antibiotic overuse can lead to bacterial antibiotic resistance and antibiotic resistance genes (ARGs). These then threatens human health and safety. Therefore, the evaluation of bacterial antibiotic resistance phenotypes and antibiotic ARG abundance can help to understand antibiotic pollution in specific areas. According to our preliminary investigation, more probiotics were used during *L. vannamei* culturing in Jiangsu Province. In order to avoid damaging the microbial community structure in ponds, less antibiotics were used during shrimp farming. To understand the relationship between bacterial resistance in *L. vannamei* intestinal culturable bacteria and different growth stages, four main culture models of *L. vannamei* in Jiangsu Province were selected as research objects. This study investigated the bacterial resistance to 12 antibiotics (tetracycline, doxycycline, florfenicol, chloramphenicol, sulfamethoxazole, cotrimoxazole, neomycin, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, ceftriaxone, and cefotaxime) and the abundance of nine ARGs (*tetA*, *tetG*, *qnrA*, *qnrS*, *cmlE3*, *floR*, *aadA*, *sul1*, and *sul2*) of the intestinal culturable bacteria in samples using the K-B disc diffusion method and qRT-PCR technology. The results showed that *Vibrio* was the dominant bacterial genus among the shrimp intestinal culturable bacteria in different aquaculture models. The species and quantity of culturable bacteria in adult shrimp intestines increased significantly compared to those in post-larvae intestines ( $P < 0.05$ ). The proportion of antibiotic resistant bacteria decreased. The abundance of ARGs declined significantly ( $P < 0.05$ ). No obvious regularity was observed among the different aquaculture models. The antimicrobial resistance and abundance of ARGs in the intestinal bacteria of adult shrimp were lower than those in juvenile shrimp under different aquaculture patterns, indicating that reducing the use of antibiotics by administering probiotics may reduce the resistance of culturable bacteria in the intestinal tract of *L. vannamei*. In future research, the differences in the bacterial antibiotic resistance and ARG abundance in the intestinal tract of *L. vannamei* under different aquaculture models can be further explored by combining the methods of metagenomics.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Bacterial antibiotic resistance; Antibiotic resistance genes (ARGs); qRT-PCR

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210129001

http://www.yykxjz.cn/

张春霞, 李健, 李吉涛, 王佳佳, 李文洋, 李明栋. 脊尾白虾 *EcERR* 基因的克隆与表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 185-193

ZHANG C X, LI J, LI J T, WANG J J, LI W Y, LI M D. Cloning and expression analysis of *EcERR* in *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 185-193

## 脊尾白虾 *EcERR* 基因的克隆与表达分析\*

张春霞<sup>1,2</sup> 李健<sup>2①</sup> 李吉涛<sup>2</sup> 王佳佳<sup>2</sup> 李文洋<sup>2</sup> 李明栋<sup>1,2</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306;

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

**摘要** 雌激素相关受体(estrogen-related receptor, *ERR*)是一种真核转录因子,与雌激素的效应有密切关系,参与生物体的能量代谢、细胞增殖分化和性腺发育等生理过程。为了解 *ERR* 基因在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)卵巢发育中的作用,采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆获得脊尾白虾 *EcERR* 基因的 cDNA 序列,该基因全长为 2025 bp,包括 5'非编码区 241 bp, 3'非编码区 410 bp, 开放阅读框 1374 bp, 编码 457 个氨基酸。组织表达分析结果显示, *EcERR* 在脊尾白虾各组织中均有表达,卵巢组织的表达量最高( $P<0.05$ ); *EcERR* 在卵裂期的表达量显著高于胚胎及幼体发育时期( $P<0.05$ ); *EcERR* 在卵巢发育过程中呈先降低后升高的趋势,卵巢发育 I 期的表达量最高; 5-羟色胺浸泡后,实验组 *EcERR* 的表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ),同时,实验组卵巢发育关键基因卵黄蛋白原基因的表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。研究表明, *EcERR* 基因参与了脊尾白虾卵巢发育的调控,在脊尾白虾卵巢发育的早期发挥关键作用。

**关键词** 脊尾白虾; 雌激素相关受体; 卵巢发育; 5-羟色胺; 基因表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0185-09

雌二醇是甲壳动物体内重要的类固醇激素,在甲壳动物生殖过程中发挥重要的作用。甲壳动物体内雌二醇的含量会影响其蜕壳、卵母细胞生长及卵黄的发生(陆剑锋等, 2010)。在脊椎动物中,雌二醇主要通过雌激素受体(estrogen receptor, *ER*)结合来直接或间接调控卵巢发育(Lü *et al*, 2016),然而,在甲壳动物中尚未发现 *ER* 基因的存在。雌激素相关受体(estrogen-related receptor, *ERR*)与 *ER* 具有高同源性,尤其在 DNA 结合域,并且与雌激素效应密切相关

(Giguère *et al*, 2002)。脊椎动物中 *ERR* 基因与其性腺分化和发育有关(张照斌等, 2008)。对于甲壳动物,已经在多个物种中发现 *ERR* 的存在。三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(陆洋等, 2016)的 *ERR* 基因与其蜕皮、卵原生殖细胞的增殖有关;在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中, *ERR* 基因通过调控卵母细胞的减数分裂、生殖相关激素的合成与释放以及卵黄的生成,进而影响罗氏沼虾卵巢的发育(刘金磊等, 2018),推测甲壳动物的雌激素可能通过与 *ERR*

\* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900403)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系专项资金、国家自然科学基金(32072974)和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46)共同资助 [This work was supported by the Earmarked Fund for the National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900403), China Agriculture Research System of MOF and MARA, National Natural Science Foundation of China (32072974), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 张春霞, E-mail: zhangchunxiacx@163.com

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

收稿日期: 2021-01-29, 收修改稿日期: 2021-02-22



基因结合来调控卵巢发育(柳梅梅等, 2015)。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine)是甲壳动物体内重要的活性物质, 广泛分布于甲壳动物的神经系统和外周器官, 参与甲壳动物色素迁移、生殖活动、蜕皮活动、骨骼肌收缩等多项生理过程(Richardson *et al.*, 1991)。5-羟色胺能刺激脑、胸神经节分泌性腺刺激激素, 从而促进性腺的发育。一定浓度 5-羟色胺的刺激, 能促进虾、蟹卵巢指数和卵母细胞直径的增加(Kulkarni *et al.*, 1992), 通过 5-羟色胺的注射或浸泡能够加快甲壳动物的卵巢发育(蔡生力等, 2000)。

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)。脊尾白虾因卵巢可连续多次发育并抱卵繁殖而为人们所关注, 是研究十足目(Decapoda)真虾繁殖机制的潜在模式生物(马骊等, 2018)。然而, 通过人工控制技术仍未解决脊尾白虾无法全年繁殖的难题。本研究基于前期转录组研究筛选到可能调控脊尾白虾卵巢发育的基因, 利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆获得脊尾白虾 *ERR* 基因全长序列, 分析其在不同组织、卵巢发育不同阶段的表达情况, 探究其响应外源 5-羟色胺的表达模式, 以期阐明 *ERR* 基因在卵巢发育过程中的作用, 为深入了解脊尾白虾等甲壳动物卵巢发育问题奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

脊尾白虾取自山东日照海辰水产有限公司, 均为活力好、生长健康的个体, 将实验用虾暂养于 200 L 的 PVC 桶中, 暂养 7 d。24 h 持续充氧, 每天换水清污 1 次, 换水量为 1/3, 每天早晚 2 次饲喂蛤蜊肉。取 10 尾健康的脊尾白虾各组织, 包括肌肉、眼柄、触角腺、甲壳(不带表皮)、胃、心脏、肠道、卵巢、鳃和肝胰脏于液氮中研磨, 用于 RNA 的提取。

### 1.2 5-羟色胺对脊尾白虾卵巢发育的影响

随机选取暂养 7 d 的脊尾白虾雌虾进行实验。根据预实验结果, 设置对照组和实验组, 实验组 5-羟色胺浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 此剂量间隔 3 d 浸泡 1 次, 即第 1、5 和 9 天分 3 次浸泡对亲虾进行促熟实验, 每组 30 尾脊尾白虾, 设置 3 个平行。实验期间的管理与暂养相同。实验结束后, 取卵巢组织, 每组取 6 尾, 置于液氮中保存, 用于 RNA 的提取。采用 qRT-PCR

方法检测浸泡后脊尾白虾卵巢中 *EcERR* 基因和卵黄蛋白原基因的含量。

### 1.3 *EcERR* 基因的 cDNA 全长克隆

使用 Trizol 法提取脊尾白虾卵巢总 RNA, 选择质量及完整性较好的卵巢组织的总 RNA, 使用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit 分别合成 3' 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。从脊尾白虾转录组文库中获得 *ERR* 基因部分 EST 序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计中间片段引物验证其准确性后, 设计 3' 和 5'RACE 特异性引物(表 1)。3' 和 5'RACE 引物分别与 UPM 引物配对进行 cDNA 的 3' 和 5' 末端扩增。利用 Omega 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒对目的片段进行切胶回收, 将目的片段与 Peasy-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司)连接, 然后转入到感受态细胞 Trans1-T1 中, 过夜培养后, 通过蓝白斑筛选挑出阳性单克隆, 经 PCR 检测合格后送测序。

### 1.4 反转录及 qRT-PCR 检测

根据王绪峨(1989)对脊尾白虾早期胚胎发育的特征描述, 对脊尾白虾早期胚胎发育各时期(卵裂期、囊胚期、原肠期、无节幼体期、前溞状幼体期、后溞状幼体期和溞状幼体)进行取样。使用 Trizol 法提取脊尾白虾各组织(肌肉、眼柄、触角腺、甲壳、胃、心脏、肠道、卵巢、鳃和肝胰腺)、胚胎和幼体发育的不同时期及不同卵巢发育时期的卵巢组织的总 RNA, 用紫外分光光度计与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量及完整性。

cDNA 的合成: 基因组 DNA 去除, 在 RNase-free 的离心管中配制如下混合液: 2  $\mu\text{L}$  RNA, 10  $\mu\text{L}$  RNase free ddH<sub>2</sub>O, 4  $\mu\text{L}$  4 $\times$ gDNA wiper mix, 瞬时离心数秒, 使溶液聚集于管底, 用移液器轻轻吹打混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$  2 min; 配制逆转录反应体系, 在上一步反应液中直接加入 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ HiScript II qRT SuperMix II, 50 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$  5 s。合成的 cDNA 用于后期脊尾白虾 *ERR* 基因的克隆及 qRT-PCR 检测。

Duan 等(2013)研究发现, 脊尾白虾 18S rRNA (18S) 作为内参基因具有稳定性, 本研究以 18S rRNA 作为内参基因。根据脊尾白虾内参基因 18S rRNA (NCBI 登录号: GQ369794)、*ERR* 基因、卵黄蛋白原基因 (NCBI 登录号: JQ319034) 的 ORF 序列, 合成 qRT-PCR 引物(表 1)。按照 ChamQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Color qPCR master mix 说明书, 利用 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪器进行荧光定量分析。10  $\mu\text{L}$  反应体系: 5.0  $\mu\text{L}$  SYBR Color qPCR master mix (2 $\times$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  Rox reference dye

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

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
ERR-F	GGACTACAGTGAATGCGGAG	中间片段
ERR-R	GCCTGGTTATCTTGAGTCG	
ERR-3	TTCTGATGTGCGACTCCAAGATAACCA	RACE
ERR-5	CGTAGTGGAAGCCAGAGGCAATATCAC	
UPM (Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCTAATAC GACTCACTATAGGGC	qRT-PCR
UPM (Short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
qERR-F	CCGAGCTGGACTACAGTGAATGC	
qERR-R	ATCACCGCACACGAGACACAAC	
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	
qVg-F	TGCCATCTAACTCACCAAGG	
qVg-R	CAAATCGTGCTCCAATCTCTC	

II (50×), 正、反向引物各 0.4 μL (10 μmol/L), 3.0 μL 去离子水, 1.0 μL cDNA。反应程序: 95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。每个实验组设置 3 次重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法(Livak *et al*, 2001)计算目的基因的相对表达量, 利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 运用 Duncan 多重比较进行显著性检验。

### 1.5 生物信息学分析

利用 SeqMan 进行序列拼接与组装, 得到 *ERR* 基因的 cDNA 全长。NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)确定其开放阅读框并预测氨基酸序列, 利用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对。利用 SignalP 4.0 软件分析信号肽, 利用 MEGA 6.0 软件(Tamura *et al*, 2011)中的 neighbor-joining 法(Saitou *et al*, 1987)构建系统树。

## 2 结果与分析

### 2.1 *EcERR* cDNA 全长的克隆及氨基酸序列分析

采用 RACE 法克隆得到脊尾白虾 *ERR* cDNA 全长, 命名为 *EcERR*, GenBank 登录号为 MN265353。*EcERR* cDNA 全长为 2025 bp, 其中, 5'端非编码区 241 bp, 3'端非编码区 410 bp, 开放阅读框 1374 bp, 编码 457 个氨基酸, 预测分子量大小为 50.83 kDa, 理论等电点为 7.84, N 端具有特殊的信号肽序列(1~29 aa)(图 1)。SMART 软件分析预测, *EcERR* 含有 2 个保守功能结构域、1 个核受体 C4 锌指结构(ZnF\_C4)(124~195 aa)、1 个配体结合结构域(HOLI

结构域)(267~426 aa)及 1 个低复杂性区域(11~23 aa)(图 2)。

预测 *EcERR* 氨基酸亲水性的平均值为-0.331, 说明该蛋白具有较强的亲水性, 但在 2 个保守的功能结构域存在多个疏水区, 其中, 368 位点的疏水性最强, 为 2.656, 207 位点的亲水性最强, 为-3.056。在配体结合区, 可以明显看到 9 个疏水区域(图 3)。

### 2.2 *EcERR* 同源性分析及系统进化树结构

使用 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对脊尾白虾 *EcERR* 基因编码的氨基酸序列与其他物种 *ERR* 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较。结果发现, 其与罗氏沼虾同源性最高达到 98.47%, 与拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、三疣梭子蟹和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)同源性分别为 80.84%、78.82%和 79.43%。利用 MEGA 6.0 软件对脊尾白虾 *EcERR* 氨基酸序列进行系统进化分析, 并构建系统进化树(图 4), 结果显示, *EcERR* 氨基酸与同为长臂虾科(Palaemonidae)的罗氏沼虾的亲缘关系最近, 其与甲壳动物聚为一支, 然后与昆虫类聚为一大支; 哺乳动物、鸟类、鱼类等脊椎动物存在 *ERRα*、*ERRβ* 和 *ERRγ* 3 种 *EER* 亚型, 且 *ERRβ* 和 *ERRγ* 亚型的进化关系更近。

### 2.3 *EcERR* 的组织表达特征

利用 qRT-PCR 方法分析脊尾白虾 *EcERR* 基因在各个组织中的表达情况(图 5)。结果显示, *EcERR* 在眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、卵巢、鳃、触角腺、甲壳、胃和肠中均有表达, 其中, 在卵巢中相对表达量最高, 胃和心脏次之, 在肌肉和肝胰腺的表达量最低。

```

1  acatgggggacgttcgagtgacgaaagcgcgtaactatgtctctctctgttttcagtgaaattttacgataaaacaatcaattatagtaacgcttc 100
101 aagtgggtatacaattaattaagcagtgaaactcgtgaatattttgtctcccaactgtgaatatacaaaaggagaatttactgaagatggcgaaacctcc 200
201 aagtgtaacatctttttgaaagaatctgtggaagcgtt ATG TTG ATA ATC AAG GTG TGC ATG ATG AGT GGA GGA GGG TCT 283
      M L I I K U C M H S G G G S
284 GGA GGT GAA GGG GGC CCT GGG GTA GGC CAC ATC AAA CAA GAG GAT GGG GTT TAC CCG ACA TCA ATA CCA ACA AAC 358
      G G E G G P G U G H I K Q E D G U V Y P T S I P T N
359 CAC TCA AGG GTC CGA CAG CCT TCC TGT TCG TCA CCA AAC ACC ACA GCT CTG TAT TCA CCA TCG ACG ACG GCC ATA 433
      H S R U R Q P S C S S P N T T A L Y S P S T T A I
434 CCT TCC GAG CTG GAC TAC AGT GAA TGC GGA GAT GAA GCC CAG CCG TCT CCA AAA CAC ATG AAG CTT TTT ACA GAT 508
      P S E L D Y S E C G D E A Q P S P K H H K L F T D
509 TCT CCC CCA AGT CCC AAT CGT CAG TTC TGC TCT TCA ACG ACG TCC ATG GCC AGT GAT TCG GTG AAT ACA CCA TCT 583
      S P P S P N R Q F C S S T T S H A S D S U N T P S
584 GAA AGT TTA CGT GAT GAC GAT GCC CCG AAG AAG TTG TGT CTC GTG TGC GGT GAT ATT GCC TCT GGC TTC CAC TAC 658
      E S L R D D D A P K R L C L U C G D I A S G F H V
659 GGC GTT GCA TCT TGC GAG GCC TGT AAA GCC TTC TTC AAG AGA ACT ATC CAG GGA AAC ATC GAA TAT ACT TGT CCA 733
      G U A S C E A C K A F F K R T I Q G N I E Y T C P
734 GCT GCC AAC GAT TGT GAA ATT AAC AAG AGA AGA AGA AAA GCG TGC CAG GCA TGT CGA TTC CAC AAG TGT CTT CGC 808
      A A N D C E I N K R R R K A C Q A C R F H K C L R
809 GTT GGC ATG TTG AAA GAA GGA GTC AAG CTA CAC AGA GTC AGA GGA GGA CCG CAG AAG TAT AGA CCG ACG TCT GAT 883
      U G M L K E G U R L D R U R G G R Q K Y R R T S D
884 TCC CCC TTT TCT ATG CAC CAG ATG CCA GTT AAA AAA GCT TCC TTG GAA GAT ATA AAG TTA TTA GCA TCA CTG CCA 958
      S P F S M H Q M P U K K A S L E D I K L L A S L R
959 GCT TGC GAA CCG GAG TCA TTG TTA GCA ATG CCA GAT CCT ACT GTA TCA GAT ACT GAT TAT TTG ACC ATA TCA ACA 1033
      A C E P E S L L A M P D P T U S D T D Y L T I S T
1034 TTG GCA GAC CTT TAC GAC CCG GAG CTG GTC TCC ACC ATT GGT TGG GCC AAA CAA ATT CCA GGG TTT ACA GAA TTA 1108
      L A D L Y D R E L U S T I G W A K Q I P G F T E L
1109 GCA TTG AAT GAC CAA ATG AGA CTA CTT CAA AGC ACA TGG GGT GAG ATT TTA ACT TTG GGA CTT GCC TCG GCG TCC 1183
      A L N D Q M R L L Q S T W G E I L T L G L A Y R S
1184 ATG CCG GCT CAT GCC CAC ACT CTC CAC TTT GCG CAT GAT TTC ACG ATA GAT GAA AAG CAA AGG GAA GAG TGT AAT 1258
      M P A H A H T L H F A H D F T I D E K Q A R E C N
1259 GCC ACT GAG CTT TTT ACA CAG GTT CTT CGT GTT GTC GAA CGA CTT GAA CAG TGC AGT ATA AAT AGG GAA GAA TTT 1333
      A T E L F T Q U L G U U E R L E Q C S I N R E E F
1334 TTG CTT CTT AAA CCA CTT GTT TTA ACT AAT TCT GAT GTG CGA CTC CAA GAT AAC CAG GCT CTT CAG CCG CTT GCA 1408
      L L L K A L U L T N S D U R L Q D H Q A L Q R L R
1409 CAA AAC ATC CTT CAA GCA CTA CAT CAC ACT GTG GCA ACT CAA AGA TTA CGG GAT GGC GTT GTT CAA ATG CAG TCC 1483
      Q N I L Q A L H D T U A T Q R L R D G U U Q M Q S
1484 CTC TTA TTA TGC CTA CCT TCT TTA AGA GCA GCA GAT GCT GCC CTA AGA CCG TAC TGG CTT TCT GTA AAG CAG CAA 1558
      L L L C L P S L R A A D A A L R R Y W L S U R H Q
1559 GGA CCA GTG CCA ATG AAC AAA TTA TTT GTG GAA ATG CTT GAA TCA CAC ATG CCG TGA atagaaactctgttttaagtgactt 1639
      G A U P M N K L F U E M L E S H H R
1640 ttgaaaacttagtgacgttaaaagctgtagggtgtgatgcaaaagtttaagggataaccacaactgaaccaagctcatgaattaaagaaatgctctgataac 1739
1740 taatcattcatgagatagaaaaattatattaccacatcattgtgcttttcgagttctccgcaaaagcaagtggttttcacgacttgagtggtttccct 1839
1840 agacactcaatattttaaagacttttggcgaatttttagagaaaattactttgtccagaagaaaactgaggaagaactcttccaactagagtgaaa 1939
1940 gctctgtgtgtgcacattctcaggtcatgttggcaattgtgttcaaccaaaagaaaaaagaaaaaagaaaaaagaaaaaagaaaaaagaaaaaag 2025

```

图 1 脊尾白虾 *EcERR* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列  
 Fig.1 Nucleotide and coding amino acid sequence of *EcERR*

黑色框标记起始密码子和终止密码子；实线表示信号肽；双下划线表示多腺苷酸信号 AATTAAA  
 The black box marks the start codon and the stop codon; The solid line represents the signal peptide.  
 Double underline represents the polyadenylation signal AATTAAA

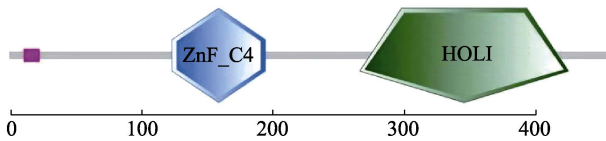


图 2 *EcERR* 结构域预测  
 Fig.2 *EcERR* domain prediction

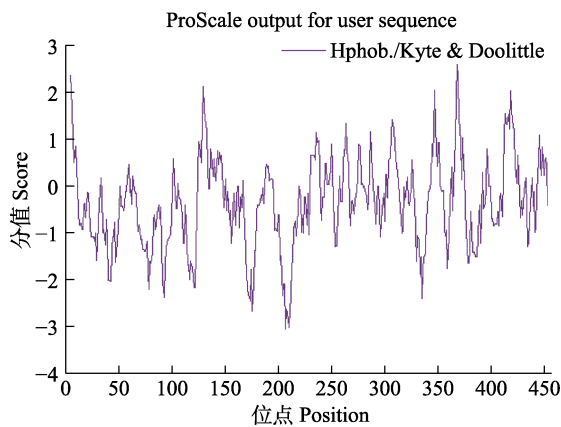


图 3 *EcERR* 氨基酸序列疏水性结果预测  
 Fig.3 Predicted hydrophobicity of *EcERR*

### 2.4 *EcERR* 基因在胚胎发育过程中的表达特征

脊尾白虾 *EcERR* 基因在胚胎发育过程中的表达特征如图 6 所示，卵裂期 *EcERR* 基因的表达量显著高于其他发育时期 ( $P < 0.05$ )，随胚胎发育和细胞分裂，其整体呈先下降再升高再下降的趋势。无节幼体期与前溞状幼体期无显著性差异，*EcERR* 基因在前溞状幼体期、无节幼体期的表达量显著高于囊胚期、原肠期、后溞状幼体期和溞状幼体第 1 天 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 *EcERR* 基因在卵巢发育时期的表达

利用 qRT-PCR 分析 *ERR* 在脊尾白虾不同卵巢发育时期的表达水平如图 7 所示，在卵巢发育过程中，*EcERR* 基因呈先下降再上升的趋势。*EcERR* 基因在卵巢发育 I 期表达量最高 ( $P < 0.05$ )，随后表达量显著下降，到卵巢发育 III 期表达量最低；卵巢发育 II、III 和 IV 期之间，*EcERR* 表达量无显著差异；卵巢发育 IV 期 *EcERR* 表达量显著低于卵巢发育 V 期 ( $P < 0.05$ )；卵巢发育 I 期和 V 期 *EcERR* 的表达量相比无显著差异。

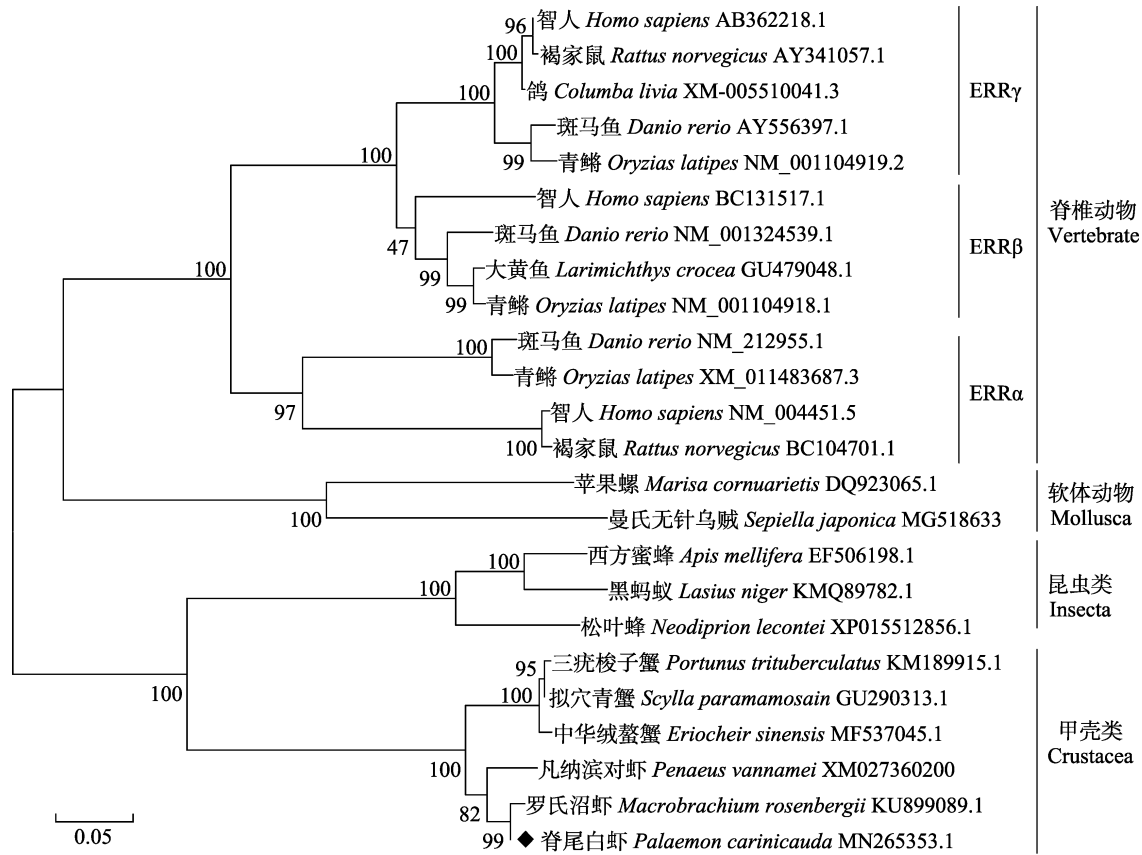


图 4 *EcERR* 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on *EcERR* amino acid sequences by neighbor-joining method

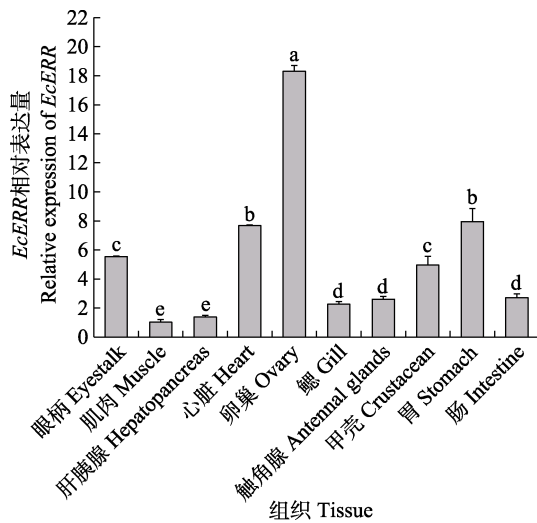


图 5 脊尾白虾 *EcERR* 在各组织中的表达

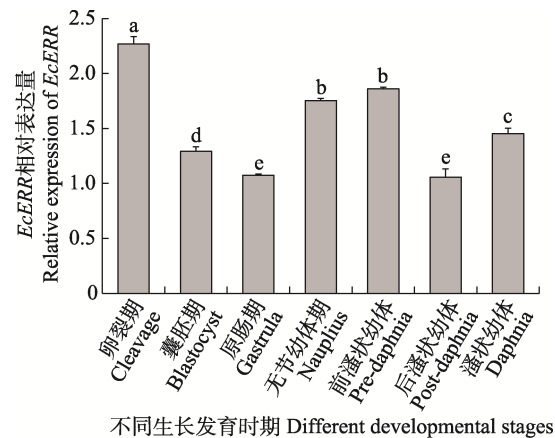
Fig.5 Relative expression levels of *EcERR* mRNA in tissue of *E. carinicauda*

不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
Different letters mean significant difference ( $P < 0.01$ ).  
The same as below

### 2.6 5-羟色胺对*EcERR*和卵黄蛋白原基因表达的影响

脊尾白虾经 5-羟色胺浸泡后,脊尾白虾卵巢发育

I 期的卵巢组织中卵黄蛋白原基因(vitellogenin, *Vg*) 的表达情况如图 8 所示。经 5-羟色胺浸泡后的实验组卵黄蛋白原基因的表达量极显著高于对照组(未浸泡 5-羟色胺组)( $P < 0.01$ ), 是对照组的 15.15 倍; 实验组脊尾白虾卵巢中 *EcERR* 基因的表达量极显著的高于对照组( $P < 0.01$ ), 是对照组的 4.48 倍。



不同生长发育时期 Different developmental stages

图 6 *EcERR* 在不同胚胎发育时期的表达

Fig.6 Relative expression levels of *EcERR* at different embryonic development stages

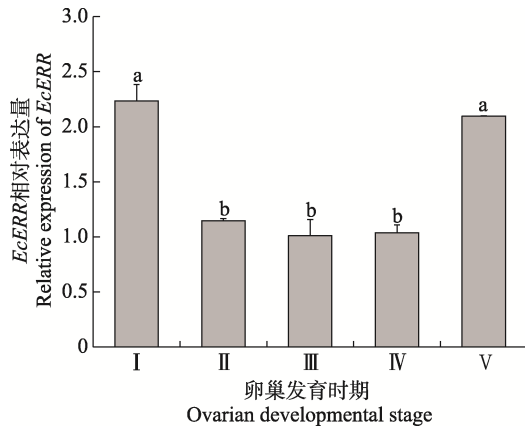


图7 *EcERR* 基因在卵巢发育各时期的表达  
Fig.7 Relative expression levels of *EcERR* in various stages of ovarian development

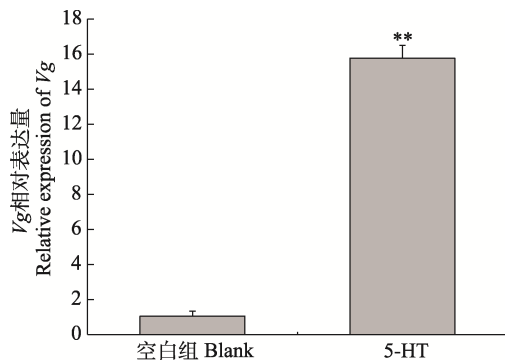


图8 卵黄蛋白原基因在脊尾白虾卵巢中的表达  
Fig.8 Relative expression levels of *Vg* mRNA in ovary of *E. carinicauda*

\*\* 代表差异极显著( $P < 0.01$ )。下同  
\*\* means highly significant difference ( $P < 0.01$ ).  
The same as below

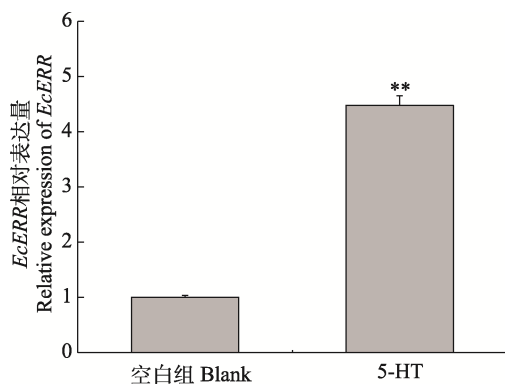


图9 *EcERR* 基因在卵巢中的表达  
Fig.9 Relative expression levels of *EcERR* in ovary

### 3 讨论

#### 3.1 *EcERR* 基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

本研究克隆脊尾白虾 *EcERR* 基因, 其编码的蛋

白序列与其他甲壳动物 *ERR* 大小及结构基本一致, N 端具有 29 个氨基酸组成的信号肽序列。脊尾白虾 *ERR* 基因与多数核受体基因结构一样, 包含 1 个 DNA 结合域(ZnF\_C4 锌指结构域)、1 个配体结合结构域及 1 个低组分复杂区域, 2 个结构域的生理功能主要是通过调控基因表达来实现。*ERR* 基因与 *ER* 具有很强的同源性, 但作用方式不同。*ERR* 基因属于孤儿核受体家族成员, 缺乏天然的内源性配体, 只能以非配体依赖型方式发挥作用, 即其必须与相关辅调节因子结合, 形成 *ERR*-辅调节因子复合物, 识别目标调控基因上的 ERE 或 ERRE 位点, 激活启动下游靶基因表达, 参与 *ER* 信号通路的调控(Long *et al*, 2020; 陈健等, 2001)。

#### 3.2 *EcERR* 在脊尾白虾卵巢发育中的功能研究

*EcERR* 具有组织表达特异性, Real-time PCR 的结果表明, 其在卵巢中的表达量显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ), 为鳃、肌肉等组织的 8~18 倍(图 5)。研究表明, *ERR* 基因在多种物种的性腺中高表达, 哺乳动物中, *ERR* 基因在老鼠(*Mus musculus*)生殖系统中大量表达, 其表达从生殖细胞开始一直维持到性别分化(Park *et al*, 2017); 在鱼类中, *ERR* 在青鳉和底鳉(*Fundulus heteroclitus*)的脑和性腺组织中表达量最高(Cheung *et al*, 2013; Tarrant *et al*, 2006); 在软体动物中, *ERR* 在贻贝(*Mytilus edulis*)(Nagasawa *et al*, 2015)的生殖腺中大量表达; 在甲壳动物中, *ERR* 在罗氏沼虾的卵巢中表达量最高(赵苗鑫等, 2017)。*ERR* 基因在不同物种性腺组织的高表达, 均说明 *ERR* 可能在动物的生殖发育和性成熟中发挥着重要的调控作用。

*ERR* 基因在无脊椎动物的卵巢和胚胎发育过程中发挥重要作用。研究发现, 敲除家蚕(*Bombyx mori*)受精卵的 *ERR* 基因后, 其胚胎发育时间会延迟, 发现其作为转录因子调控糖酵解途径中的 3 大限速酶基因(丙酮酸激酶、己糖激酶和磷酸果糖激酶), 推测其可能通过调控糖酵解途径来影响家蚕的胚胎发育(龙威, 2019)。本研究发现, *EcERR* 基因在受精卵期的表达显著高于其他胚胎发育时期( $P < 0.05$ ), 随着细胞分裂, 表达量呈下降趋势, 推测可能通过调节糖酵解途径, 为细胞分裂提供能量。*ERR* 基因在拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina*)卵巢的卵子发生过程中的滤泡细胞和生长期, 卵黄发生期的卵母细胞中的表达量较高(欧阳霞辉等, 2014); *ERR* 表达定位于地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、贻贝卵巢的滤泡细胞中, 可与 *ER* 基因相互作用调控卵母细胞的发育(Nagasawa *et al*, 2015); Liu 等(2019)研究发现, *ERR*



基因在罗氏沼虾卵巢发育早期的表达量较高, 在 II 和 III 期的表达量降低, 推测其可能对罗氏沼虾卵巢发育早期进行调控。根据王绪峨(1987)的研究, 将脊尾白虾卵巢发育大致分为 5 期, 本研究根据卵巢大小和颜色收集了脊尾白虾不同发育时期的卵巢样本, 发现 *EcERR* 在卵巢发育早期表达量较高, 随着卵巢的逐渐成熟, *EcERR* 随之降低, 在卵巢发育 III 期表达量最低, 随后逐渐回升, 说明 *EcERR* 参与了脊尾白虾卵巢发育, 推测其在卵巢发育早期发挥关键的调控作用。

5-羟色胺作为生物胺, 广泛分布于甲壳动物体内。研究发现, 5-羟色胺具有促进卵巢发育的效应, 其通过调控神经器官中性腺刺激激素的释放, 从而影响卵巢发育, 在大西洋招潮蟹(*Uca arcuata*)中注射 5-羟色胺激动剂, 其卵巢指数和卵母细胞直径显著增大(Meeratana *et al.*, 2006); 体外注射 5-羟色胺可以明显促进中国对虾(*Penaeus chinensis*)的卵巢发育(蔡生力等, 2000)。卵黄蛋白原基因是非哺乳卵生动物卵细胞发育过程中产生的重要物质成分, 为胚胎及幼体发育提供营养和功能性的物质, 是卵巢发育重要的标记基因(Wang *et al.*, 2020)。Köhler 等(2007)研究发现, 在无脊椎动物中, 雌激素必须与 *ERR* 基因的雌激素反应元件结合, 才能启动卵黄蛋白原等基因的转录调控。本研究通过 5-羟色胺浸泡脊尾白虾后发现, 实验组脊尾白虾的卵巢开始发育, 而对照组不发育; 且实验组脊尾白虾卵巢发育 I 期的卵巢组织中卵黄蛋白原基因的表达量是空白组的 15.15 倍。实验组脊尾白虾卵巢中 *EcERR* 基因的表达量显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 是空白对照组的 4.48 倍, 说明 5-羟色胺对脊尾白虾卵巢发育有一定的促进作用, *EcERR* 参与脊尾白虾的卵巢发育的过程, 但其调控机理有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- CAI S L, YANG C H. Induced ovarian maturation of *Penaeus chinensis* by injection of four kinds of hormones. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 91–95 [蔡生力, 杨丛海. 体外注射激素对中国对虾卵巢发育的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(S1): 91–95]
- CHEN J, ZHOU D J. Progresses in estrogen receptor-related receptors. *Chemistry of Life*, 2001, 21(6): 487–489 [陈健, 周度金. 雌激素受体相关受体研究进展. 生命的化学, 2001, 21(6): 487–489]
- CHEUNG N K M, CHEUNG A C K, YE R R. Expression profile of estrogen receptors and estrogen-related receptors is organ specific and sex dependent: The Japanese medaka *Oryzias latipes* model. *Journal of Fish Biology*, 2013, 83: 295–310
- 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]
- DUAN Y, LIU P, LI J, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 5 gene in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(12): 6569–6577
- GIGUÈRE V. To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2002, 13(5): 220–225
- KÖHLER H R, KLOAS W, SCHIRLING M, *et al.* Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1): 131–143
- KULKARNI G K, NAGABHUSHANAM R, AMALDOSS G. In vivo stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* (Girard), by 5-hydroxytryptamine. *Invertebrate Reproduction and Development*, 1992, 21(3): 231–240
- 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]
- LIU J L, CHEN H P, ZHAO M X, *et al.* Molecular characterization of estrogen-related receptor (ERR) of *Macrobrachium rosenbergii* and its differential expression during ovary development stages and np exposures. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2019, 19(7): 561–570
- LIU J L, DENG S P, JIANG D N. Screening of ovarian genes associated with reproduction in *Macrobrachium rosenbergii* and their changes in expression pattern in different development stages after ERR interference. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38(3): 8–16 [刘金磊, 邓思平, 江东能, 等. ERR-dsRNA 对罗氏沼虾卵巢中 ERR 及生殖相关基因表达的影响. 广东海洋大学学报, 2018, 38(3): 8–16]
- LIU M M, WU X G, LIU Z J. Distribution and changes of two estrogen receptors in the ovaries and hepatopancreas during the ovarian development of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 822–830 [柳梅梅, 吴旭干, 刘智俊, 等. 中华绒螯蟹卵巢发育期间两种雌激素受体在卵巢和肝胰腺的分布及变化. 水生生物学报, 2015, 39(4): 822–830]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- LONG W, WU J, SHEN G, *et al.* Estrogen-related receptor

- participates in regulating glycolysis and influences embryonic development in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 2020, 29: 160–169
- LONG W. Estrogen-related receptor (*ERR*) participates in regulating glycolysis and influences embryonic development in silkworm *Bombyx mori*. Master's Thesis of Southwest University, 2019 [龙威. 家蚕雌激素相关受体(*BmERR*)参与调节糖酵解并影响家蚕胚胎发育的研究. 西南大学硕士学位论文, 2019]
- LU J F, CHANG G L, WU X G, *et al.* Hormonal regulations of ovarian development and vitellogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed on two different diets. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 505–512 [陆剑锋, 常国亮, 吴旭干, 等. 两组不同饲料对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育及卵黄发生的激素调控. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 505–512]
- LU Y, WU X G, PAN G P, *et al.* Expression analysis of *PtERR* during the molting cycle in *Portunus trituberculatus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(3): 321–328 [陆洋, 吴旭干, 潘桂平, 等. 三疣梭子蟹雌激素相关受体基因在蜕皮过程中的表达分析. 上海海洋大学学报, 2016, 25(3): 321–328]
- LÜ Z M, LIU W, LIU L Q, *et al.* Cloning, characterization, and expression profile of estrogen receptor in common Chinese cuttlefish, *Sepiella japonica*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2016, 325(3): 181–193
- MA L, GE Q Q, XU Y, *et al.* Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (TCTP) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 101–109 [马骊, 葛倩倩, 许杨, 等. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 TCTP 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 101–109]
- MEERATANA E, WITHYACHUMNAMKUL B, DAMRONGPHOL P, *et al.* Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, 2006, 260(1/2/3/4): 315–325
- NAGASAWA K, TREENC N, KONDO R, *et al.* Molecular characterization of an estrogen receptor and estrogen-related receptor and their autoregulatory capabilities in two *Mytilus* species. *Gene*, 2015, 564(2): 153–159
- OUYANG X H, HOU X L, GAO D D, *et al.* Expression of estrogen relative receptor gene in gonad of *Polyrhachis vicina*. *Journal of Northwest Minzu University (Natural Science)*, 2014, 35(1): 53–57 [欧阳霞辉, 侯兰新, 高丹丹, 等. 拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina*)性腺雌激素相关受体基因的表达. 西北民族大学学报(自然科学版), 2014, 35(1): 53–57]
- PARK E, KUMAR S, LEE B, *et al.* Estrogen receptor-related receptor  $\gamma$  regulates testicular steroidogenesis through direct and indirect regulation of steroidogenic gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 452: 15–24
- RICHARDSON H G, DEECARAMAN D, FINGERMAN M. The effect of biogenic amines on ovarian development in fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, 99(1/2): 53–56
- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- TARRANT A M, GREYTAK S R, CALLARD G V, *et al.* Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Diversity, expression, and estrogen responsiveness. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2006, 37(1): 105–120
- WANG L, GUO Q, LEVY T, *et al.* Ovarian development pattern and vitellogenesis of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*. *Cell and Tissue Research*, 2020, 382(2): 367–379
- WANG X E. A preliminary study on the reproductive biology of *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Journal of Zoology*, 1987, 22(1): 7–10 [王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步研究. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7–10]
- WANG X E. Early embryonic development on *Exopalaemon carinicauda* and relation of its incubation with temperature and salinity. *Journal of Fisheries of China*, 1989, 13(1): 59–64 [王绪峨. 脊尾白虾早期胚胎发育以及温、盐度与其孵化的关系. 水产学报, 1989, 13(1): 59–64]
- ZHANG Z B, HU J Y, SAI S X, *et al.* Gene cloning, sequence analysis and tissue expression of estrogen-related receptor  $\alpha$  (*ERR $\alpha$* ) in Japanese medaka and its transcriptional responses after differential EDCs exposure. *Environmental Science*, 2008, 29(11): 3153–3158 [张照斌, 胡建英, 赛思翔, 等. 青鳉 *ERR $\alpha$*  的克隆、序列分析、组织表达及其对不同 EDCs 暴露的响应. 环境科学, 2008, 29(11): 3153–3158]
- ZHAO M X, CHEN H P, LIU J L, *et al.* Prokaryotic expression and purification of estrogen related receptor (*ERR*) gene from *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(1): 108–112 [赵苗鑫, 陈华谱, 刘金磊, 等. 罗氏沼虾雌激素相关受体(*ERR*)基因原核表达与纯化. 广东海洋大学学报, 2017, 37(1): 108–112]

## Cloning and Expression Analysis of *EcERR* in *Exopalaemon carinicauda*

ZHANG Chunxia<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2①</sup>, LI Jitao<sup>2</sup>, WANG Jiajia<sup>2</sup>, LI Wenyang<sup>2</sup>, LI Mingdong<sup>1,2</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (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)

**Abstract** Estrogen-related receptor (*ERR*) is a eukaryotic transcription factor that is closely related to the effect of estrogen and is involved in the regulation of energy metabolism, cell proliferation and differentiation, gonadal development, and other physiological processes. To understand the role of estrogen-related receptors in the ovarian development of *Exopalaemon carinicauda*, the *EcERR* was cloned using RACE technology. The gene is 2025 bp long, including an open reading frame of 1374 bp, a 5' untranslated region of 241 bp, and a 3' untranslated region of 410 bp, which encodes 457 amino acids. Tissue expression analysis showed that *EcERR* was expressed in many *E. carinicauda* tissues, with the highest expression level in ovarian tissue. The expression level of *EcERR* in the cleavage stage was significantly higher than in that of other embryo and larval development stages ( $P < 0.05$ ). The expression level of *EcERR* first decreased and then increased during ovarian development, with the highest expression level in Stage I. After 5-hydroxytryptamine invaded, the expression levels of vitellogenin and *EcERR* in the experimental group were significantly higher than in the control group ( $P < 0.05$ ). The results showed that *EcERR* is involved in the regulation of *E. carinicauda* ovarian development and plays a key role in its early stages.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; Estrogen-related receptor; Ovarian development; 5-Hydroxytryptamine; Gene expression

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201223002

http://www.yykxjz.cn/

孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 任建峰, 林志华. 缢蛭急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 194-203

KONG X H, WANG S S, DONG Y H, REN J F, LIN Z H. Analysis of expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 194-203

## 缢蛭急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析\*

孔祥辉<sup>1,2</sup> 王莎莎<sup>2</sup> 董迎辉<sup>2①</sup> 任建峰<sup>1</sup> 林志华<sup>2,3①</sup>

(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. 浙江万里学院 浙江水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江 宁波 315100;

3. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院 浙江 宁海 315604)

**摘要** 缢蛭(*Sinonovacula constricta*)为广温性贝类,自身存在特殊的防御机制以适应外界温度胁迫。为研究高温胁迫对缢蛭热应激相关基因表达的影响,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术对转录组中筛选的 3 类 11 个高温应答候选基因,即分子伴侣类基因(*HSP70*、*HSP71*、*GRP94*、*BAG3*、*PDI16* 和 *CALR*)、代谢与免疫应答类基因(*MDH*、*CTL* 和 *CTSL*)和细胞凋亡类基因(*Caspase-3* 和 *p53*),在不同温度(30℃、32℃和 34℃)胁迫下,在鳃和肝胰腺中的表达特征进行了分析。结果显示,分子伴侣类基因受温度影响最为显著,胁迫 4 h 时表达量开始显著升高,与温度呈正相关,且鳃较肝胰腺更早做出响应;代谢与免疫应答类基因和细胞凋亡类基因在鳃、肝胰腺中的表达均随胁迫时间延长呈先升高后下降的趋势;免疫应答类基因在肝胰腺中的响应更显著。综上所述,高温胁迫下缢蛭维持基本生命稳态与这 3 类基因的调控密切相关。本研究为进一步探索贝类高温响应分子机制奠定理论基础,也为耐高温缢蛭新品种分子标记辅助选育提供候选基因。

**关键词** 缢蛭; 高温胁迫; qRT-PCR; 基因表达

**中图分类号** Q786; S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0194-10

水温是影响贝类存活、生长发育、免疫功能和分布的主要环境因子之一。水温超过一定范围,机体会产生热应激反应,导致其生理功能减弱、免疫功能降低,甚至死亡。研究发现,华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)死亡率与水温呈正相关,且具有时间依赖性(Cheng *et al.*, 2020);长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在夏季

更易受致病菌感染(Ugalde *et al.*, 2018); 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)高温胁迫后,肝胰腺中过氧化氢酶(CAT)含量显著降低(Jiang *et al.*, 2019); 虾夷扇贝、凸壳肌蛤(*Arcuatula senhousi*)和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)耗氧率和排氨率随水温升高呈先上升后下降的趋势(Hao *et al.*, 2014; 吕旭宁等, 2018; 薛素燕

\* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项课题(2018YFD0901405)、浙江省农业新品种选育重大科技专项课题(2016C02055-9)、宁波市“科技创新 2025”重大专项(2019B10005)和国家海洋水产种质资源库项目共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901405), Zhejiang Major Program of Science and Technology (2016C02055-9), Ningbo Major Project of Science and Technology (2019B10005), and National Marine Genetic Resource Center Program]. 孔祥辉, E-mail: kongxianghui416@126.com

① 通讯作者: 林志华, 研究员, E-mail: zhihua9988@126.com; 董迎辉, 教授, E-mail: dongyinghui118@126.com

收稿日期: 2020-12-23, 收修改稿日期: 2021-01-26

等, 2019); 四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)高温胁迫后血细胞吞噬活性和溶菌酶活性降低, 造成其免疫功能抑制(Yu *et al*, 2009)。

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 贝类耐高温分子机制研究取得一系列进展。研究表明, 分子伴侣和未折叠蛋白反应是生物体在应激条件下抵抗外界压力和维持蛋白稳态的关键(Zhu *et al*, 2016; Zhou *et al*, 2019)。对 3 种扇贝和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)研究发现, 热胁迫下机体通过合成 HSPs 维持蛋白稳态(Brun *et al*, 2008; Nie *et al*, 2017; Cheng *et al*, 2020)。热胁迫后, 长牡蛎和虾夷扇贝通过上调未折叠蛋白反应基因 *GRP94*、*GRP78* 和 *PDI6* 增强蛋白折叠功能(Yang *et al*, 2017; Jiang *et al*, 2019)。随胁迫时间延长, 机体内大分子受损, 细胞凋亡途径被激活, 引起凋亡基因表达, 如贻贝(*Mytilus galloprovincialis*、*M. coruscus* 和 *M. californianus*) *Caspase-3/8* 基因表达上调(Yao *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2014)。

随着全球气候变暖和极端高温天气频率增加, 海域温度逐年升高, 生活在潮间带的贝类极易遭受高温胁迫而引发死亡, 造成巨大的经济损失。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)属广温性贝类, 我国南北沿海均有分布, 在 8℃~30℃海水中能正常生活(王如才等, 2008), 因其活动范围有限, 自身已进化出特殊的防御机制以抵御高温胁迫, 但高温仍是影响其生长和诱发疾病的重要环境因素之一。因此, 开展缢蛏高温适应性研究对其养殖的可持续发展具有重要意义。目前, 缢蛏基因组已公布(Dong *et al*, 2020), 关于其耐高温性状关联分析及转录组研究也有报道, 如薛宝宝等(2019)开发了 4 个与其耐高温性状相关的 SNP 候选标记; Zhang 等(2019)通过转录组分析发现, 缢蛏通过上调 *BAG3* 和 *NF-κB α* 抑制剂(*NFIA*)等的表达应对高温胁迫。尽管如此, 目前对缢蛏高温耐受分子机制的认识仍不全面。本研究基于缢蛏高温胁迫转录组分析, 结合文献资料筛选高温应答相关基因, 并检测其在不同温度骤变后在鳃和肝胰腺中的表达变化规律, 旨在为缢蛏高温响应分子机制的研究提供理论基础, 为后续开展分子标记辅助育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用缢蛏于 2019 年 9 月采自浙江宏野海产品有限公司, 挑选活力好的个体约 400 粒[壳长(62.00±2.13) mm、壳高(20.52±0.66) mm、湿重(12.80±1.91) g]

在实验室暂养 3 d, 期间每天 08:00 和 18:00 投喂角毛藻(*Chaetoceros*)和小球藻(*Chlorella sp.*)混合液 500 mL (约  $5 \times 10^4$  cells/mL), 24 h 持续充气, 每天换水 1 次。

### 1.2 高温胁迫与样品采集

将缢蛏随机分为 4 组, 即对照组(22℃)和实验组(30℃、32℃和 34℃), 进行急性胁迫, 恒温加热棒控温。期间不投喂, 保持充气, 盐度控制在 20 左右。每组分别在 0、4、8、12、24 和 48 h, 随机挑选 6 粒缢蛏, 取鳃和肝胰腺于液氮速冻, 储存于-80℃冰箱。

### 1.3 RNA 提取与引物设计

利用 Total RNA extractor 试剂盒(上海生工)提取总 RNA, 1%琼脂糖电泳检测其完整性, 微量分光光度计(Nano300)检测其浓度。用 PrimeScript® RT reagent kit with gDNA eraser (TaKaRa, 日本)合成 cDNA, 基于基因组序列开放阅读框设计引物(表 1)。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

以鳃和肝胰腺 cDNA 稀释 100 倍为 qRT-PCR 模板, 18S rRNA (F: TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT, R: CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA)为内参基因, 在 LightCycler® 480 Instrument II PCR 仪(Roche, 美国)上进行 qRT-PCR 反应, 总体积 20 μL: SYBR qPCR master mix (Vazyme) 10 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 和 ddH<sub>2</sub>O 共 8 μL。反应程序: 95℃预变性 10 min, 95℃变性 10 s, 60℃退火 30 s, 循环 40 次, 溶解曲线: 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s。每组 3 个生物学平行, 3 个技术重复。

### 1.5 数据分析

以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(Livak *et al*, 2002)计算基因相对表达量, 用平均值±标准误(Mean±SE)表示。用 SPSS 22.0 进行独立样本 *T* 检验。用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

## 2 结果

### 2.1 高温胁迫后转录组中候选基因差异表达分析

基于缢蛏高温胁迫鳃和肝胰腺转录组分析(SUB9002458 和 PRJNA695103), 筛选出热应激相关基因(表 2), 结果与 qRT-PCR 表达模式一致。32℃急性胁迫 24 h 后, 不同基因的表达存在组织特异性, 分子伴侣类基因在鳃中响应更明显, 且 *PDI6*、*GRP94* 和 *CALR* 在鳃中的表达量高; 免疫类基因 *CTSL* 和 *CTL* 仅在肝胰腺中上调。细胞凋亡基因 *Caspase 3* 在鳃和肝胰腺中均下调。



表1 基因 qRT-PCR 引物信息  
Tab.1 Primer information of genes in qRT-PCR

基因类别 Gene categories	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
分子伴侣类 Molecular chaperones genes	热休克蛋白 70	<i>HSP70</i> F: TCTGCCACCGACAAGAGC R: TCTGCCACCGACAAGAGC
	热休克蛋白转录因子 1	<i>HSF1</i> F: ACAGAAACACTTGAAGCAGCAG R: CAGGGTGCATTACCTCCAAC
	94-KDa 葡萄糖调节蛋白	<i>GRP94</i> F: TTAAGGCTGACAAGGACAACCA R: ACCAGACTTGGCTATTGTACC
	BAG 分子伴侣蛋白 3	<i>BAG3</i> F: ACGATCCGAGATTAAATCCCATG R: ATTTCCCGTACTCTAGGCTCT
	钙网蛋白	<i>CALR</i> F: AAACACGAGCAAAACATCGAC R: TTTCTTGGTTCCTGGTCCGCAA
	蛋白质二硫键异构酶 6	<i>PDIA6</i> F: TTGAACAGCTCACTATGGACTTGCG R: CAAACCACAGTTCATCTCCGTTG
免疫与代谢类 Metabolic and immune genes	C-型凝集素	<i>CTL</i> F: CTGTTACGCCACGACATAGAGC R: GTCCTCCTCAGCCGTCTCCA
	组织蛋白酶 L	<i>CTSL</i> F: GTATCTGACCTGCCCCGACACT R: ATATTTACCCTCGGGCTTGGA
	苹果酸脱氢酶	<i>MDH</i> F: ATAGGGCACAGAGCAATCCA R: CTTCCAAGAACATCCCCACT
细胞凋亡类 Apoptosis genes	半胱氨酸蛋白酶 3	<i>Caspase-3</i> F: GCTTTGCTCCCCATCAGCGTA R: ACACCTAGCCAAGGATTCCG
	p53 凋亡蛋白	<i>p53</i> F: TGGAACAACAAAAGGCCAGCAA R: AAGCTGTCTGTTCATCTCTCTCC

表2 相关基因在转录组中的表达水平  
Tab.2 Expression levels of genes in the transcriptome

组织 Tissue	差异基因 FPKM 比值 FPKM ratio of differential genes						
	<i>HSP70</i>	<i>PDIA6</i>	<i>GRP94</i>	<i>CALR</i>	<i>CTSL</i>	<i>CTL</i>	<i>Caspase 3</i>
鳃 Gill	5.537	4.508	3.961	4.351	0	0	0.035
肝胰腺 Hepatopancreas	6.189	2.063	1.518	1.438	74.458	4.847	0.048

## 2.2 高温胁迫对分子伴侣类基因 mRNA 表达的影响

高温胁迫下,分子伴侣基因在鳃中表达与温度呈正相关,在肝胰腺中表达随温度升高总体呈先上升后下降趋势,且鳃较肝胰腺更早做出响应(图1和图2)。

30℃时,*HSP70* mRNA 在鳃和肝胰腺中变化基本不显著;32℃时,其在鳃和肝胰腺中表达量分别在8 h (4.06倍)和12 h (5.84倍)达到峰值;34℃时,其在鳃和肝胰腺中表达量均在4 h开始升高,12 h达到峰值,为对照组的17.11倍和6.30倍(图1a1、a2)。

不同温度胁迫下,*HSF1* 基因在鳃和肝胰腺中表达趋势不同。30℃时,鳃和肝胰腺中*HSF1* mRNA 变化基本不显著;32℃时,其在鳃中4 h开始显著升高

( $P<0.001$ ),为对照组的7.19倍,随之逐渐降低,48 h时低于对照组;在肝胰腺中8 h开始显著升高( $P<0.01$ ),12 h略有回落,24 h时达到峰值(3.55倍),随之恢复到对照水平;34℃时,其在鳃和肝胰腺中变化总体呈先升高后下降的趋势,分别在4 h和12 h达到峰值,为对照组的6.14倍和2.17倍(图1b1、b2)。

*GRP94* 基因在鳃中变化更显著。30℃时,鳃和肝胰腺中*GRP94* 基因表达量在4 h和12 h达到峰值,显著高于对照组( $P<0.05$ );32℃时,在鳃中表达量4 h开始升高,8 h达到峰值,显著高于对照组( $P<0.001$ );在肝胰腺中变化不显著;34℃时,其表达量在鳃中呈先升高后下降的趋势,在肝胰腺中持续上升,分别在8 h和48 h达到峰值,为对照组的8.08倍和5.76倍

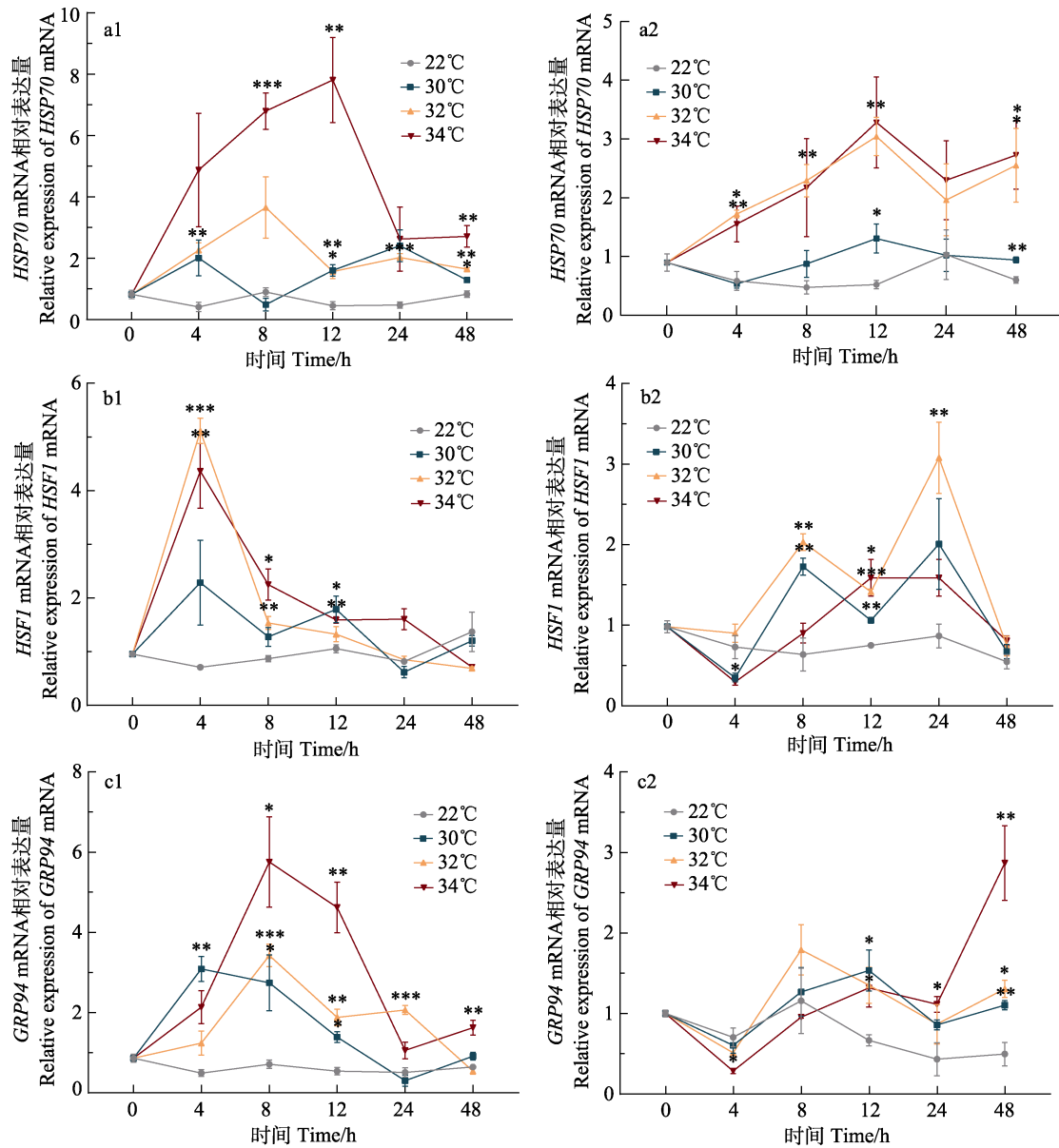


图 1 高温胁迫对缙蛭热休克分子伴侣基因表达的影响

Fig.1 Effects of high-temperature stress on the expression of shock molecular chaperone genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺。\*表示与对照组差异显著( $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ), 误差线表示平均值 $\pm$ 标准误( $n=3$ )。下同  
 1: Gill; 2: Hepatopancreas. \* represents significant differences between the different temperature stress with control at same time ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). The vertical bars represent the Mean $\pm$ SE ( $n=3$ ). The same as below

(图 1c1、c2)。

30°C时, *BAG3* 基因在鳃和肝胰腺中变化基本不显著; 32°C时, 其在鳃和肝胰腺中变化均呈先升高后下降的趋势, 均在 4 h 时达到峰值; 34°C时, 其在鳃和肝胰腺中变化均呈先升高后降低再升高的趋势, 均在 4 h 达到峰值, 分别为对照组的 6.64 倍和 11.43 倍(图 2a1、a2)。

*PDIA6* 在鳃中变化较显著。30°C和 32°C时, 其在鳃和肝胰腺中表达均呈先上升后下降的趋势, 均在

4 h 和 8 h 达到峰值, 显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 34°C时, 在鳃中 8 h 表达量达到峰值, 为对照组的 8.03 倍; 在肝胰腺中 48 h 时表达量达到峰值(7.39 倍)(图 2b1、b2)。

*CALR* mRNA 在鳃中变化更加显著。30°C时, 在鳃和肝胰腺中变化均呈先上升后下降的趋势, 分别在 4 h 和 8 h 达到峰值, 为对照组的 4.40 倍和 5.80 倍。32°C时, 其在鳃和肝胰腺中分别在 4 h 和 8 h 表达量开始显著升高( $P < 0.05$ ), 4 h 和 12 h 达到峰值, 为对照组的 9.07 倍和 7.76 倍。34°C时, 其在鳃中 12 h 时

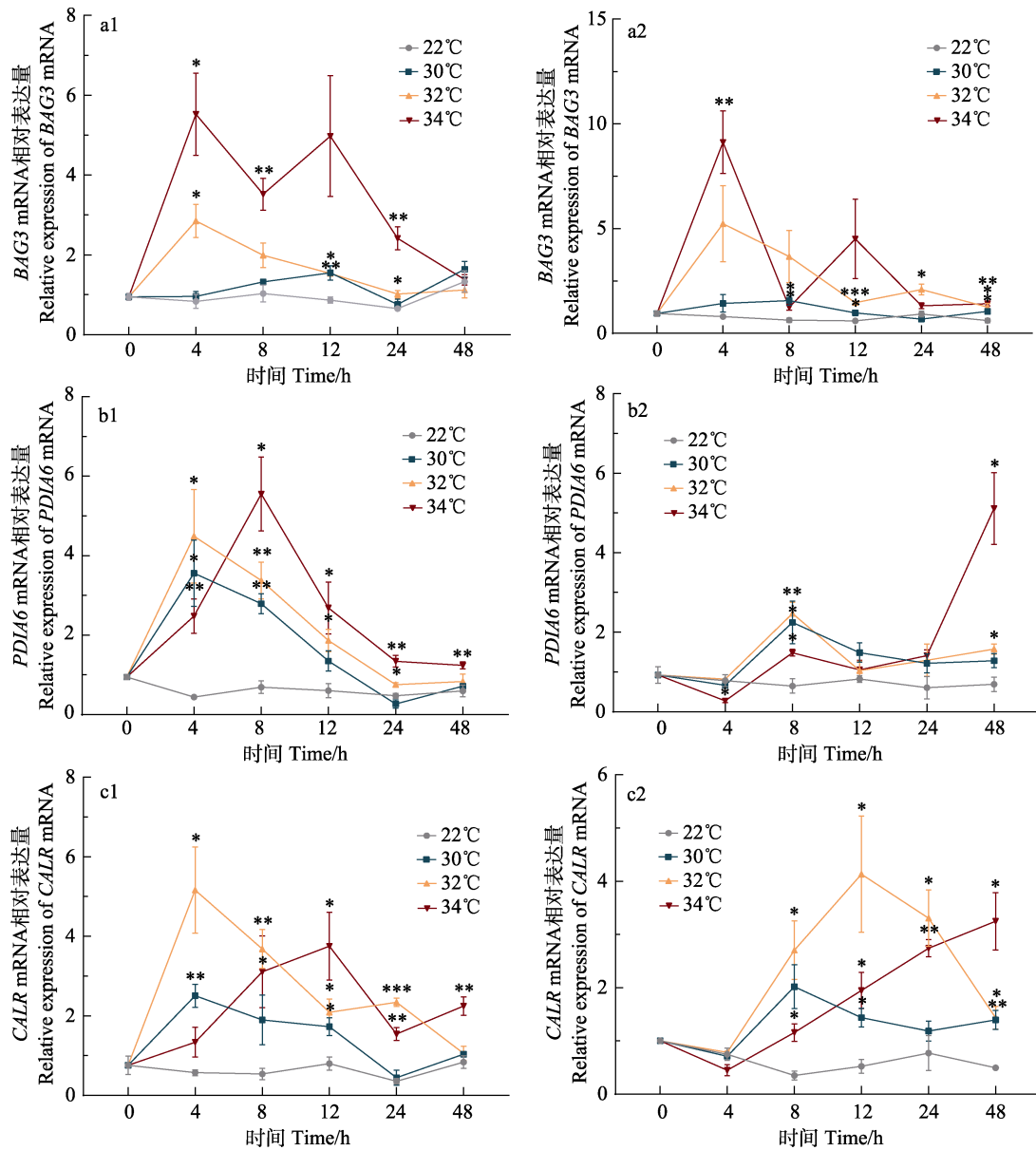


图2 高温胁迫对缢蛏其他分子伴侣基因表达的影响

Fig.2 Effects of high-temperature stress on the expression of other molecular chaperone genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

表达量达到峰值, 显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 在肝胰腺中变化与时间呈正相关, 8 h 开始显著升高( $P < 0.05$ ), 48 h 时达到峰值(图 2c1、c2)。

### 2.3 高温胁迫对代谢与免疫类基因 mRNA 表达的影响

高温胁迫下, 鳃和肝胰腺中的代谢与免疫类基因随温度的升高总体呈先升高后下降的趋势, 肝胰腺响应更加显著, 其中, *CTL* 仅在肝胰腺中表达, 且与温度呈正相关(图 3)。

30°C 时, *MDH* mRNA 在鳃中 12 h 时显著升高且达到峰值( $P < 0.05$ ), 随之略有回落, 48 h 时再次显著

升高( $P < 0.05$ ), 在肝胰腺变化不显著( $P > 0.05$ ); 32°C 时, 其在鳃中变化基本不显著; 在肝胰腺中 24 h 时表达量达到峰值, 为对照组的 2.38 倍; 34°C 时, 其在鳃中表达量 8 h 和 24 h 显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 在肝胰腺中表达量在 4 h 时显著低于对照组( $P < 0.01$ ), 24 h 达到峰值(图 3a1、a2)。

*CTSL* 在鳃和肝胰腺中的变化趋势不同。30°C 时, 其在鳃中变化呈先下降再升高又下降的趋势, 48 h 时显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 在肝胰腺中变化不显著; 32°C 时, 其在鳃中表达量在 4 h 开始降低, 24 h 时略有上调, 但仍显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 在肝胰腺中

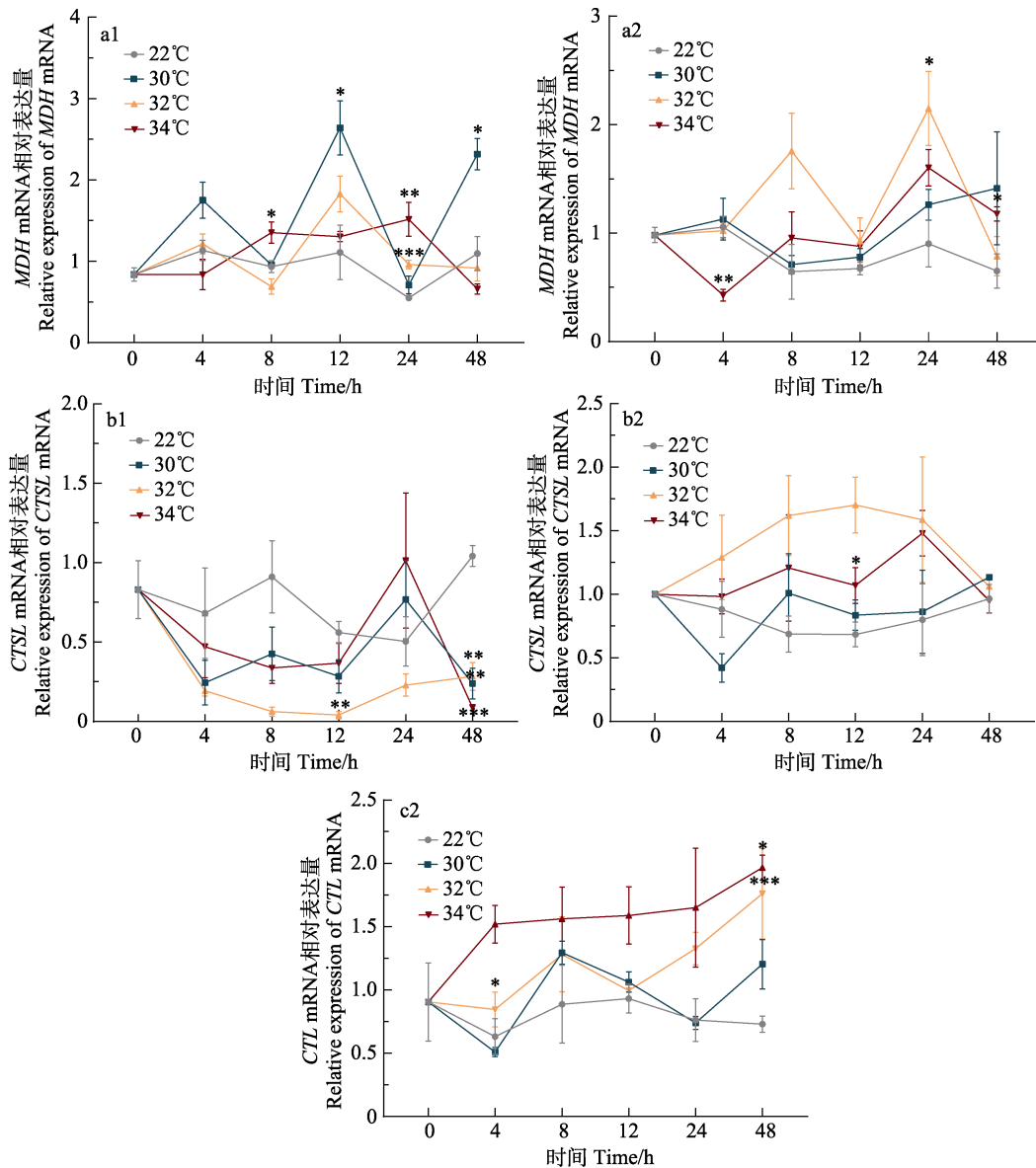


图 3 高温胁迫对缙蛭代谢和免疫类基因表达的影响

Fig.3 Effects of high-temperature stress on the expression of metabolic and immune related genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

12 h 时表达量达到峰值; 34°C 时, 其在鳃中变化呈先下降后上升再下降的趋势, 48 h 极显著低于对照组 ( $P < 0.001$ ); 在肝胰腺中变化不显著(图 3b1、b2)。

*CTL* 基因在鳃中未检测到有效信号。在肝胰腺中, 其在 30°C 时变化不显著; 在 32°C 时持续升高, 48 h 达到峰值, 显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ); 34°C 时其在 48 h 达到峰值, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 3c2)。

#### 2.4 高温胁迫对细胞凋亡类基因 mRNA 表达的影响

温度胁迫后, 细胞凋亡基因在鳃中的表达与温度呈正相关, 在肝胰腺中的表达随温度的升高总体呈先上升后下降的趋势(图 4)。

30°C 时, 鳃和肝胰腺 *Caspase-3* mRNA 分别在 8 h 和 12 h 时达到峰值, 为对照组的 5.11 倍和 2.15 倍; 32°C 时, 其在鳃和肝胰腺中表达量分别在 4 h 和 8 h 开始升高, 12 h 和 24 h 达到峰值, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 34°C 时, 其在鳃和肝胰腺中表达量分别在 4 h 和 8 h 开始升高, 均在 12 h 达到峰值, 分别为对照组 5.54 倍和 4.22 倍(图 4a1、a2)。

30°C 时, 鳃和肝胰腺中 *p53* mRNA 变化均不显著; 32°C 时, 其在鳃中变化基本不显著; 在肝胰腺中变化呈先升高后下降趋势, 24 h 时达到峰值, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 34°C 时, 其在鳃中表达量 8 h 时

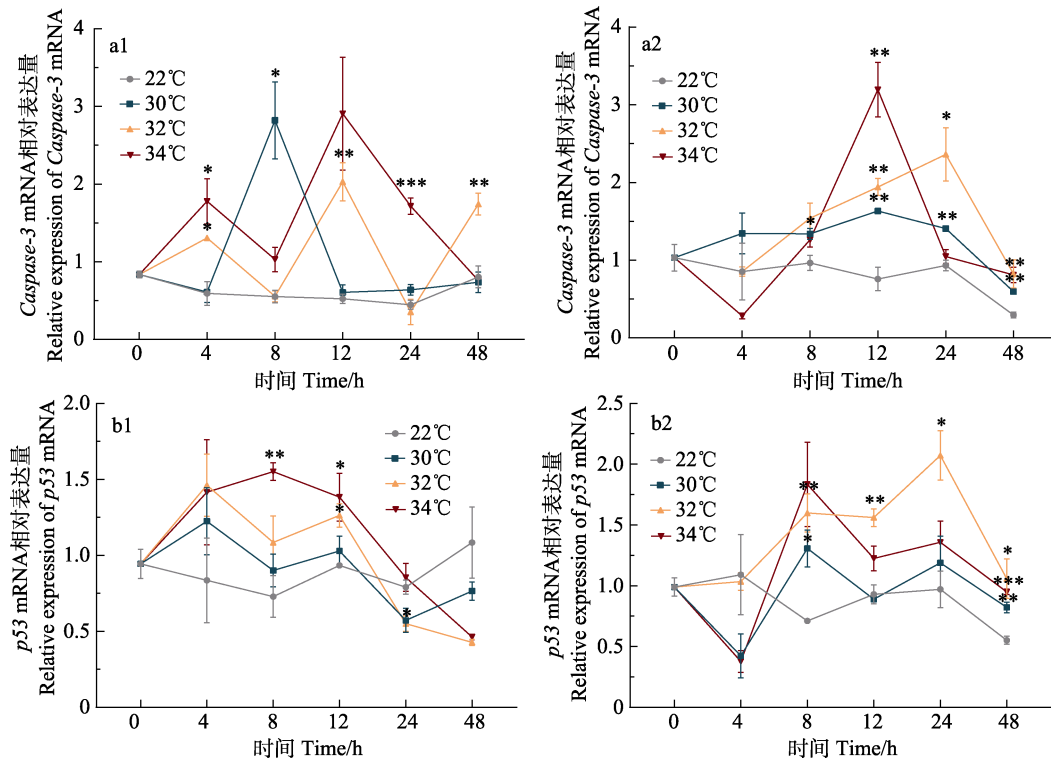


图 4 高温胁迫对缙蛭细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig.4 Effects of high-temperature stress on the expression of apoptosis genes in *S. constricta*

1: 鳃; 2: 肝胰腺

1: Gill; 2: Hepatopancreas

显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 为对照组的 2.13 倍; 在肝胰腺中 8 h 时表达量达到峰值, 为对照组的 2.58 倍(图 4b1、b2)。

### 3 讨论

高温胁迫下, 机体通过调节体内相关酶和基因的表达以应对热应激。在水生生物中, 鳃为主要的呼吸代谢器官, 直接与海水接触, 可直接感受水温的变化并迅速做出反应; 肝胰腺为主要的代谢与免疫器官, 对环境应激响应敏感。因此, 本研究基于缙蛭高温胁迫后的转录组分析, 筛选了 3 类高温应答相关基因, 并对其在鳃和肝胰腺中的表达特征进行了分析。

#### 3.1 分子伴侣类基因对高温胁迫的响应

HSP 作为主要的分子伴侣, 在参与蛋白质折叠、组装、降解和细胞定位等方面发挥着重要作用(Liu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017)。在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *Pelteobagrus vachelli* ♂)中发现, 高温可诱导 HSP70 的表达(朱凌威等, 2021)。研究表明, HSP 上调可能是长牡蛎适应环境的关键(Zhang *et al.*, 2012)。

热休克因子(HSF)是真核细胞中调控各类热激基因表达的主要蛋白因子。正常情况下, HSF1 主要位于细胞质中, 应激后转移到细胞核, 与 DNA 上热休克元件(HSE)结合(Richter *et al.*, 2010), 激活 HSP 等靶基因转录, 此时 HSP 释放 HSF1, 帮助变性蛋白质修复与降解(Richter *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2015)。在长牡蛎中发现, 热应激可诱导 HSF1 和 HSPs 基因表达上调, 且其中 1 个 HSP70 基因可能受到 HSF1 的调控, 推测 HSF1-HSP 可能存在调控关系(Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020)。本研究中, 高温胁迫后缙蛭 HSF1 和 HSP70 在初始阶段开始上调, 且在鳃中表达与温度呈正相关, 推测其可能通过激活 HSF1 促进 HSP70 合成, 降解受损或错误折叠的蛋白。

BAG3 作为分子伴侣, 可与 HSF1 相互作用调节其核穿梭, 进而调节 HSP 表达水平(Jin *et al.*, 2015), 也可通过调节细胞凋亡、发育、细胞骨架组织和自噬等调节细胞对应激的适应性反应(Behl, 2011; Gamberinger *et al.*, 2011)。本研究中, 高温胁迫 4 h 后, BAG3 mRNA 在鳃和肝胰腺中开始上调, 其在贝类的研究中较少。热应激下, 长牡蛎 BAG 蛋白家族通过与 HSP70/HSC70 直接作用调节其伴侣的功能(Lim



et al, 2016); 对缢蛏足转录组分析显示, 高温胁迫下 *BAG3* 上调高达 30 倍(Zhang et al, 2019)。热应激后, 缢蛏可能通过诱导 *BAG3* 上调激活 *HSF1*, 进而促进 *HSP* 合成以维持体内蛋白质稳态, 抵御温度胁迫(Jin et al, 2015)。

此外, 温度胁迫会导致内质网腔内错误折叠蛋白积累引起内质网应激, 从而激活未折叠蛋白反应, 引起应激基因(*GRPs*、*CALR* 和 *PDIAs*)上调(Tiffany-Castiglioni et al, 2012; Zhang et al, 2012)。*PDI6* 作为重要的分子伴侣之一, 可抑制错误折叠蛋白的聚集; 也可参与未折叠蛋白反应提高蛋白质折叠功能。长牡蛎热应激后血细胞中 *PDI6* 表达量显著上调(Yang et al, 2017)。本研究中, 温度胁迫可诱导缢蛏 *PDI6* 上调, 且在鳃中变化与温度呈正相关, 与大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)热胁迫后肝脏和肾脏中 *PDI6* 基因表达模式一致(唐启政, 2018)。热应激下, 缢蛏可能通过上调内质网内腔分子伴侣基因减少错误折叠蛋白的聚集, 维持蛋白质质量控制。

### 3.2 细胞凋亡类基因对高温胁迫的响应

细胞凋亡是生物体环境适应反应的重要机制, 反映了机体对不同环境胁迫的适应能力。高温胁迫会引起细胞内 DNA、蛋白质等大分子损伤, 造成细胞凋亡, 甚至死亡(Sheikh et al, 2015; Zhou et al, 2019)。热胁迫后, 番红砗磲(*Tridacna crocea*)通过负调控未折叠蛋白反应诱导细胞凋亡(Zhou et al, 2019)。*p53* 作为重要的抑癌因子, 在细胞周期调控、细胞凋亡以及 DNA 损伤修复中发挥重要作用(Sheikh et al, 2015)。本实验中, 胁迫初期, 缢蛏 *p53* 基因表达量与温度呈正相关, 推测机体通过上调 *p53* 基因修复损伤的细胞。随温度的持续升高和胁迫时间的延长, 其表达受到抑制, 可能是高温造成体内 DNA 不可修复, 机体损伤严重, 最终引起死亡, 与暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)和大菱鲂的变化趋势一致(Cheng et al, 2015; 刘晓菲等, 2019)。

*Caspase-3* 作为细胞凋亡通路中关键的执行者, 其表达量可反映细胞凋亡程度。本研究中, 热应激后, 缢蛏鳃和肝胰腺中 *Caspase-3* 变化呈先上升后下降的趋势, 与暗纹东方鲀血细胞的结果基本一致(Cheng et al, 2015)。可能高温造成机体 DNA 损伤增加, 进而影响其基因组完整性, 启动下游细胞凋亡, 使 *Caspase-3* mRNA 表达水平增加(Yao et al, 2012)。在长牡蛎、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)中也有类似发现(贾旭颖等, 2014; 孙盛明等, 2017; Yang et al, 2017), 说明

*Caspase-3* 在缢蛏高温应激反应中发挥着重要作用。

## 4 结论

急性高温胁迫下缢蛏应激相关基因在鳃和肝胰腺中表达变化的研究表明, 缢蛏通过调节蛋白折叠、代谢、免疫以及细胞凋亡等一系列生物过程应对热应激。热激条件下, 缢蛏可能上调分子伴侣类基因表达促进蛋白质折叠和恢复受损或降解变性的蛋白质, 以维持体内蛋白质稳态。分子伴侣在修复或降解受损蛋白的同时, 需要消耗大量 ATP, 机体通过加快代谢速率维持基本生命活动。随温度升高和胁迫时间延长, 体内蛋白损伤程度不断加剧, 代谢和免疫应答受到抑制。此时, 机体通过激活凋亡系统清除体内受损细胞, 进而维持细胞的稳态。本研究为进一步探索缢蛏高温响应分子机制奠定理论基础, 同时为后续分子标记辅助育种提供候选基因。

## 参 考 文 献

- BEHL C. BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy*, 2011, 7(7): 795–798
- BRUN N T, BRICELJ V M, MACRAE T H, et al. Heat shock protein responses, in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 358(2): 151–162
- CHENG C H, YANG F F, LIAO S A, et al. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 172–179
- CHENG D W, LIU H X, ZHANG H K, et al. Effects of thermal stress on mortality and *HSP90* expression levels in the noble scallops *Chlamys nobilis* with different total carotenoid content. *Cell Stress and Chaperones*, 2020, 25(1): 105–117
- DONG Y H, ZENG Q F, REN J F, et al. The chromosome-level genome assembly and comprehensive transcriptomes of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 664
- GAMERDINGER M, KAYA A M, WOLFRUM A, et al. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Reports*, 2011, 12(2): 149–156
- HAO Z L, TANG X J, DING J, et al. Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia-N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1863–1876
- JIA X Y, ZHANG D, LU Y L, et al. Effects of abrupt change in

- temperature and non-ionic ammonia on the *cyt-C* and *caspase-3* of *Litopenaeus vannamei* in freshwater. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 700–710 [贾旭颖, 张丹, 路允良, 等. 温度突变和非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾 *cyt-C* 和 *caspase-3* 的影响, *中国水产科学*, 2014, 21(4): 700–710]
- JIANG W W, MEIRONG D, FANG J. Response of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* to acute temperature challenge: Physiological and biochemical parameters. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37: 321–329
- JIN Y, AHN S, KIM S. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of *HSF1* upon heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 464(2): 561–567
- KIM B M, KIM K, CHOI I Y, *et al.* Transcriptome response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* susceptible to thermal stress: A comparison with the response of tolerant oyster. *Molecular and Cellular Toxicology*, 2017, 13(1): 105–113
- LIM H J, KIM B M, HWANG I J, *et al.* Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics*, 2016, 19: 62–70
- LIU D, CHEN Z. The expression and induction of heat shock proteins in molluscs. *Protein and Peptide Letters*, 2013, 20(5): 602–606
- LIU X F, MA A J, HUANG Z H, *et al.* Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(6): 1407–1415 [刘 晓菲, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆高温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特性分析. *水产学报*, 2019, 43(6): 1407–1415]
- LIU Y, LI L, HUANG B, *et al.* RNAi based transcriptome suggests genes potentially regulated by *HSF1* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under thermal stress. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 639–654
- LIU Y, ZHU Q, LI L, *et al.* Identification of *HSF1* target genes involved in thermal stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by ChIP-seq. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(9): 167–179
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, 2002, 25(4): 402–408
- LÜ X N, WANG X Q, WU Y L, *et al.* Effect of temperature on the energy budget of *Arcuatula senhousi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 119–125 [吕旭宁, 王晓芹, 吴亚林, 等. 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 119–125]
- NIE H T, LIU L H, HUO Z M, *et al.* The *HSP70* gene expression responses to thermal and salinity stress in wild and cultivated Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture*, 2017, 470: 149–156
- RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J, *et al.* The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 253–266
- SHEIKH M S, FORNACE A J. Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 182(2): 171–181
- SUN S M, ZHU J, GE X P, *et al.* Cloning of *caspase3* gene in *Megalobrama amblycephala* and analysis of its expression in high temperature stress. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(10): 4090–4099 [孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) *caspase3* 基因克隆及其在高温胁迫中的表达分析. *基因与基因组学*, 2017, 36(10): 4090–4099]
- TANG Q Z. Cloning, expression and function of stress-resistant genes based on the transcriptome of turbot (*Scophthalmus maximus*) skin tissue. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [唐启政. 基于大菱鲆皮肤组织转录组的抗逆基因克隆、表达及功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- TIFFANY-CASTIGLIONI E, QIAN Y. ER chaperone-metal interactions: Links to protein folding disorders. *NeuroToxicology*, 2012, 33(3): 545–557
- UGALDE S C, PRESTON J, OGIER E, *et al.* Analysis of farm management strategies following herpesvirus (OsHV-1) disease outbreaks in Pacific oysters in Tasmania. *Australia Aquaculture*, 2018, 495: 179–186
- WANG R C, WANG Z P. *Science of marine shellfish culture*. Qingdao: China Ocean University Press, 2008 [王如才, 王昭平. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008]
- XUE B B, MENG D L, REN S Y, *et al.* *SchHsc70* gene SNP markers screening and correlation analysis for high temperature resistance of *Sinonovacula constricta* new variety “Shenzhe No.1”. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2439–2448 [薛宝宝, 孟德龙, 任泓好, 等. 缢蛏新品种“申浙1号”*SchHsc70* 基因 SNPs 筛查与耐高温性状的关联性分析. *水产学报*, 2019, 43(12): 2439–2448]
- XUE S Y, WANG J Y, LI J Q, *et al.* Effects of temperature on energy metabolism and antioxidant enzyme activities of *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 573–583 [薛素燕, 王金叶, 李家琦, 等. 温度对魁蚶能量代谢及抗氧化酶活性的影响. *水产学报*, 2019, 43(3): 573–583]
- YANG C, GAO Q. The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against acute heat stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 68(1): 132–143
- YAO C L, SOMERO G N. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *Journal of Experimental Biology*, 2012, 215(24): 4267–4277
- YU J H, SONG J H, CHOI M C, *et al.* Effects of water temperature change on immune function in surf clams,

- Mactra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 30–35
- ZHANG D, WANG H W, YAO C L. Molecular and acute temperature stress response characterizations of *caspase-8* gene in two mussels, *Mytilus coruscus* and *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 177/178: 10–20
- ZHANG G, FANG X, GUO X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 2012, 490(7418): 49–54
- ZHANG W, STOREY K B, DONG Y W. Adaptations to the mudflat: Insights from physiological and transcriptional responses to thermal stress in a burrowing bivalve *Simonovacula constricta*. *Science of the Total Environment*, 2019, 710: 136280
- ZHOU Z, LIU Z, WANG L, *et al.* Oxidative stress, apoptosis activation and symbiosis disruption in giant clam *Tridacna crocea* under high temperature. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 451–457
- ZHU L W, ZHANG C Y, LIU Z, *et al.* Cloning, expression of *hsp70* core cDNA and the effects of heat stress on its tissue expression in *Pelteobagrus fulvidraco* ♀×*P. vachelli* ♂. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 47–55 [朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 等. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 47–55]
- ZHU Q, ZHANG L, LI L, *et al.* Expression characterization of stress genes under high and low temperature stresses in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(2): 176–188

(编辑 冯小花)

## Analysis of Expression Characteristics of Related Genes in Response to Acute Thermal Stress in the Razor Clam *Simonovacula constricta*

KONG Xianghui<sup>1,2</sup>, WANG Shasha<sup>2</sup>, DONG Yinghui<sup>2①</sup>, REN Jianfeng<sup>1</sup>, LIN Zhihua<sup>2,3①</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 3. Ninghai Institute of Maricultural Breeding and Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ninghai, Zhejiang 315604, China)

**Abstract** The razor clam, *Simonovacula constricta*, as a eurythermic bivalve, might have special adaptive mechanisms for defense against environmental stress because of its specialized lifestyle and limited mobility. To understand the expression characteristics of genes involved in different metabolic processes, quantitative reverse transcription PCR technology was used to analyze the expression levels of three types of temperature response candidate genes (molecular chaperone genes, metabolic and immune related genes, and apoptosis genes) based on a transcriptomic analysis in the gills and hepatopancreas of *S. constricta* under different acute high temperature conditions (30°C, 32°C and 34°C). The results showed that the expression of molecular chaperone genes was significantly upregulated at 4 h under thermal stress and was positively correlated with temperature. Meanwhile, gills responded earlier than the hepatopancreas. The mRNA expression of metabolic and immune responses and apoptotic genes increased and then decreased in both tissues with the extension of stress time. In conclusion, the regulation of these genes played significant roles to maintain basic homeostasis in *S. constricta* under heat stress. The expression of immune response genes was more significant in the hepatopancreas. This study provides a theoretical basis for further exploring the molecular mechanisms of high temperature responses of *S. constricta* and provides candidate genes for molecular marker-assisted breeding in this species under thermal stress.

**Key words** *Simonovacula constricta*; Thermal stress; qRT-PCR; Gene expression

① Corresponding author: LIN Zhihua, E-mail: zhihua9988@126.com; DONG Yinghui, E-mail: dongyinghui118@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201128001

http://www.ykxjz.cn/

梁洲瑞, 汪文俊, 刘福利, 张朋艳, 袁艳敏, 姚海芹, 孙修涛, 王飞久. 铁促进半叶紫菜华北变种丝状体的生长发育及其生理生化基础. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 204–214

LIANG Z R, WANG W J, LIU F L, ZHANG P Y, YUAN Y M, YAO H Q, SUN X T, WANG F J. Iron promotes the growth and development of conchocelis of *Pyropia katadae* var. *hemiphylla* and its physiological and biochemical bases. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 204–214

# 铁促进半叶紫菜华北变种丝状体的 生长发育及其生理生化基础\*



梁洲瑞<sup>1,2</sup> 汪文俊<sup>1,2</sup> 刘福利<sup>1,2①</sup> 张朋艳<sup>1,2</sup> 袁艳敏<sup>1</sup>  
姚海芹<sup>1</sup> 孙修涛<sup>1,2</sup> 王飞久<sup>1</sup>

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 通过探讨半叶紫菜华北变种(*Pyropia katadae* var. *hemiphylla*)丝状体在不同铁浓度下的相对生长速率(RGR)、孢子囊枝形成率及若干生理生化指标(叶绿素荧光参数、活性氧含量、抗氧化剂含量、抗氧化酶活性等)的变化规律,以期获得适宜其生长及孢子囊枝形成的铁浓度范围,并初步揭示其在不同铁浓度下的生理生化变化特征。研究结果显示,在0.040 mg/L铁浓度下,半叶紫菜华北变种营养藻丝有较高的RGR、光系统II最大量子产量( $F_v/F_m$ )和调节性能量耗散的量子产量[Y(NPQ)],表明此铁浓度可促进营养藻丝的光能转换效率和光保护能力的提高,并利于其生长。高铁浓度(0.160~0.800 mg/L)组的营养藻丝RGR显著降低,而贝壳丝状体孢子囊枝形成率显著增加,表明高铁浓度抑制了藻丝的营养生长,而促进了藻丝营养生长状态向发育状态的转变。贝壳丝状体的孢子囊枝比例与 $F_v/F_m$ 呈显著的正相关关系,表明营养藻丝向孢子囊枝转变后,贝壳丝状体的光能转换效率显著提高。铁的添加使藻丝中活性氧(ROS)含量显著增加,而类胡萝卜素和脯氨酸含量以及抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽还原酶(GR)]活力与ROS含量均呈显著正相关关系,表明藻丝的抗氧化系统可对铁介导的过量ROS作出积极应答,以平衡ROS的产生和清除。本研究可为半叶紫菜华北变种的苗种培育提供理论依据。

**关键词** 半叶紫菜华北变种; 铁; 生长; 孢子囊枝形成; 叶绿素荧光参数; 生化特性

**中图分类号** Q 945.79 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0204-11

半叶紫菜华北变种(*Pyropia katadae* var. *hemiphylla*) 毛菜科(Bangiaceae), 通常简称华北半叶紫菜, 主要属于红藻门(Rhodophyta)、红毛菜目(Bangiales)、红 分布于青岛至大连沿岸(汤晓荣等, 1999; 王云霞等,

\* 国家重点研发计划(2018YFD0901505; 2018YFD0900305)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系、国家海洋水产种质资源库项目和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费“创新团队”项目(2020TD27)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901505; 2018YFD0900305), China Agriculture Research System of MOF and MARA, Project of National Marine Genetic Resource Center, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD27)].

梁洲瑞, E-mail: liangzr@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2020-11-28, 收修改稿日期: 2020-12-22

2011)。华北半叶紫菜野生藻体大多是雌雄同体,雌区和雄区被一条分界线从基部到端部分成 2 个不等的部分(Tseng, 1983),自然生长在潮间带的低洼石沼处,一般不需经过周期性的干出,此自然习性暗示其可能较适应全浮动筏式栽培方式,是向外海区发展的潜在优良品种(Wang *et al.*, 2016)。但是,目前华北半叶紫菜的苗种培育技术尚不成熟,限制了其在紫菜生产中的应用。

紫菜(*Pyropia/Porphyra*)具有较高的营养价值和经济价值(赵玲等, 2018),是我国最重要的栽培海藻之一。目前,条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)和坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国主要的紫菜栽培品种,其一般采用支柱式和半浮动筏式的栽培方式,这 2 种方式应用在潮间带附近海区,可让紫菜周期性干出,利于苗帘上杂藻的清除(何培民等, 2018)。近年来,随着紫菜产品需求增大,紫菜栽培业快速发展,适合紫菜栽培的浅滩或近岸海区日趋饱和。受经济利益驱使,有些海区进行高密度紫菜栽培,导致紫菜的质量和产量严重下降,并时常发生病害(张美如等, 2012)。为缓解紫菜栽培的空间问题,外海的全浮动筏式或翻板式栽培方式在紫菜生产上逐渐得到应用(黄惠珍, 2015; 赵春暖等, 2020),但其弊端在于紫菜网帘的干出时间受到限制,紫菜易受到杂藻的附着污染,进而影响养殖紫菜的产量和质量。为进一步推动紫菜养殖向离岸深水区发展,拓展紫菜养殖产业发展空间,除进一步完善栽培技术和设备外,开发新的紫菜栽培品种也是有效措施之一。

紫菜的苗种培育主要是进行丝状体的培养,而育苗用的丝状体通常在钙质固形物(如文蛤壳、牡蛎壳、河蚌壳等)上附着生长,在生产上可利用紫菜果孢子或自由丝状体钻入贝壳后在大水池进行贝壳丝状体的平面或者吊挂培养(赵素芬, 2012)。贝壳丝状体生长发育过程一般可分为 4 个阶段:藻丝营养生长阶段、孢子囊枝形成阶段、壳孢子形成阶段及壳孢子分散阶段(He *et al.*, 2006; 赵素芬, 2012)。温度、盐度、光强、光周期、氮浓度和磷浓度等均是影响紫菜贝壳丝状体生长发育的关键生态因子(陈焯等, 2005; Frazer *et al.*, 1995; He *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2011; López-Vivas *et al.*, 2015; Knoop *et al.*, 2020; Monotilla *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2004; 汤晓荣等, 1998)。一般认为,维持相对较低温度、增加光照时间(每天 12 h 以上)、适当增加氮肥可促进紫菜营养藻丝的生长,而适当提高温度、减少光照时间(每天 10 h 以下)、适当增加磷肥可促进紫菜营养藻丝向孢子囊枝转变(Frazer *et al.*, 1995; He *et al.*,

2006; Li *et al.*, 2011; Monotilla *et al.*, 2010; 赵素芬, 2012)。铁作为藻类生长发育所必需的微量元素之一,在光合作用、呼吸作用、叶绿素合成、蛋白质与核酸合成、营养盐的吸收等生理代谢过程中发挥着极为重要的作用(Geider *et al.*, 1994; Hudson *et al.*, 1990; Raven, 1988)。在多种植物必需矿物元素中,铁是需求量最大的(Kobayashi *et al.*, 2012)。目前,有关大型海藻的铁营养及其代谢研究甚少(刘静雯等, 2004; Manley, 1981; Suzuki *et al.*, 1995),涉及到紫菜栽培的铁营养研究也鲜有报道(Shen *et al.*, 2005; 王素平等, 1983)。关于铁元素对紫菜贝壳丝状体孢子囊枝形成的影响及紫菜丝状体对不同铁浓度的生理生化响应还没有相关的文献报道。本研究以华北半叶紫菜丝状体为研究对象,探讨其生长、孢子囊枝形成、光合生理及生化组分对不同铁浓度的反应规律,以期探明适宜其生长、发育的铁浓度及其内在生理生化机制,进而为华北半叶紫菜苗种培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2019 年 3 月,在山东省青岛市石老人海域收集野生的华北半叶紫菜,选择个体较大、色泽较深、成熟度较高的健康藻体作为种藻。用灭菌天然海水充分洗净,挤干水后把种藻摊放在竹帘上阴干,使之失去 40%~50%的水分,经阴干刺激后的种藻放入盛有灭菌天然海水的容器内,不断搅拌海水促使果孢子放出。取水样镜检发现,果孢子放散量达到预定要求时即将种藻捞出,用 150~300 目的筛绢过滤,所得过滤液即为果孢子液。

用浮游植物计数框统计每毫升果孢子液中所含果孢子数,计算得到果孢子液浓度,根据实验贝壳的总面积,计算出所需要投放的果孢子总数以及果孢子液的用量,保证接种密度为 150~250 个果孢子/cm<sup>2</sup>贝壳。然后,用量筒量出所需的果孢子液并装进喷壶内,把果孢子液均匀地喷洒在已装满贝壳的塑料框中,使果孢子自然沉降到贝壳(文蛤壳)上。剩余的果孢子液分装至数个三角烧瓶中,充气悬浮培养获得自由丝状体,然后不断分瓶扩增以获得足够量的自由丝状体的营养藻丝进行后续实验。扩增条件:光合有效辐射(photosynthetically active radiation, PAR)为 50~60 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s),每天光照时间在 12 h 以上,添加营养盐(NO<sub>3</sub>-N 为 10 mg/L, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 为 1 mg/L),水温为 20℃,每 3 d 换水 1 次。培养容器均置于智能光照培养箱(宁波江南仪器厂)中,充气培养。

在果孢子钻贝壳阶段,培养条件: PAR 为 30~



50  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 添加营养盐( $\text{NO}_3^-$ -N 为 2 mg/L,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P 为 0.2 mg/L), 水温为 20 $^\circ\text{C}$ 。采果孢子 7 d 后取样检查果孢子的萌发率, 当果孢子萌发率达 50%~70%时, 换水、洗刷贝壳。在贝壳丝状体的藻丝营养生长阶段, 其培养条件与上述悬浮培养的营养藻丝的培养条件一致。

采用标准铁母液[ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ 浓度为 1000 mg/L, 由国家有色金属及电子材料分析测试中心提供]配制不同铁浓度( $C_{\text{Fe}}=0.040$ 、0.160、0.800 mg/L)的工作液, 以不额外添加铁的天然灭菌海水作为对照。经 PhotoLab 多参数水质分析仪(WTW, 德国)测定, 本研究用天然海水的铁元素浓度为 0.001 mg/L。以下各个处理组均添加氮/磷营养盐( $\text{NO}_3^-$ -N: 10 mg/L,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P: 1 mg/L), 且每 3 d 换水 1 次。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 自由丝状体营养藻丝的相对生长速率测定** 将华北半叶紫菜营养藻丝置于 4 个不同的铁浓度下( $C_{\text{Fe}}=0.001$ 、0.040、0.160、0.800 mg/L)悬浮培养, 其他培养条件: 光周期为 12D : 12L, PAR 为 50  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 温度为 20 $^\circ\text{C}$ 。每个铁浓度组设置 3 个平行, 各处理组的初始鲜重为 (1.0 $\pm$ 0.1) g, 鲜重无显著差异( $P>0.05$ ), 培养液体积为 2 L。每隔 3 d 换水 1 次, 培养 15 d 后称量鲜重, 计算相对生长速率(relative growth rate, RGR), 计算公式如下:

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

式中,  $W_0$  为初始藻的鲜重(g),  $W_t$  为实验结束时藻的鲜重(g),  $t$  为实验持续的时间(d)。

**1.2.2 自由丝状体营养藻丝的叶绿素荧光参数测定**

将营养藻丝置于 1.2.1 所述的 4 个不同的铁浓度条件下悬浮培养 15 d 后, 采用调制叶绿素荧光成像系统(IMAGING-PAM, WALZ, 德国)测定其叶绿素荧光诱导曲线, 获得 4 个叶绿素荧光参数: 营养藻丝的光系统 II 最大量子产量  $F_v/F_m$ 、实际量子产量  $Y(\text{II})$ 、调节性能量耗散的量子产量  $Y(\text{NPQ})$  和非调节性能量耗散的量子产量  $Y(\text{NO})$ 。

**1.2.3 贝壳丝状体的叶绿素荧光参数测定** 采果孢子后第 60 天, 贝壳丝状体的营养藻丝布满贝壳且部分变成不定形细胞, 此时, 把每个贝壳分别置于装有不同铁浓度的天然灭菌海水的无菌培养皿(直径 12 cm)中。其他培养条件: 光周期为 10D : 14L, PAR 为 30  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 温度为 20 $^\circ\text{C}$ 。以上每个铁浓度组设置 8 个培养皿, 每个培养皿装 1 个贝壳。采用调制叶绿素荧光成像系统测定培养 30 d 后的贝壳丝状体的叶绿素荧光诱导曲线, 获得叶绿素荧光参数  $F_v/F_m$ 、 $Y(\text{II})$ 、 $Y(\text{NPQ})$  和

$Y(\text{NO})$ 。然后, 每组随机选出 4 个贝壳转换到不添加铁元素的天然灭菌海水中继续培养 15 d 后, 再次测定  $F_v/F_m$  值。每组剩余 4 个贝壳, 用于后续孢子囊枝比例测定实验。

**1.2.4 贝壳丝状体孢子囊枝比例测定** 首先对上述经铁处理 30 d 后的贝壳进行壳面颜色观察, 然后采用柏兰尼液溶壳后进行营养藻丝和孢子囊枝的细胞颜色及孢子囊枝成熟度的显微观察。孢子囊枝细胞的长宽比越趋近 1 : 1, 表明其成熟度越高。华北半叶紫菜营养藻丝细胞呈细长圆柱形, 色素体为侧生带状, 而孢子囊枝为营养藻丝明显增粗变为不定形细胞后再转变而成, 孢子囊枝细胞色素体为深红色星状体, 位于细胞中央。在 400 $\times$ 视野下随机选取 15 个视野进行拍照, 基于上述营养藻丝和孢子囊枝形态上的区别, 结合 ImageJ 软件对图片进行处理, 计算孢子囊枝比例(Varela-Alvarez *et al.*, 2004), 计算公式如下:

$$\text{孢子囊枝比例}=\frac{\text{孢子囊枝面积}}{\text{营养藻丝面积}+\text{孢子囊枝面积}} \times 100\%$$

**1.2.5 丝状体生化检测** 1.2.1 中的藻丝在称重结束后, 立刻用液氮将其快速冷冻并储存在超低温冰箱中, 待进行生化指标的测定。本研究测定的指标包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、超氧阴离子(superoxide anion, SA)、过氧化氢(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、叶绿素 *a* (chlorophyll *a*, Chl-*a*)、类胡萝卜素(carotenoid, Car)、抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)和脯氨酸(proline, Pro)。生化指标检测均采用酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。酶联免疫分析检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行各个指标的测定。每个测量实验均设 4 个平行。生化检测用到的主要仪器为: 352 型酶标仪(Labsystems Multiskan MS, 芬兰), AC8 洗板机(Thermo Labsystems, 芬兰), 电热恒温培养箱(武汉一恒苏净科学仪器有限公司)。

## 1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 数据统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)、Duncan 多重比较及 Pearson 相关性分析,  $P<0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同铁浓度下营养藻丝的相对生长速率

方差分析结果显示, 铁浓度对营养藻丝的相对生

长速率(RGR)有显著影响( $P<0.05$ )。图 1 显示,在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内,随着铁浓度的升高,营养藻丝的 RGR 呈先升高后降低的趋势。营养藻丝在 0.040 mg/L 的铁浓度条件下,其 RGR 显著高于其他铁浓度组( $P<0.05$ )。

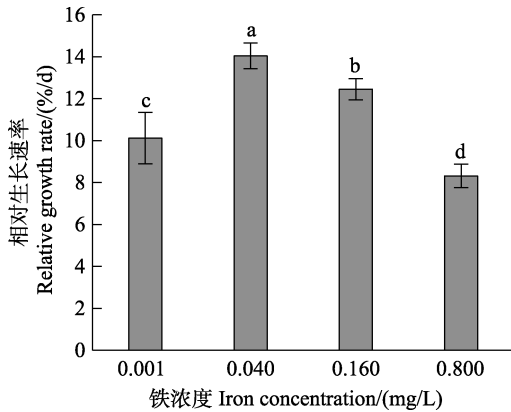


图 1 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的相对生长速率  
Fig.1 Relative growth rate (RGR) of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

## 2.2 不同铁浓度下营养藻丝的叶绿素荧光参数

图 2 显示,在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内,随着铁浓度的升高,营养藻丝的  $F_v/F_m$  呈先升高后降低的趋势。0.040 mg/L 铁浓度处理组的  $F_v/F_m$  显著高于其他铁浓度组( $P<0.05$ )。图 3 显示,在 0.040 mg/L 的铁浓度下,营养藻丝呈现出较高的  $Y(NPQ)$ 、 $Y(II)$

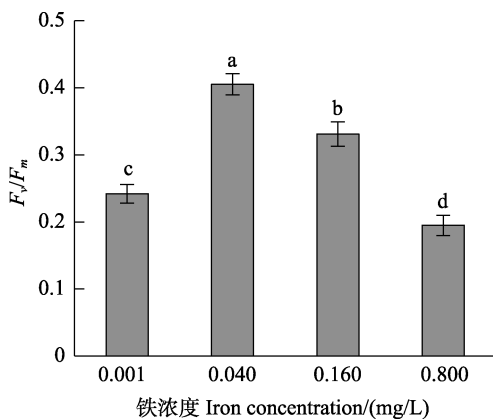


图 2 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的光系统 II 最大量子产量( $F_v/F_m$ )

Fig.2 Maximum quantum yield of of PS II ( $F_v/F_m$ ) of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

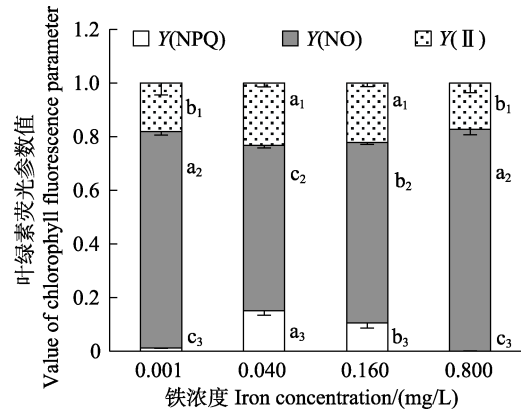


图 3 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的  $Y(NPQ)$ 、 $Y(NO)$ 和  $Y(II)$

Fig.3  $Y(NPQ)$ ,  $Y(NO)$  and  $Y(II)$  of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

和较低的  $Y(NO)$ 。在低铁(0.001 mg/L)或高铁(0.160~0.800 mg/L)浓度条件下, $Y(NPQ)$ 均显著降低( $P<0.05$ )。Pearson 相关性分析表明,营养藻丝的相对生长速率与  $F_v/F_m$  呈显著的正相关关系( $P<0.05$ )。

## 2.3 不同铁浓度下的贝壳丝状体孢子囊枝比例

方差分析结果显示,铁浓度对贝壳丝状体的孢子囊枝比例有显著影响( $P<0.05$ )。图 4 和图 5 显示,在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内,随着铁浓度的升高,孢子囊枝形成率和孢子囊枝成熟度逐渐升高。0.040~0.800 mg/L 的铁浓度组的孢子囊枝比例均显著大于对照组( $P<0.05$ )。随着贝壳丝状体营养藻丝不断发育形成孢子囊枝,壳面颜色逐渐加深(由鲜红变深红)。在壳面外观上,高铁浓度组壳面颜色较深且有明显的藻丝纹路或藻团。

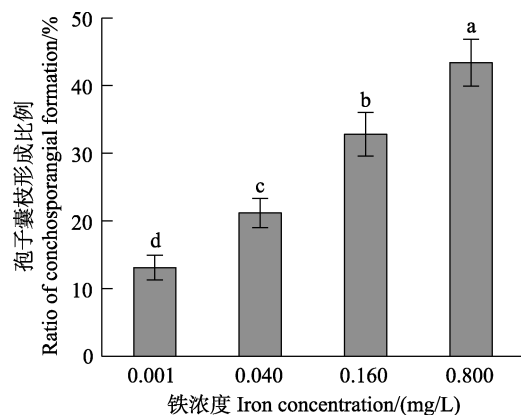


图 4 不同铁浓度条件下培养 30 d 后华北半叶紫菜贝壳丝状体的孢子囊枝形成比例

Fig.4 Ratio of conchosporangial formation of conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 30 days under different iron concentrations

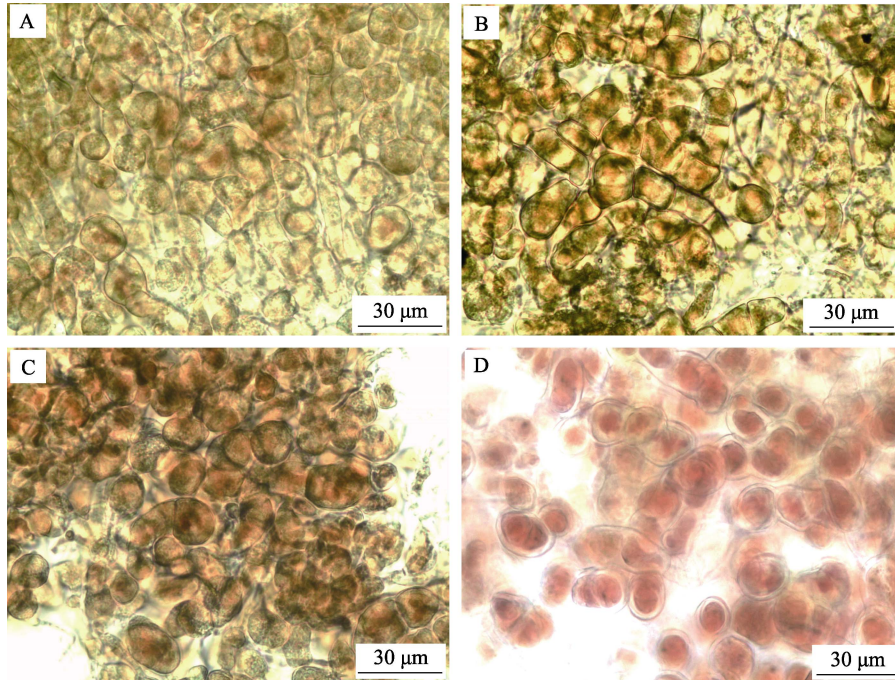


图 5 不同铁浓度条件下培养 30 d 后华北半叶紫菜贝壳丝状体形态特征

Fig.5 Morphological characteristics of conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 30 days under different iron concentrations

A:  $C_{Fe}=0.001$  mg/L; B:  $C_{Fe}=0.040$  mg/L; C:  $C_{Fe}=0.160$  mg/L; D:  $C_{Fe}=0.800$  mg/L

### 2.4 不同铁浓度下贝壳丝状体的叶绿素荧光参数

如图 6 所示, 0.160 和 0.800 mg/L 铁浓度处理组

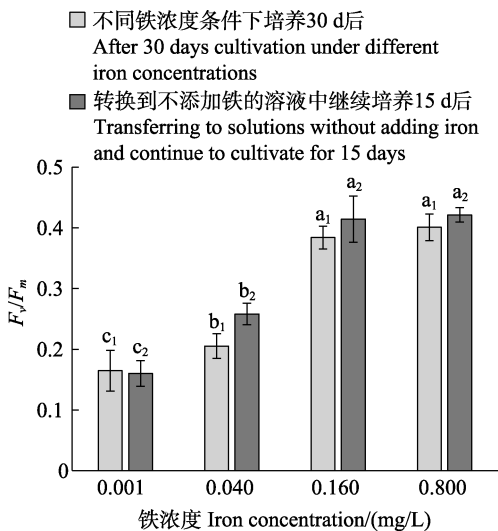


图 6 华北半叶紫菜贝壳丝状体的光系统 II 最大量子产量 ( $F_v/F_m$ )

Fig.6 Maximum quantum yield of of PS II ( $F_v/F_m$ ) of conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla*

柱状图上的字母下标为相同数字的作为同一组进行多重比较, 同一组的不同字母表示在  $P<0.05$  水平具有显著性差异, 下同  
The same subscript number of the letters represent the same group. The measured value in the same group were compared. Different letters in the same group represent significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

的  $F_v/F_m$  之间无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 而这 2 组的  $F_v/F_m$  均显著高于铁浓度  $\leq 0.040$  mg/L 的组 ( $P<0.05$ )。Pearson 相关性分析表明, 贝壳丝状体  $F_v/F_m$  与孢子囊枝比例呈显著的正相关关系 ( $P<0.05$ )。经铁处理 30 d 后的贝壳丝状体  $F_v/F_m$ , 与其转换到不添加铁元素的溶液中继续培养 15 d 后的  $F_v/F_m$  的变化趋势相同, 均呈现为高铁浓度组的  $F_v/F_m$  值较高。图 7 显示, 在 0.160 和 0.800 mg/L 铁浓度条件下, 贝壳丝状体呈现出较高的  $Y(II)$ 、 $Y(NPQ)$  和较低的  $Y(NO)$ 。

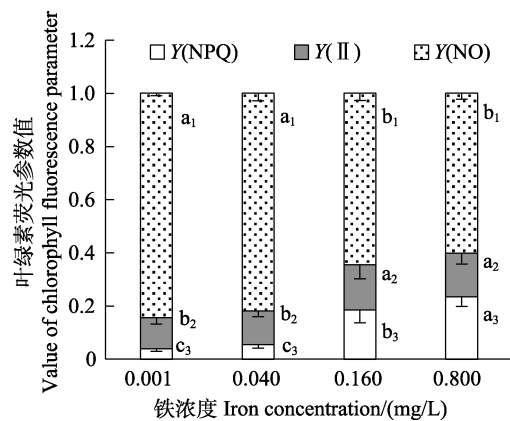


图 7 不同铁浓度条件下培养 30 d 后华北半叶紫菜贝壳丝状体的  $Y(NPQ)$ 、 $Y(NO)$  和  $Y(II)$

Fig.7  $Y(NPQ)$ ,  $Y(NO)$  and  $Y(II)$  of conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 30 days under different iron concentrations

### 2.5 不同铁浓度条件下营养藻丝的活性氧含量

图 8 显示, 铁处理组的 ROS (SA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 含量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内, 随着铁浓度的升高, 营养藻丝的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量呈逐渐升高的趋势。0.040~0.800 mg/L 的铁浓度组的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 SA 含量均显著大于对照组 ( $P < 0.05$ )。

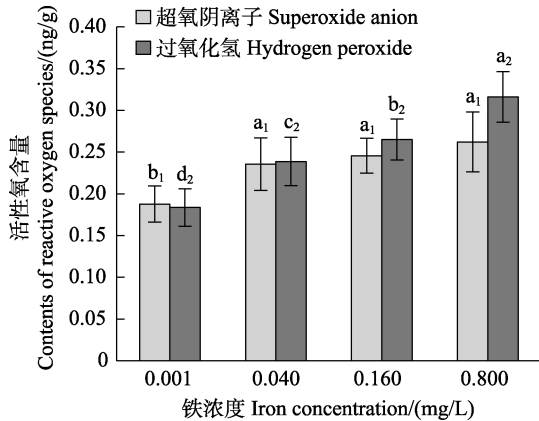


图 8 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的活性氧含量

Fig.8 Reactive oxygen species contents of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

### 2.6 不同铁浓度条件下营养藻丝的抗氧化酶活力

图 9 显示, 铁处理组的 SOD、POD 和 GR 等抗氧化酶活力均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内, 随着铁浓度的升高, POD 活力呈逐渐升高的趋势。在 0.040~0.800 mg/L 的铁浓度范围内, SOD 和 GR 活力均保持在较高水平, 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析表明, 抗氧化酶(SOD、POD 和 GR)活力与活性氧(SA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

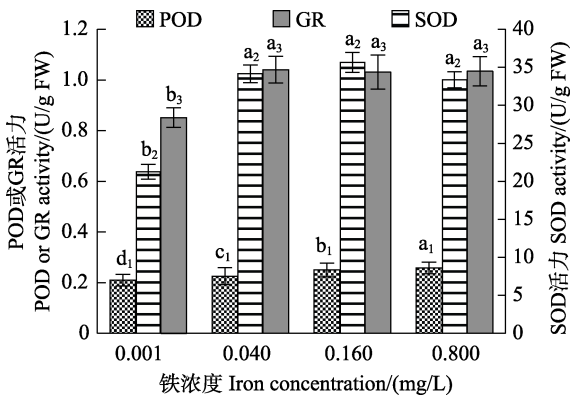


图 9 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的 SOD、POD 和 GR 活力

Fig.9 SOD, POD and GR activities of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

含量均呈显著的正相关关系 ( $P < 0.05$ )。

### 2.7 不同铁浓度条件下营养藻丝的一类胡萝卜素和叶绿素 a 含量

图 10 显示, 在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内, 随着铁浓度的升高, 类胡萝卜素含量呈逐渐升高的趋势, 而叶绿素 a 含量呈逐渐降低的趋势。0.160 mg/L 和 0.800 mg/L 铁浓度组的类胡萝卜素含量显著高于低铁浓度组 ( $C_{Fe} \leq 0.040$  mg/L) ( $P < 0.05$ )。0.040~0.800 mg/L 铁浓度范围内的 3 个处理组的叶绿素 a 含量均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析表明, 类胡萝卜素含量与 ROS 含量呈显著的正相关关系 ( $P < 0.05$ )。

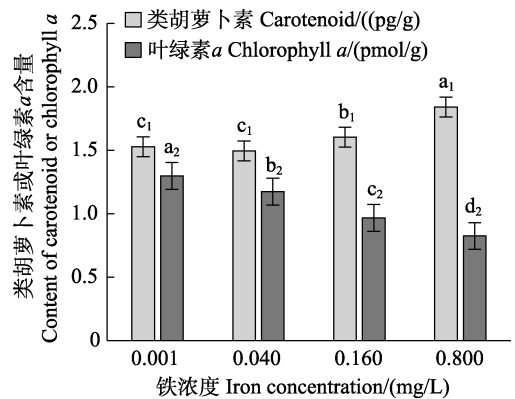


图 10 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的一类胡萝卜素和叶绿素 a 含量

Fig.10 Contents of carotenoid and chlorophyll a of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations

### 2.8 不同铁浓度条件下营养藻丝的 AsA 和 Pro 含量

图 11 显示, 在 0.001~0.800 mg/L 铁浓度范围内, 随着铁浓度的升高, AsA 含量呈先升高后降低的趋势,

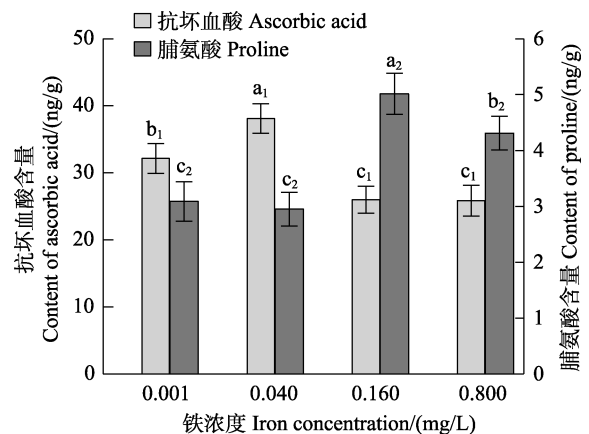


图 11 不同铁浓度条件下培养 15 d 后华北半叶紫菜营养藻丝的一类胡萝卜素和脯氨酸含量

Fig.11 Contents of ascorbic acid and proline of vegetative conchocelis of *P. katadae* var. *hemiphylla* cultivated for 15 days under different iron concentrations



而 Pro 含量呈逐渐升高的趋势。0.040 mg/L 铁浓度组的 AsA 含量显著高于其他铁浓度组( $P < 0.05$ )。0.160 和 0.800 mg/L 铁浓度组的 Pro 含量显著高于低铁浓度组( $C_{Fe} \leq 0.040$  mg/L)( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析表明, Pro 含量与 ROS 含量呈显著的正相关关系( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

光合能力的强弱与光合器官 PS II 活性及电子传递有关,可由叶绿素荧光参数反映。经过充足暗适应后测出的  $F_v/F_m$  反映了当时所有的 PS II 反应中心均处于开放态时的量子产量,即植物的潜在最大光合能力,是反映植物光能转换效率的指标(张守仁, 1999)。Y(NPQ)代表的是通过调节性的光保护机制耗散为热的能量,而 Y(NO)代表的是被动的耗散为热量和发出荧光的能量,若 Y(NPQ)较高,说明藻细胞具有较高的光保护能力(Klughammer *et al.*, 2008)。图 1、图 2 和图 3 显示,在 0.040 mg/L 铁浓度条件下,华北半叶紫菜自由丝状体营养藻丝的 RGR、 $F_v/F_m$  和 Y(NPQ)相对较高,而 Y(NO)相对较低。由此推测,0.040 mg/L 铁浓度促进了营养藻丝的光能转换效率及光保护能力的提高,并利于其生长。图 7 显示,在 0.160~0.800 mg/L 铁浓度范围内,华北半叶紫菜贝壳丝状体呈现较高的 Y(NPQ)和较低的 Y(NO),暗示该铁浓度范围下,贝壳丝状体可发挥调节性的光保护机制以减少过剩光能的伤害,而低铁条件下( $C_{Fe} \leq 0.040$  mg/L)的贝壳丝状体则是以非调节性能量耗散机制为主。图 6 显示,无论是铁处理 30 d 后的贝壳丝状体(孢子囊枝比例显著增加),还是经铁处理 30 d 后再转换到不添加铁元素的溶液中继续培养 15 d 后的贝壳丝状体,其  $F_v/F_m$  的变化趋势相同,表明贝壳丝状体光能转换效率的高低与其孢子囊枝比例的大小呈正相关关系。对条斑紫菜自由丝状体的研究也发现(魏家慧等, 2020),条斑紫菜孢子囊枝的  $F_v/F_m$  及光合速率均显著高于营养藻丝。研究表明,相对于营养藻丝,孢子囊枝中的藻胆蛋白等捕光色素含量的显著增加及碳水化合物和蛋白质的比值明显上升(陈焯等, 2007),这可能是孢子囊枝光合性能显著提升的原因之一。

一方面,铁作为酶和氧化还原蛋白的辅助因子,在一些生物过程中起着重要的催化作用。植物缺铁时,许多酶的活性将受到影响,进而影响到植物体内的氧化还原反应、电子的传递、营养盐的吸收、呼吸作用、ATP 合成等,最终影响植物的生长发育(Hudson *et al.*, 1990; 金亚波等, 2007; Raven, 1988)。另一方面,过量的铁则可对植物造成伤害,这种伤害往往是由铁

离子介导的 ROS 导致的,大量羟自由基可通过铁离子的相关反应(Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应)产生(Foundations, 1995; 汪洪等, 2006)。本研究中,随着铁浓度的升高,  $H_2O_2$  含量呈逐渐升高的趋势,超氧阴离子水平也维持在高水平,表明添加铁元素后华北半叶紫菜营养藻丝的活性氧水平显著升高。随着铁浓度的升高,营养藻丝的 RGR 呈先升高后降低的趋势,表明当铁离子浓度较低时,铁促进了藻丝的营养生长,而高铁浓度对营养藻丝形成了氧化胁迫,抑制其生长。植物的营养生长状态和发育状态之间存在着相互依存、相互制约的辩证统一关系(周德超, 1984)。对于华北半叶紫菜贝壳丝状体来说,其藻丝营养生长与孢子囊枝形成也存在拮抗关系。本研究发现,随着铁浓度的升高,贝壳丝状体孢子囊枝形成率逐渐升高。由此推测,高铁浓度促进了华北半叶紫菜贝壳丝状体由营养生长状态向发育状态的转变。在关于褐藻配子体发育的研究中也有类似发现(Lewis *et al.*, 2013; Motomura *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1994; 王潇等, 2020),铁往往表现为促进褐藻配子体的发育,在铁限制时,不同的大型褐藻配子体发育率均有不同程度的下降,甚至维持在营养生长状态。值得一提的是,在实验周期内,0.160~0.800 mg/L 的铁浓度未能促进华北半叶紫菜自由丝状体的营养藻丝向孢子囊枝转变,因此,铁元素对自由丝状体的发育诱导条件还有待进一步探索。另外,延长培养时间后发现,华北半叶紫菜贝壳丝状体孢子囊枝形成率可继续提高(60 d 后,0.800 mg/L 组孢子囊枝比例可达 75%以上),而增加铁浓度至 2.400 mg/L 时,在同样培养条件下培养 30 d 后的孢子囊枝形成率与 0.800 mg/L 铁浓度组相比并无显著差异(数据未发表)。

ROS 在植物的许多生命过程中均具有有害(导致细胞氧化损伤)和有利(信号转导、调控发育、防卫作用等)双重功能(Chen *et al.*, 2014; 林植芳等, 2012; 薛鑫等, 2013)。发挥信号转导和调控发育的功能需要达到一定 ROS 浓度,如在植物种子休眠和萌发的大量研究中发现,在外因(如温度、水分)和内因(如激素与 ROS 等信号分子的交互应答)的共同作用下,种子才能萌发(Chen *et al.*, 2014)。ROS 浓度处于一定范围内是种子成功萌发所必需的条件,该 ROS 浓度范围被称为萌发的“氧化窗口”(Bailey *et al.*, 2008)。研究发现,添加  $H_2O_2$  的氧化应激可促进条斑紫菜放散单孢子(Takahashi *et al.*, 2017),表明 ROS 对于紫菜细胞由营养状态向发育状态的转变发挥着关键的作用。综上可推测,本研究中的贝壳丝状体藻丝在高铁浓度的作用下,由营养生长状态向发育状态的转变可能与铁介



导的 ROS 密切相关, 即铁介导的 ROS 可能开启了藻丝发育的“氧化窗口”。

在发育的“氧化窗口”内, ROS 可能通过与激素信号通路相互作用或触发与 ROS 信号相关的细胞事件(如基因表达、钙离子的运动或氧化还原状态的控制)而发挥作用。“氧化窗口”之下(ROS 过少), 发育受到抑制, “氧化窗口”之上(ROS 过多), 细胞则可能发生氧化损伤, 导致发育延迟(Bailly *et al*, 2008)。因此, 需要严格调控贝壳丝状体营养藻丝向孢子囊枝转变过程来平衡 ROS 的产生和清除, 而抗氧化系统是维持这种平衡的关键。抗氧化系统分为酶促抗氧化系统(抗氧化酶)和非酶促抗氧化系统(包括类胡萝卜素、抗坏血酸、脯氨酸、维生素 E 等抗氧化分子)(尹永强等, 2007)。SOD 是生物体内特异清除超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )的酶, 其与  $O_2^-$  反应产生  $H_2O_2$  和  $O_2$ , 是抗氧化的第 1 道保护层; POD 是以  $H_2O_2$  为电子受体催化底物氧化的酶, 即 POD 可消除  $H_2O_2$ ; 叶绿体中  $H_2O_2$  的清除主要是通过 Halliwell-Asada 途径进行的, 该途径主要是由抗坏血酸过氧化物酶(APX)和 GR 等抗氧化酶发挥关键作用(阎成士等, 1999)。本研究中, SOD、POD 和 GR 活力与活性氧(SA 和  $H_2O_2$ )含量均呈显著的正相关关系, 表明 SOD、POD 和 GR 等抗氧化酶对于华北半叶紫菜丝状体中清除活性氧从而降低氧化伤害发挥着关键作用。类胡萝卜素可直接猝灭单线态氧或通过猝灭三线态叶绿素而阻止单线态氧的形成, 从而消除单线态氧对光合结构的破坏(郭连旺等, 1996; 尹永强等, 2007)。AsA 也称维生素 C, 是植物中广泛存在的一种水溶性抗氧化有机小分子, 可作为某些还原酶的辅因子参与还原反应(石永春等, 2015), 还可参与植物光合结构保护、糖代谢和胁迫响应等多种生理调控过程(Garchery *et al*, 2013; Tóth *et al*, 2013)。Pro 是水溶性最大的氨基酸, Pro 的积累是藻类及高等动植物在各种生物和非生物胁迫下常见的生理反应, 其可行使渗透调节、抗氧化和分子伴侣等生理功能(Delauney *et al*, 1993; Szabados *et al*, 2010)。另外, 植物在从营养生长向生殖生长转变时可在不同的组织或器官中明显积累 Pro, 这时 Pro 可作为生长发育信号, 促进细胞的分裂与分化(Lehmann *et al*, 2010; Szabados *et al*, 2010; 谢虹等, 2011)。本研究发现, 当铁浓度升高到 0.160 mg/L 以上时, 藻丝类胡萝卜素和 Pro 含量均显著增加, 且类胡萝卜素和 Pro 含量与 ROS 含量均呈显著的正相关关系, 表明类胡萝卜素和 Pro 在藻丝适应高铁浓度胁迫过程中均发挥着关键的活性氧清除作用。AsA 含量随着铁浓度的增加呈先升高后降低的趋势, 表明较高铁浓度下可能不

利于 AsA 发挥其生理功能。本研究中, 添加铁后, 藻丝中叶绿素 *a* 含量显著减少, 一方面可能与 ROS 对叶绿体的破坏有关, 另一方面也可能为了减少光吸收、避免光过量, 从而降低光氧化伤害(Foyer *et al*, 1994)。综上可推测, 华北半叶紫菜丝状体的酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统均可对铁胁迫逆境作出积极应答, 它们相互辅助并通过严格的调控来平衡 ROS 的产生和清除。

目前, 为促进条斑紫菜或坛紫菜的贝壳丝状体从营养生长状态进入发育状态(孢子囊枝形成), 一般需要升温( $>20^\circ C$ )(何培民等, 2018; 赵素芬, 2012)。高温环境下的贝壳极易滋生细菌及发生杂藻附着等病害问题, 需要经常洗刷贝壳及养殖池, 耗费较多的人力、物力和财力。因此, 从营养藻丝发育为孢子囊枝若能摆脱“升温”的限制且使孢子囊枝快速形成, 将对紫菜贝壳丝状体人工育苗产生重要的经济意义。本研究探明了适宜华北半叶紫菜藻丝营养生长的铁浓度, 及通过铁元素的诱导, 营养藻丝在不升温的情况下短时间内同步形成孢子囊枝, 该研究结果对华北半叶紫菜贝壳丝状体培育过程中铁营养的运用具有重要的指导意义。华北半叶紫菜营养藻丝的快速生长及孢子囊枝的快速形成, 可保证及时获得足够量的藻丝应用于生产上的贝壳接种, 并可适时获得发育同步的贝壳丝状体, 从而提高华北半叶紫菜的采苗效率。

## 参 考 文 献

- BAILLY C, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, CORBINEAU F. From intracellular signaling networks to cell death: The dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 2008, 331(10): 806–814
- CHEN C, TWITO S, MILLER G. New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient Arabidopsis seeds. *Plant Signaling and Behavior*, 2014, 9(12): e976489
- CHEN Y, PEI L Q, YAN X J, *et al*. Changes of chemical components during sporangial branchlets formation of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Marine Sciences*, 2007, 25(2): 23–28 [陈烨, 裴鲁青, 严小军, 等. 坛紫菜孢子囊枝形成过程中生化组分的变化. *海洋学研究*, 2007, 25(2): 23–28]
- CHEN Y, PEI L Q, YAN X J, *et al*. Effects of phosphorus on sporangial branchlets formation of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Aquaculture*, 2005, 26(5): 1–4 [陈烨, 裴鲁青, 严小军, 等. 磷对坛紫菜孢子囊枝形成的影响. *水产养殖*, 2005, 26(5): 1–4]
- DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 1993, 4(2):

- 215–223
- FOUNDATION T B N. Iron. Netherlands: Springer, 1995
- FOYER C H, LELANDAI S M, KUNERT K J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 1994, 92(4): 696–717
- FRAZER A W J, BROWN M T. Growth of the conchocelis phase of *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) at different temperatures and levels of light, nitrogen and phosphorus. *Phycological Research*, 1995, 43(4): 249–253
- GARCHERY C, GEST N, DO P T, *et al.* A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell and Environment*, 2013, 36(1): 159–175
- GEIDER R J, LA ROCHE J. The role of iron in phytoplankton photosynthesis, and the potential for iron-limitation of primary productivity in the sea. *Photosynthesis Research*, 1994, 39(3): 275–301
- GUO L W, SHEN Y G. Protective mechanisms against photodamage in photosynthetic apparatus of higher plants. *Plant Physiology Communications*, 1996, 32(1): 1–8 [郭连旺, 沈允钢. 高等植物光合机构避免强光破坏的保护机制. *植物生理学通讯*, 1996, 32(1): 1–8]
- HE P M, YARISH C. The developmental regulation of mass cultures of free-living conchocelis for commercial net seeding of *Porphyra leucosticta* from Northeast America. *Aquaculture*, 2006, 257(1/2/3/4): 373–381
- HE P M, ZHANG Z Y, ZHANG X C, *et al.* Seaweed cultivation. Beijing: Science Press, 2018 [何培民, 张泽宇, 张学成, 等. 海藻栽培学. 北京: 科学出版社, 2018]
- HUANG H Z. Preliminary study on the turnover culture technique of *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015, 37(3): 256–260 [黄惠珍. 坛紫菜翻转式养殖技术初探. *福建水产*, 2015, 37(3): 256–260]
- HUDSON R J M, MOREL F M M. Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnology and Oceanography*, 1990, 35(5): 1002–1020
- JIN Y B, WEI J Y, WANG J. Research progress on the physiological and biochemical of iron nutrition in plants. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(32): 10215–10219 [金亚波, 韦建玉, 王军. 植物铁营养研究进展 I: 生理生化. *安徽农业科学*, 2007, 35(32): 10215–10219]
- KLUGHAMMER C, SCHREIBER U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes*, 2008, 1: 27–35
- KNOOP J, GRIFFIN J N, BARRENTO S. Cultivation of early life history stages of *Porphyra dioica* from the British Isles. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32: 459–471
- KOBAYASHI T, NISHIZAWA N K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63(1): 131–152
- LEHMANN S, FUNCK D, SZABADOS L, *et al.* Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 2010, 39(4): 949–962
- LEWIS R J, GREEN M K, AFZAL M E. Effects of chelated iron on oogenesis and vegetative growth of kelp gametophytes (Phaeophyceae). *Phycological Research*, 2013, 61(1): 46–51
- LI X S, YANG L, HE P M. Formation and growth of free-living conchosporangia of *Porphyra yezoensis*: Effects of photoperiod, temperature and light intensity. *Aquaculture Research*, 2011, 42(8): 1079–1086
- LIN R L, STEKOLL M S. Responses of chlorophyll *a* content for conchocelis phase of Alaskan *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) species to environmental factors. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 2013, 1(1): 28–39
- LIN Z F, LIU N. Research progress in the control and regulation of plant growth and development by reactive oxygen species. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(1): 74–86 [林植芳, 刘楠. 活性氧调控植物生长发育的研究进展. *植物学报*, 2012, 47(1): 74–86]
- LIU J W, DONG S L, FENG L J. Physiological and ecological response of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* to iron stress. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(2): 167–175 [刘静雯, 董双林, 冯丽洁. 细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*)铁限制的生理生态学反应. *海洋与湖沼*, 2004, 35(2): 167–175]
- LÓPEZ-VIVAS J M, RIOSMENA-RODRÍGUEZ R, JIMÉNEZ-GONZÁLEZ DE LA LLAVE A A, *et al.* Growth and reproductive responses of the conchocelis phase of *Pyropia hollenbergii* (Bangiales, Rhodophyta) to light and temperature. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27: 1561–1570
- LU S, YARISH C. Interaction of photoperiod and temperature in the development of conchocelis of *Porphyra purpurea* (Rhodophyta: Bangiales). *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(1): 89–96
- MANLEY S L. Iron uptake and translocation by *Macrocystis pyrifera*. *Plant Physiology*, 1981, 68(4): 914–918
- MONOTILLA W D, NOTOYA M. Growth and development of *Porphyra marcosii* (Bangiales, Rhodophyta) under different temperatures and photoperiod. *Philippine Journal of Science*, 2010, 139(2): 197–206
- MOTOMURA T, SAKAI Y. Regulation of gametogenesis of *Saccharina* and *Desmarestia* (Phaeophyta) by iron and boron. *Journal of Phycology*, 1984, 32(3): 209–215
- PEREIRA R, SOUSA-PINTO I, YARISH C. Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Phycologia*, 2004, 43(6): 756–767
- RAVEN J A. The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytologist*, 1988, 109(3): 279–287
- SHEN S D, DAI J X. The influence of Fe<sup>2+</sup> on growth and development of cells enzymatically isolated from *Porphyra yezoensis* blades. *Chinese Journal of Oceanology and*

- Limnology, 2005, 23(1): 48–53
- SHI Y C, YANG Y Y, XUE R L, *et al.* Research advance of biological function of ascorbic acid in plants. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(1): 1–8 [石永春, 杨永银, 薛瑞丽, 等. 植物中抗坏血酸的生物学功能研究进展. *植物生理学报*, 2015, 51(1): 1–8]
- SUZUKI Y, KUMA K, KUDO I, *et al.* Iron requirement of the brown macroalgae *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) and the crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* (Rhodophyta), and their competition in the northern Japan Sea. *Phycologia*, 1995, 34(3): 201–205
- SUZUKI Y, KUMA K, MATSUNAGA K. Effect of iron on oogonium formation, growth rate and pigment synthesis of *Laminaria japonica* (Phaeophyta). *Fisheries Science*, 1994, 60(4): 373–378
- SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 89–97
- TAKAHASHI M, MIKAMI K. Oxidative stress promotes asexual reproduction and apogamy in the red seaweed *Pyropia yezoensis*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 26
- TANG X R, FEI X G. Artificial culture from conchocelis to conchosporelings of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(2): 180–185 [汤晓荣, 费修纆. 半叶紫菜华北变种的丝状体成苗研究. *海洋与湖沼*, 1999, 30(2): 180–185]
- TANG X R, FEI X G. Effects of light and temperature on the growth and development of *Porphyra conchocelis*. *Marine Sciences*, 1998(4): 44–46 [汤晓荣, 费修纆. 光温对紫菜丝状体生长发育的影响. *海洋科学*, 1998(4): 44–46]
- TÓTH S Z, SCHANSKER G, GARAB G. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, 2013, 148(2): 161–175
- TSENG C K. Common seaweeds of China. Beijing: Science Press, 1983
- VARELA-ALVAREZ E, STENGEL D B, GUIRY M D. The use of image processing in assessing conchocelis growth and conchospore production in *Porphyra linearis*. *Phycologia*, 2004, 43(3): 282–287
- WANG W J, SUN X T, LIU F L, *et al.* Effect of abiotic stress on the gametophyte of *Pyropia katadae* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 469–479
- WANG H, JIN J Y. Possible effects of iron, magnesium and zinc on the metabolism of reactive oxygen species in plants. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12(5): 738–744 [汪洪, 金继运. 铁、镁、锌营养胁迫对植物体内活性氧代谢影响机制. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(5): 738–744]
- WANG S P, JIANG H R. Studies on the ecology of free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Marine Fisheries Research*, 1983, 14(5): 77–94 [王素平, 姜红如. 条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* 游离丝状体生态的研究. *海洋水产研究*, 1983, 14(5): 77–94]
- WANG X, LIU F L, LIANG Z R, *et al.* Effects of iron on the growth and development of gametophyte clones in *Saccharina japonica*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(9): 1052–1061 [王潇, 刘福利, 梁洲瑞, 等. 铁离子对海带配子体克隆系生长发育的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(9): 1052–1061]
- WANG Y X, WANG M M, XIA D M, *et al.* Photosynthetic characteristics during the formation of reproductive tissues of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla*. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2011, 34(3): 95–102 [王云霞, 王苗苗, 夏洞明, 等. 华北半叶紫菜繁殖组织形成期间的的光合特性研究. *南京师大学报(自然科学版)*, 2011, 34(3): 95–102]
- WEI J H, LI G L, WANG W J, *et al.* Effects of light intensity and temperature on photosynthetic adaptability of the different stages of *Pyropia yezoensis* free-living conchocelis. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 115–124 [魏家慧, 李国梁, 汪文俊, 等. 条斑紫菜丝状体不同发育时期对光照和温度的光合适应能力. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 115–124]
- XIE H, YANG L, LI Z G. The roles of proline in the formation of plant tolerance to abiotic stress. *Biotechnology Bulletin*, 2011(2): 23–27, 60 [谢虹, 杨兰, 李忠光. 脯氨酸在植物非生物胁迫耐性形成中的作用. *生物技术通报*, 2011(2): 23–27, 60]
- XUE X, ZHANG Q, WU J X. Research of reactive oxygen species in plants and its application on stress tolerance. *Biotechnology Bulletin*, 2013(10): 6–11 [薛鑫, 张芊, 吴金霞. 植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用. *生物技术通报*, 2013(10): 6–11]
- YAN C S, LI D Q, ZHANG J H. Plant leaf senescence and oxidative stress. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 398–404 [阎成士, 李德全, 张建华. 植物叶片衰老与氧化胁迫. *植物学通报*, 1999, 16(4): 398–404]
- YIN Y Q, HU J B, DENG M J. Latest development of antioxidant system and responses to stress in plant leaves. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(1): 105–110 [尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展. *中国农学通报*, 2007, 23(1): 105–110]
- ZHANG M R, LU Q Q, XU G P. The present situation of *Porphyra* industry and prospects on its healthy development. *China Fisheries*, 2012(11): 15–19 [张美如, 陆勤勤, 许广平. 条斑紫菜产业现状及对其健康发展的思考. *中国水产*, 2012(11): 15–19]
- ZHANG S R. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 444–448 [张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. *植物学通报*, 1999, 16(4): 444–448]
- ZHAO C N, WU Y L, CAI Z Q, *et al.* Experimental study on deep-water rollover type cultivation of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(11): 107–109 [赵春暖, 吴远亮, 蔡忠强, 等. 紫菜深水翻台式养殖试验研究. *安徽农业科学*, 2020, 48(11): 107–109]
- 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 S F. Marine algae and algal culture science. Beijing: National Defence Industry Press, 2012 [赵素芬. 海藻与海藻栽培学. 北京: 国防工业出版社, 2012]
- ZHOU C Y, WU G L, DUAN Z Q, *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NOX system: An important mechanism for developmental regulation and stress response in plants. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(5): 615–631 [周丛义, 吴国利, 段壮芹, 等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NOX 系统: 一种植物体内重要的发育调控与胁迫响应机制. 植物学报, 2010, 45(5): 615–631]
- ZHOU D C. Vegetative and reproductive growth of plants. Bulletin of Biology, 1984, (6): 5–6 [周德超. 植物的营养生长和生殖生长. 生物学通报, 1984, (6): 5–6]

(编辑 马璀艳)

## Iron Promotes the Growth and Development of *Conchocelis* of *Pyropia katadae* var. *hemiphylla* and Its Physiological and Biochemical Bases

LIANG Zhouhui<sup>1,2</sup>, WANG Wenjun<sup>1,2</sup>, LIU Fuli<sup>1,2</sup>①, ZHANG Pengyan<sup>1,2</sup>,  
YUAN Yanmin<sup>1</sup>, YAO Haiqin<sup>1</sup>, SUN Xiutao<sup>1,2</sup>, WANG Feijiu<sup>1</sup>

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

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

**Abstract** *Pyropia katadae* var. *hemiphylla* is an important *Pyropia* species in China. Increasing consumer demand for *P. katadae* var. *hemiphylla* has led to its commercial breeding and floating raft cultivation in Jiangsu Province and Shandong Province in China in the past two years. However, it remains to be determined what the optimum iron concentrations for the growth of conchocelis and conchosporangial formation of *P. katadae* var. *hemiphylla* are and to understand the physiological and biochemical adaptability to different iron concentrations. Therefore, relative growth rate, ratio of conchosporangial formation, and physiological and biochemical indexes (including chlorophyll fluorescence parameters, contents of reactive oxygen species, contents of antioxidant, and activities of antioxidant enzymes) under different iron concentrations were studied. From the results of these experiments, the main conclusions are as follows: Growth, maximum photochemical efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), and quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in photosystem II [ $Y(NPQ)$ ] of *P. katadae* var. *hemiphylla* increased significantly at an iron concentration of 0.040 mg/L, suggesting that this iron concentration improved the photosynthetic efficiency and photoprotective efficiency of vegetative conchocelis. Relative growth rate (RGR) decreased significantly in groups with high iron concentrations (0.160–0.800 mg/L), while the ratio of conchosporangial formation increased significantly at high iron concentrations. These results indicate that high iron concentrations inhibited the vegetative growth of conchocelis, while promoting the transition from vegetative growth state to developmental state. There was a significant positive correlation between the ratio of conchosporangial formation and  $F_v/F_m$ , indicating that the photosynthetic efficiency of conchocelis was significantly improved after the transformation of vegetative conchocelis to conchosporangia filaments. The addition of iron resulted in significant accumulation of reactive oxygen species (ROS) in conchocelis. The contents of carotenoids and proline, and the activities of SOD, POD, and GR in *P. katadae* var. *hemiphylla* may have increased so that the ROS level was reduced under high iron stress, thus balancing ROS production and ROS clearance. These results can provide a theoretical basis for the application of iron nutrition in the cultivation of *P. katadae* var. *hemiphylla*.

**Key words** *Pyropia katadae* var. *hemiphylla*; Iron; Growth; Conchosporangial formation; Chlorophyll fluorescence parameters; Biochemical characteristics

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210108004

http://www.yyxxjz.cn/

郭宏慧, 杨方, 高沛, 余达威, 许艳顺, 姜启兴, 夏文水. 不同养殖水域中华绒螯蟹滋味差异分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 215-227

GUO H H, YANG F, GAO P, YU D W, XU Y S, JIANG Q X, XIA W S. Analysis of flavor compounds of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) from different regions. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 215-227

## 不同养殖水域中华绒螯蟹滋味差异分析\*



郭宏慧<sup>1,2</sup> 杨方<sup>1,2①</sup> 高沛<sup>1,2</sup> 余达威<sup>1,2</sup>  
许艳顺<sup>1,2</sup> 姜启兴<sup>1,2</sup> 夏文水<sup>1,2①</sup>

(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** 本研究分析不同水域中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)可食率和滋味差异,以期挖掘消费者不同偏好性的内在原因提供参考。选取阳澄湖、固城湖、太湖和兴化大闸蟹为研究对象,测定可食率、整体滋味轮廓、滋味相关指标。结果显示,太湖蟹可食率最高,雄蟹为(33.08±0.31)%,雌蟹为(37.65±1.09)%;在整体滋味轮廓方面,阳澄湖、固城湖蟹相似,甜味强度较高,而太湖、兴化蟹相似,鲜味强度更高,但苦涩味强度也较高;在游离氨基酸组成和含量方面,阳澄湖蟹可食部位、雄蟹蟹肉、雌蟹蟹肉、蟹黄中的甜味氨基酸含量最高,分别为(676.65±1.30)、(899.00±2.88)、(950.34±4.78)和(309.86±0.73) mg/100 g,太湖蟹可食部位、雄蟹蟹肉的鲜味氨基酸含量最高,分别为(98.06±4.07)和(123.76±6.72) mg/100 g,且太湖蟹可食部位、雄蟹蟹肉味精当量值(EUC)也最高,分别为(11.62±0.66)和(15.29±2.58) g MSG/100 g;总游离脂肪酸中,湖泊养殖阳澄湖蟹、固城湖蟹、太湖蟹要高于池塘养殖兴化蟹。研究表明,不同养殖水域的大闸蟹可食率和滋味存在一定差异,太湖蟹可食率最高;阳澄湖蟹整体甜味属性最强,而太湖蟹整体更加鲜美却伴有一定的苦涩味;鲜味特征在阳澄湖和固城湖雌蟹的蟹肉和蟹黄、太湖蟹和兴化蟹雄蟹的蟹肉和蟹膏中强度也较大。

**关键词** 中华绒螯蟹;不同养殖水域;可食率;整体滋味轮廓;游离氨基酸;呈味核苷酸;游离脂肪酸

中图分类号 TS254.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0215-13

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),又名大闸蟹、河蟹、淡水蟹,因其营养丰富、风味独特,深受消费者的喜爱。据《中国渔业统计年鉴 2020》统计,蟹类(专指河蟹)产量逐年增长,从 2009 年的 57.42 万 t 增加到 2019 年的 77.87 万 t,而仅江苏省河蟹产量就达到了 36.48 万 t,位居全国第一,超出排名第二的省份(湖北省产量 15.87 万 t)一倍有余,具有较高的经济价值(农业农村部渔业渔政管理局, 2020)。目前,市场

上涌现了很多区域化中华绒螯蟹品牌,但品牌特点没有区分依据,消费者对不同品牌蟹的产品特性及区域特色的关注度越来越高,选择优质中华绒螯蟹已逐渐成为大众消费观念和消费文化。通过市场、网络搜索调查发现,江苏省中华绒螯蟹产区主要集中在阳澄湖、固城湖、太湖和兴化,且这些均是全国知名品牌地理标志中华绒螯蟹(陈加, 2009)。

中华绒螯蟹之所以鲜美,是因为它的含氮化合物

\* 江苏省三新工程项目(Y2018-25)资助 [This work was supported by Jiangsu Fisheries Administrator (Y2018-25)].  
郭宏慧, E-mail: ghh0426@126.com

① 通讯作者: 杨方, 副研究员, E-mail: yangfang\_8\_9@126.com; 夏文水, 教授, E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn  
收稿日期: 2021-01-08, 收修改稿日期: 2021-02-07



(游离氨基酸、核苷酸、有机碱等)和非含氮化合物(无机物、有机酸、糖类等),其中,对其滋味最重要的是游离氨基酸(FAA)和核苷酸(张家奇等,2017);蟹膏、蟹黄含有丰富的脂肪(吴娜,2017),且游离脂肪酸(FFA)是重要的风味前体物质和滋味物质,因而也是滋味评价中的一个重要指标(邓文辉等,2012)。近年来,对中华绒螯蟹的滋味研究主要集中在不同规格、可食部位、加工方式等,而对不同养殖水域、品牌蟹的研究却很少,上海海洋大学和江南大学对中华绒螯蟹研究较多,主要集中在阳澄湖蟹和崇明蟹(顾吉萍,2009;郑海波,2008;张娜,2008;李楠,2017)。

本研究首先测定阳澄湖、固城湖、太湖和兴化蟹的可食部位得率;之后,利用电子舌测定不同养殖水域蟹的可食部位滋味轮廓,并根据可食率比值作为权重,进而获取不同水域蟹的整蟹可食部位滋味差异;再具体分析滋味物质 FAA、呈味核苷酸、FFA,计算味道活度值(TAV)和味精当量(EUC),对重要滋味贡献物质评价,为中华绒螯蟹食用及品质评价和消费者喜好性原因提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要原料

中华绒螯蟹(阳澄湖、固城湖、太湖、兴化),由江苏无锡大湖水产产业研发中心提供,雌蟹(150.0±7.5)g和雄蟹(200.0±8.2)g于2019年10月至11月捕捞。沸水蒸15 min熟制,剥离雄/雌蟹肉(体肉、爪肉、螯肉)、蟹膏(雄蟹肝胰腺和性腺)、蟹黄(雌蟹肝胰腺和性腺)。分别混匀装袋,冻藏于-60℃冰箱中,待测。

### 1.2 主要试剂和设备

核苷酸(AMP、GMP、IMP、Hx、HxR)、十三烷酸甲酯标准品购于Sigma公司,美国;三氯乙酸、高氯酸、磷酸、磷酸二氢钾、十二水磷酸氢二钾、氢氧化钠(均为分析纯)等均购于上海国药集团化学试剂有限公司;氨基小柱,上海安普试剂公司。

主要设备包括:MDF-U53V型超低温冰箱(SANYO,日本);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(Sigma,德国);Agilent 1100氨基酸分析仪(Agilent,美国);Waters e2695高效液相色谱仪(Waters,美国);SA402B电子舌(INSENT,日本);GC-2010气相色谱仪(岛津,日本);T10均质机(IKA,德国)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 可食率测定和整体滋味差异分析权重确定

$$\text{蟹肉指数}(\%) = \text{蟹肉重}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{蟹膏指数}(\%) = \text{蟹膏重}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{蟹黄指数}(\%) = \text{蟹黄重}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g}) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{雄蟹可食率}(\%) = \text{蟹肉指数}(\%) + \text{蟹膏指数}(\%) \quad (4)$$

$$\text{雌蟹可食率}(\%) = \text{蟹肉指数}(\%) + \text{蟹黄指数}(\%) \quad (5)$$

$$M = f_1(f_3x_1 + f_4x_2) + f_2(f_5x_3 + f_6x_4) \quad (6)$$

式中, $M$ 为整蟹可食部位滋味属性强度; $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 和 $x_4$ 分别为雄蟹蟹肉、蟹膏、雌蟹蟹肉、蟹黄的滋味属性强度; $f_1$ =雄蟹可食率/雄蟹和雌蟹总可食率; $f_2$ =雌蟹可食率/雄蟹和雌蟹总可食率; $f_3$ =雄蟹蟹肉指数/雄蟹可食率; $f_4$ =蟹膏指数/雄蟹可食率; $f_5$ =雌蟹蟹肉指数/雌蟹可食率; $f_6$ =蟹黄指数/雌蟹可食率。

### 1.3.2 电子舌测定 样品预处理参照邵洋等(2021)

的方法,将蟹肉/蟹膏/蟹黄切碎后,精确称取10 g样品于100 mL离心杯中,加入20 mL去离子水均质2 min,离心(4℃,10 000 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,待测;检测方法参照刘洪波等(2020)。Insent SA402B电子舌:选用5个测试传感器,C00、CT0、AAE、AE1和GL1,分别响应苦、咸、鲜、涩和甜味强度值,根据传感器测得溶液电势和参比溶液电势差值,表示滋味的属性强度。

### 1.3.3 游离氨基酸和呈味核苷酸测定 游离氨基酸测定参照Hua等(2020)的方法并略作修改。

称取样品1 g,加入5%三氯乙酸(w/v)溶液并均质2 min,定容至25 mL,混匀,常温超声20 min,静置2 h。随后,滤纸过滤所得滤液在15 000 r/min条件下离心30 min。取上清液,用0.22 μm水膜过滤后上机。

呈味核苷酸测定参照Yu等(2018)的方法并略作修改。称取3 g样品于50 mL离心管中,加入7.5 mL,0.6 mol/L高氯酸溶液,均质2 min,4℃,10 000 g离心10 min,取上清液。上述步骤重复一次,合并上清液,并将溶液pH调至6.5~6.8,取上清液,用去离子水定容至25 mL,用0.22 μm水膜过滤后上机。高效液相色谱法(HPLC)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,流动相为98%磷酸钾缓冲液(0.05 mol/L,pH 6.8)和2%的甲醇。

1.3.4 味道强度值(TAV)及味精当量(EUC) 滋味物质的味道强度值(TAV)计算公式如下:

$$TAV = \frac{C}{T} \quad (7)$$

式中,  $C$  为滋味物质的浓度;  $T$  为该滋味物质的阈值。

味精当量(EUC)的计算公式如下:

$$EUC(\text{g MSG}/100 \text{ g}) = \sum a_i b_i + 1218 \left( \sum a_i b_i \right) (a_j b_j) \quad (8)$$

式中,  $a_i$  和  $a_j$  分别为鲜味 FAA (Asp、Glu) 和鲜味核苷酸 (GMP、IMP、AMP) 的浓度;  $b_i$  和  $b_j$  分别为鲜味 FAA 和鲜味核苷酸的相对呈鲜系数 (Glu 为 1; Asp 为 0.077; IMP 为 1; GMP 为 2.3; AMP 为 0.18); 1218 为协同作用系数。

**1.3.5 游离脂肪酸的测定** 参照 Xu 等(2018)的方法并略作修改。称取冷冻干燥后的样品 5 g, 加入 100  $\mu\text{L}$ , 1 mg/mL 内标十三烷酸甲酯, 再加入 50 mL 2:1 (v/v) 的氯仿/甲醇溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$  条件下回流萃取 2 h, 并于 45 $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发, 加入 30 mL 石油醚静置, 氮吹至溶剂完全挥发, 即得总脂, 溶解于 1 mL 氯仿后, 注入氨基小柱, 利用 7 mL 25% (w/w) 的乙酸/乙醚溶液分离游离脂肪酸。甲酯化: 取 50 mg 游离脂肪酸, 加入 2 mL 25% 的三氟化硼-甲醇溶液, 在 60 $^{\circ}\text{C}$  下静置 20 min, 冷却, 加入 1 mL 正己烷, 混合 2 min, 加入 1 mL 饱和氯化钠

溶液, 室温静置分层, 收集 1  $\mu\text{L}$  上层有机相上机。

**1.3.6 数据统计分析** 利用 SPSS 19.0 软件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; 电子舌的主成分分析图 (PCA) 由 SIMCA 14.1 分析作图; 电子舌滋味雷达图用 Origin 8.6 作图; 其他实验结果均采用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD,  $n=3$ ) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同养殖水域中华绒螯蟹可食率比较和整体滋味分析权重确定

不同养殖水域中华绒螯蟹的各可食部位指数和总可食率见表 1。太湖蟹可食率最高, 雄蟹为 (33.08 $\pm$ 0.31)%, 雌蟹为 (37.65 $\pm$ 1.09)%。雄蟹和雌蟹的总可食率约为 1:1; 雄蟹总可食率: 雄蟹蟹肉指数: 蟹膏指数约为 3:2:1; 雌蟹总可食率: 雌蟹蟹肉指数: 蟹黄指数约为 2:1:1, 即整体滋味分析时属性强度可表述为 [1/2(2/3 雄蟹蟹肉滋味属性强度+1/3 蟹膏滋味属性强度)+1/2(1/2 雌蟹蟹肉滋味属性强度+1/2 蟹黄滋味属性强度)]。

表 1 不同养殖水域中华绒螯蟹各可食部位指数和总可食率  
Tab.1 Edible part index and total edible rate of *E. sinensis* in different regions

项目 Item	雄蟹 Male crab				雌蟹 Female crab			
	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua
蟹肉指数 Crab meat Index/%	21.00 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	23.10 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	23.34 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	20.41 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	17.93 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	18.05 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	19.08 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	19.37 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>
蟹膏指数 Crab paste index/%	8.30 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	8.74 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	9.74 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	10.43 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	-	-	-	-
蟹黄指数 Crab yolk index/%	-	-	-	-	17.85 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	14.74 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	18.28 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	18.32 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
总可食率 Total edible rate/%	29.30 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	31.84 $\pm$ 0.73 <sup>bc</sup>	33.08 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	30.83 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	34.11 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	32.79 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	37.65 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	37.40 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>

注: -: 该性别的蟹没有此可食部位指数; 同行不同性别蟹的不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )

Note: -: Crabs of this gender do not have this edible part index; in the same row, the different superscript letters indicate significant differences in different gender of *E. sinensis* ( $P<0.05$ )

### 2.2 不同养殖水域中华绒螯蟹电子舌的比较分析

电子舌通过 5 个传感器的检测 (刘洪波等, 2020), 获得了不同水域中华绒螯蟹不同可食部位和整蟹可食部位的滋味信号响应值, 并绘制雷达图 (图 1)。阳

澄湖、固城湖蟹的可食部位甜味响应值明显高于其他 2 个水域, 而太湖、兴化蟹的可食部位鲜味响应值在整蟹可食部位、蟹肉、蟹膏中较高, 但同时这 2 种蟹的苦味也较重。Wang 等 (2016) 比较野外放养蟹、阳澄湖蟹和崇明蟹发现, 阳澄湖蟹的甜味 FAA 显著高于

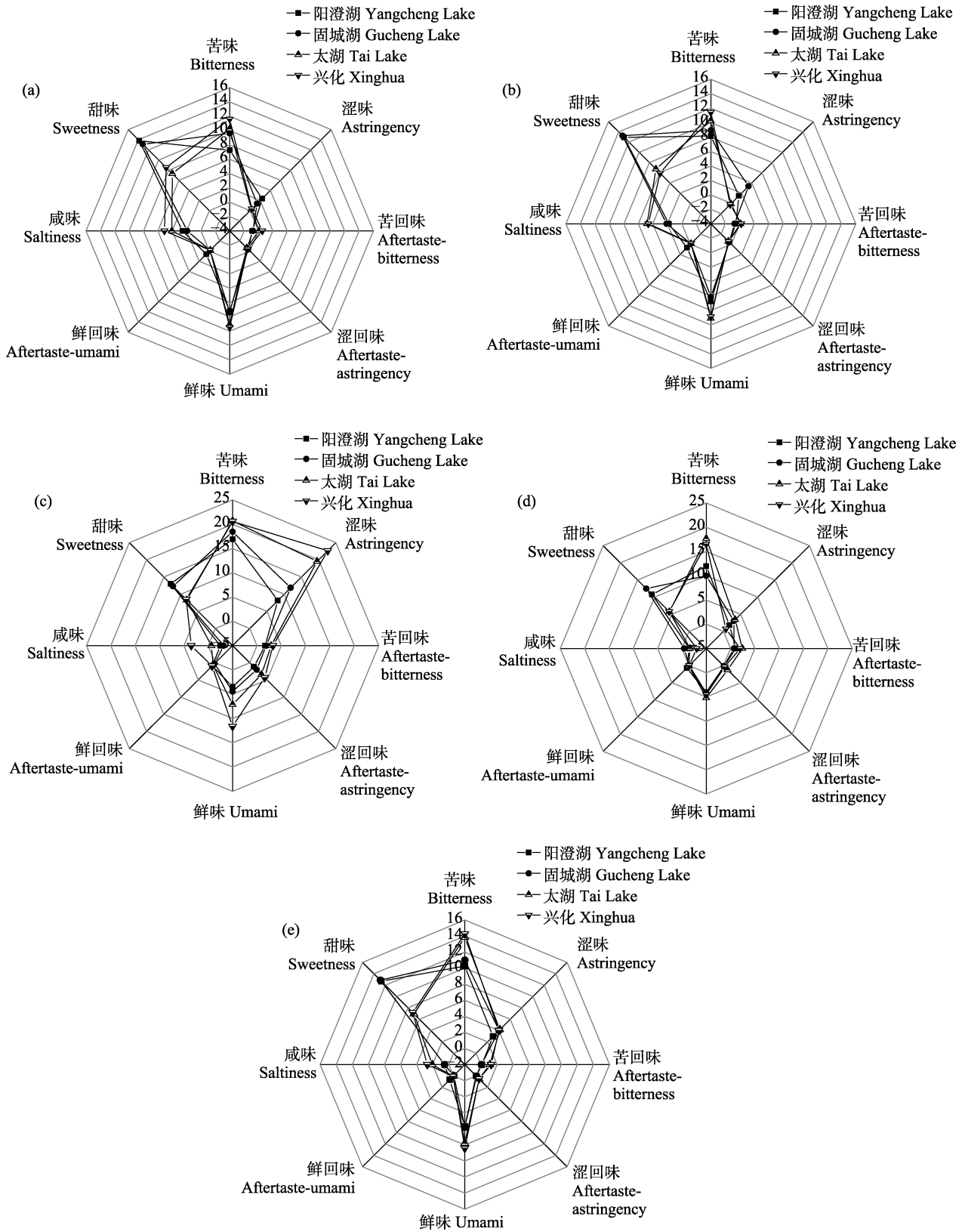


图 1 不同养殖水域中华绒螯蟹可食部位电子舌雷达图

Fig.1 Rader chart analysis by electronic tongue for edible parts of *E. sinensis* in different regions

a: 雄蟹蟹肉; b: 雌蟹蟹肉; c: 蟹膏; d: 蟹黄; e: 整蟹可食部位  
 a: Male crab meat; b: Female crab meat; c: Crab paste; d: Crab yolk; e: Whole edible parts

野外放养和崇明蟹,与电子舌阳澄湖蟹甜味强度结果一致。

由图 2 可知, PC1 和 PC2 的累计方差贡献率大于 85%, 能较完整反映样品的整体信息(Wang *et al.*, 2018)。阳澄湖蟹和固城湖蟹、太湖蟹和兴化蟹滋味轮廓相近, 阳澄湖蟹、固城湖蟹和甜味相关性最高, 兴化蟹、太湖蟹和鲜味、苦味相关性高, 这也说明不

同水域蟹滋味有差异, 甜味、鲜味、苦味可作为区别不同产地的潜在指标。

### 2.3 不同养殖水域中华绒螯蟹游离氨基酸和呈味核苷酸比较分析

由表 2 和表 3 可知, 4 种不同蟹的 FAA 组成相似, Ala、Gly、Arg 和 Pro 含量较高, 但不同水域蟹的呈

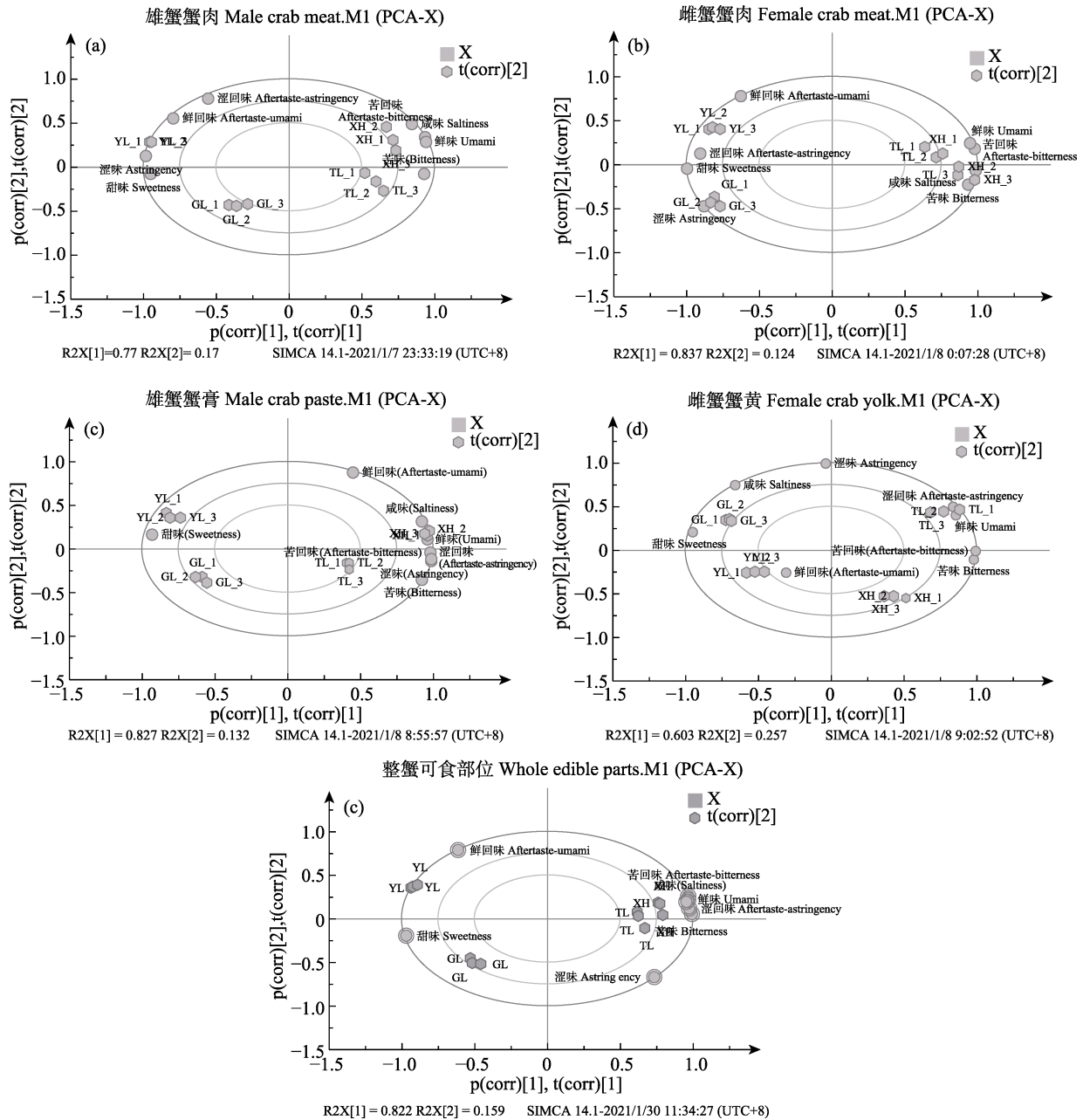


图 2 不同养殖水域中华绒螯蟹可食部位电子舌 PCA 图

Fig.2 Principal component analysis (PCA) plot by electronic tongue for edible parts of *E. sinensis* in different regions

a: 雄蟹蟹肉; b: 雌蟹蟹肉; c: 蟹膏; d: 蟹黄; e: 整蟹可食部位

YL: 阳澄湖; GL: 固城湖; TL: 太湖; XH: 兴化

a: Male crab meat; b: Female crab meat; c: Crab paste; d: Crab yolk; e: Whole edible parts

YL: Yangcheng Lake; GL: Gucheng Lake; TL: Tai Lake; XH: Xinghua

表2 不同养殖水域中华绒螯蟹肉游离氨基酸的组成及含量  
 Tab.2 Composition and content of free amino acids in crab meat of *E. sinensis* in different regions/(mg/100 g)

氨基酸 Amino acid	特征滋味 Taste attribute	雄蟹蟹肉 Male crab meat					雌蟹蟹肉 Female crab meat					
		阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake
天冬氨酸 Asp	鲜/酸 Umami/sourness (+)	33.28±3.09 <sup>c</sup>	17.27±0.32 <sup>b</sup>	35.47±0.53 <sup>c</sup>	11.07±0.01 <sup>a</sup>	31.05±1.02 <sup>a</sup>	39.65±1.61 <sup>b</sup>	39.64±2.26 <sup>b</sup>	31.57±0.69 <sup>a</sup>			
谷氨酸 Glu	鲜/酸 Umami/sourness (+)	49.85±2.33 <sup>a</sup>	48.01±2.6 <sup>a</sup>	88.29±7.25 <sup>c</sup>	70.54±3.35 <sup>b</sup>	66.58±0.68 <sup>bc</sup>	72.53±2.43 <sup>c</sup>	61.92±0.20 <sup>b</sup>	39.64±2.95 <sup>a</sup>			
丝氨酸 Ser	甜 Sweet (+)	7.71±0.15 <sup>c</sup>	6.97±1.02 <sup>b</sup>	4.86±0.42 <sup>ab</sup>	2.65±0.30 <sup>a</sup>	4.09±0.09 <sup>a</sup>	6.65±0.18 <sup>c</sup>	3.90±0.17 <sup>a</sup>	5.61±0.06 <sup>b</sup>			
丙氨酸 Ala	甜 Sweet (+)	262.15±0.84 <sup>ab</sup>	330.12±6.22 <sup>b</sup>	242.42±27.24 <sup>a</sup>	252.03±22.82 <sup>a</sup>	314.56±3.59 <sup>a</sup>	405.64±5.16 <sup>c</sup>	315.59±1.34 <sup>a</sup>	350.34±4.07 <sup>b</sup>			
甘氨酸 Gly	甜 Sweet (+)	467.95±6.22 <sup>b</sup>	381.51±6.90 <sup>a</sup>	475.29±2.38 <sup>b</sup>	464.60±9.58 <sup>b</sup>	422.78±2.10 <sup>c</sup>	319.56±1.01 <sup>a</sup>	444.19±6.80 <sup>d</sup>	388.97±1.34 <sup>b</sup>			
苏氨酸 Thr	甜 Sweet (+)	25.50±2.68 <sup>ab</sup>	19.78±2.96 <sup>a</sup>	29.90±2.70 <sup>b</sup>	22.31±0.37 <sup>ab</sup>	24.52±1.15 <sup>a</sup>	31.62±0.48 <sup>b</sup>	24.00±0.29 <sup>a</sup>	26.84±1.16 <sup>a</sup>			
苯丙氨酸 Phe	苦 Bitter (-)	4.65±0.76 <sup>a</sup>	7.25±1.18 <sup>a</sup>	7.10±1.4 <sup>a</sup>	11.45±0.16 <sup>b</sup>	7.34±0.12 <sup>a</sup>	12.10±0.87 <sup>c</sup>	8.25±0.56 <sup>ab</sup>	9.90 ± 0.72 <sup>b</sup>			
异亮氨酸 Ile	苦 Bitter (-)	4.41±0.84 <sup>a</sup>	5.79±1.06 <sup>a</sup>	6.37±1.42 <sup>a</sup>	6.88±0.19 <sup>a</sup>	9.16±0.21 <sup>b</sup>	15.78±0.72 <sup>c</sup>	7.58±0.12 <sup>ab</sup>	7.25±0.57 <sup>a</sup>			
亮氨酸 Leu	苦 Bitter (-)	7.51±1.38 <sup>a</sup>	14.00±2.67 <sup>a</sup>	10.86±1.59 <sup>a</sup>	11.84±0.64 <sup>a</sup>	13.49±0.43 <sup>a</sup>	22.14±0.65 <sup>b</sup>	12.98±0.02 <sup>a</sup>	12.70±0.68 <sup>a</sup>			
组氨酸 His	苦 Bitter (-)	14.09±2.51 <sup>a</sup>	20.76±4.46 <sup>ab</sup>	18.96±2.21 <sup>ab</sup>	27.20±1.79 <sup>b</sup>	17.32±0.56 <sup>a</sup>	27.54±1.02 <sup>c</sup>	22.00±0.84 <sup>b</sup>	24.87±0.62 <sup>bc</sup>			
酪氨酸 Tyr	苦 Bitter (-)	8.16±1.51 <sup>a</sup>	10.77±2.25 <sup>ab</sup>	18.98±4.43 <sup>b</sup>	19.82±0.54 <sup>b</sup>	17.17±0.02 <sup>a</sup>	28.13±1.31 <sup>b</sup>	16.58±0.36 <sup>a</sup>	14.50±0.24 <sup>a</sup>			
精氨酸 Arg	苦/甜 Bitter/sweet (+)	449.74±1.81 <sup>a</sup>	543.37±8.01 <sup>b</sup>	543.74±16.62 <sup>b</sup>	624.30±20.97 <sup>c</sup>	513.94±29.93 <sup>ab</sup>	440.07±14.53 <sup>a</sup>	537.79±9.15 <sup>b</sup>	560.79±22.81 <sup>b</sup>			
缬氨酸 Val	甜/苦 Sweet/bitter (+)	10.13±1.80 <sup>a</sup>	14.32±3.05 <sup>a</sup>	17.14±3.00 <sup>a</sup>	18.73±0.62 <sup>a</sup>	18.30±0.49 <sup>a</sup>	26.52±0.91 <sup>b</sup>	16.79±0.41 <sup>a</sup>	17.37±0.67 <sup>a</sup>			
半胱氨酸 Cys	苦/甜/硫 Bitter/sweet/sulfurous (-)	30.18±0.00 <sup>a</sup>	34.04±2.00 <sup>a</sup>	56.67±0.36 <sup>b</sup>	52.72±2.86 <sup>b</sup>	30.31±0.05 <sup>a</sup>	39.01±0.84 <sup>b</sup>	52.54±1.27 <sup>d</sup>	46.84±0.64 <sup>c</sup>			
甲硫氨酸 Met	甜/苦 Sweet/sulfurous (-)	10.37±2.02 <sup>a</sup>	8.68±1.80 <sup>a</sup>	19.51±3.14 <sup>a</sup>	54.30±4.09 <sup>b</sup>	24.14±0.74 <sup>b</sup>	14.73±0.48 <sup>a</sup>	28.30±0.58 <sup>c</sup>	32.73±1.53 <sup>d</sup>			
赖氨酸 Lys	甜/苦 Sweet/bitter (-)	23.31±4.06 <sup>ab</sup>	18.33±3.97 <sup>a</sup>	35.85±4.17 <sup>b</sup>	15.16±0.29 <sup>a</sup>	35.81±1.10 <sup>c</sup>	59.92±1.39 <sup>d</sup>	30.73±0.35 <sup>b</sup>	21.55±1.37 <sup>a</sup>			
脯氨酸 Pro	甜/苦 Sweet/bitter (+)	135.68±0.01 <sup>b</sup>	90.91±2.20 <sup>a</sup>	137.39±0.72 <sup>b</sup>	152.29±1.87 <sup>c</sup>	184.40±2.14 <sup>a</sup>	135.31±0.87 <sup>a</sup>	140.49±9.97 <sup>a</sup>	157.50±27.67 <sup>a</sup>			
甜味氨基酸 Sweet FAA		899.00±2.88 <sup>a</sup>	829.28±6.87 <sup>a</sup>	889.86±32.02 <sup>a</sup>	893.88±29.85 <sup>a</sup>	950.34±4.78 <sup>a</sup>	898.78±7.35 <sup>a</sup>	928.16±4.63 <sup>a</sup>	929.26±34.18 <sup>a</sup>			
鲜味氨基酸 Umami FAA		83.13±5.42 <sup>a</sup>	65.28±2.33 <sup>a</sup>	123.76±6.72 <sup>b</sup>	81.62±3.36 <sup>a</sup>	97.62±1.70 <sup>b</sup>	112.19±4.04 <sup>c</sup>	101.55±2.01 <sup>bc</sup>	71.21±3.65 <sup>a</sup>			
苦味氨基酸 Bitter FAA		34.16±6.24 <sup>a</sup>	51.31±10.43 <sup>ab</sup>	55.17±9.65 <sup>ab</sup>	65.75±0.42 <sup>b</sup>	57.14±1.22 <sup>a</sup>	93.59±3.69 <sup>b</sup>	59.14±1.05 <sup>a</sup>	59.32±1.63 <sup>a</sup>			
总计 Total		1544.68±19.23 <sup>a</sup>	1571.88±39.64 <sup>a</sup>	1748.8±76.36 <sup>ab</sup>	1817.91±53.03 <sup>b</sup>	1734.94±40.03 <sup>a</sup>	1696.91±34.10 <sup>a</sup>	1763.25±8.93 <sup>a</sup>	1748.99±65.91 <sup>a</sup>			

注: +: 对滋味有好的贡献; -: 对滋味有不好的贡献; 同行不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

Note: +: Had a good contribution to taste; -: Had a bad contribution to taste; The different letter superscripts indicate significant differences in different edible parts of *E. sinensis* ( $P < 0.05$ ). The same as below



味 FAA 含量存在一定的差异。呈甜味 FAA 有 5 种 (Ser、Ala、Gly、Thr、Pro), 在阳澄湖蟹蟹肉、蟹黄和固城湖蟹蟹膏中含量最高; 呈鲜味 FAA 有 2 种 (Asp、Glu), 在太湖蟹雄蟹蟹肉中为  $(123.76 \pm 6.72)$  mg/100 g, 显著高于其他 3 个水域蟹含量 ( $P < 0.05$ ), 兴化、太湖蟹蟹膏中含量也较高。以可食率比值为权重分析整蟹可食部位, 其中阳澄湖蟹甜味 FAA 含量最高, 为  $(676.65 \pm 1.30)$  mg/100 g, 而太湖蟹中鲜味 FAA 含量最高, 为  $(98.06 \pm 4.07)$  mg/100 g。

由表 4 和表 5 可知, AMP、GMP 和 IMP 为主要的 3 种呈味核苷酸, 对甜味和鲜味具有贡献作用, 除自身具有鲜味外, 还可与其他物质 [如谷氨酸钠 (MSG)、FAA 等] 共同作用, 增强蟹的风味 (刘天天等, 2018)。其中, AMP 含量最高, 且其浓度会影响呈味特点, AMP 含量小于 100 mg/100 g 时, 水产品呈甜味, AMP 含量大于 100 mg/100 g 时, 水产品的鲜味增强而甜味被削弱 (陈小雷等, 2020), 蟹肉中 AMP 的浓度除了固城湖蟹雄蟹蟹肉均大于 100 mg/100 g, 说明蟹肉以鲜味为主, 太湖蟹雄蟹蟹肉和阳澄湖蟹雌蟹蟹肉含量最高; 而蟹膏中 AMP 均小于 100 mg/100 g, 主要表现甜味, 并且 IMP 和 GMP 含量都比蟹黄低, 说明蟹膏较蟹黄甜, 鲜味不突出, 3 种核苷酸含量之和在固城湖蟹蟹膏和太湖蟹蟹黄最高, 以可食率比值为权重分析 4 个水域整蟹可食部位, 3 种核苷酸含量在太湖蟹中最高为  $(353.44 \pm 7.83)$  mg/100 g。IMP 降解产生的 HxR 和 Hx 是蟹中的异味物质, 呈苦味 (Hong *et al.*, 2017), 在蟹黄中除了鲜味贡献核苷酸外, Hx 含量也较高, 这可能是蟹黄略显苦味的原因, 滋味也更加丰富。

#### 2.4 不同养殖水域中华绒螯蟹 TAV 值及 EUC 值差异分析

TAV 值通常用于判定食品中单一组分的滋味强度对其整体风味贡献, 即呈味物质的含量与其阈值共同决定了人类对于味道的感知, 当  $TAV > 1$ , 代表该物质对样品有重要影响 (曹荣等, 2019)。由表 6 可知, 不同水域蟹滋味活性物质个数间差异很小, 主要有 8 种, 其中, 6 种氨基酸 (Glu、His、Gly、Arg、Ala、Lys)、2 种核苷酸 (AMP、GMP), Ala 和 Arg 的 TAV 值是其他滋味活性物质的数倍, 对滋味贡献很大, 虽然 His、Lys 呈苦味, 但马海建等 (2016) 研究发现, His 可增强水产品的风味, 使某些水产品具有“肉香”的特征, 甜味 FAA 中 Gly 也可抑制苦味, 所以在消费时中华绒螯蟹的苦味特征不明显。

EUC 值用来反映鲜味 FAA 与呈味核苷酸的协同增

鲜效果作用, 目前被广泛用来评价食品的鲜味强度。由表 6 和表 7 可知, EUC 值在不同可食部位含量存在差异, 太湖蟹雄蟹蟹肉的 EUC 值  $[(15.29 \pm 2.58)$  g MSG/100 g] 显著高于其他水域蟹 ( $P < 0.05$ ), 阳澄湖蟹雌蟹蟹肉、固城湖蟹蟹膏、蟹黄的 EUC 值较高。蟹黄的 EUC 值比蟹膏大, 是因为含有较高含量的 AMP、GMP, 造成了蟹黄、蟹膏滋味的不同。以可食率比值为权重分析不同水域的整蟹可食部位, 太湖蟹的 EUC 值显著高于其他水域  $[(11.62 \pm 0.66)$  g MSG/100 g] ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 不同养殖水域中华绒螯蟹游离脂肪酸的比较分析

不同养殖水域中华绒螯蟹的 FFA 含量见表 8, 其主要的 FFA 是饱和脂肪酸 (SFA) 中的棕榈酸 (C16:0) 和硬脂酸 (C18:0), 单不饱和脂肪酸 (MUFA) 中的油酸 (C18:1), 多不饱和脂肪酸 (PUFA) 中的亚油酸 (C18:2)、二十碳五烯酸 EPA (C20:5) 和二十二碳六烯酸 DHA (C22:6), 与倪逸群等 (2016) 研究结果一致。不同水域蟹的 FFA 含量具有一定的差异, 在阳澄湖蟹蟹膏和太湖蟹蟹黄含量最高, 而在兴化蟹蟹膏、蟹黄的含量最低。

其中, 尤其是高含量的高不饱和脂肪酸能显著地增加风味 (邓文辉等, 2012), 不饱和脂肪酸含量, 以阳澄湖蟹蟹膏 (1 265.8 mg/100 g) 和太湖蟹蟹黄 (1 861.69 mg/100 g) 含量最高, 且雌蟹的含量大于雄蟹, 这可能导致蟹黄中风味更加丰富。

王潇等 (2019) 研究发现, 棕榈油酸 (C16:1) 含量和风味之间存在着较高的正相关关系, 蟹膏可食部位, 阳澄湖蟹含量最高, 其次为固城湖蟹、太湖蟹、兴化蟹; 蟹黄中固城湖蟹  $>$  太湖蟹  $>$  阳澄湖蟹  $>$  兴化蟹, 且不同养殖水域间含量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 各养殖水域中, 阳澄湖、固城湖、太湖的 C16:1 含量较高, 由此仅从 FFA 角度评价得出湖泊养殖蟹 (阳澄湖、固城湖、太湖) 风味最为丰富, 与张彤晴等 (2007) 比较太湖网围、金坛池塘、固城湖放流、长江野生蟹的 FAA 含量, 得出湖泊放流的中华绒螯蟹最为味美一致。

### 3 结论

综上, 太湖蟹可食率最高; 阳澄湖蟹和固城湖蟹滋味轮廓相近, 太湖蟹和兴化蟹滋味轮廓相近。甜味特征属阳澄湖蟹最为突出, 其电子舌 PCA 分析与甜味属性相关性高, 且在蟹肉、蟹黄和整蟹可食部分中甜味 FAA 含量均最高; 而鲜味特征排名根据不同可食部位而异, 太湖蟹整体可食部位的鲜味 FAA、呈味核苷酸 (AMP、IMP、GMP)、EUC 值均最高; 在总游离脂肪酸方面, 湖泊养殖的阳澄湖蟹、固城湖蟹、太

表3 不同养殖水域中华绒螯蟹蟹膏和蟹黄游离氨基酸的组成及含量

氨基酸 Amino acid	特征滋味 Taste attribute	蟹膏 Crab paste					蟹黄 Crab yolk						
		阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua
天冬氨酸 Asp	鲜/酸 Umami/sourness (+)	29.79±3.56 <sup>a</sup>	26.08±0.10 <sup>a</sup>	17.51±3.15 <sup>a</sup>	18.50±7.11 <sup>a</sup>	14.28±0.07 <sup>c</sup>	1.93±0.08 <sup>a</sup>	5.85±3.30 <sup>ab</sup>	11.88±0.94 <sup>bc</sup>				
谷氨酸 Glu	鲜/酸 Umami/sourness (+)	59.83±0.79 <sup>a</sup>	71.37±0.59 <sup>ab</sup>	94.24±16.55 <sup>bc</sup>	115.94±3.76 <sup>c</sup>	52.42±2.13 <sup>b</sup>	59.66±0.27 <sup>c</sup>	45.24±0.43 <sup>a</sup>	47.57±0.99 <sup>a</sup>				
丝氨酸 Ser	甜 Sweet (+)	8.50±0.02 <sup>b</sup>	7.03±1.29 <sup>b</sup>	2.92±0.34 <sup>a</sup>	3.92±0.77 <sup>a</sup>	3.23±0.25 <sup>a</sup>	4.46±0.35 <sup>b</sup>	3.60±0.26 <sup>ab</sup>	3.52±0.09 <sup>ab</sup>				
丙氨酸 Ala	甜 Sweet (+)	123.84±2.97 <sup>b</sup>	187.90±2.82 <sup>c</sup>	76.41±12.43 <sup>a</sup>	137.32±5.82 <sup>b</sup>	137.25±0.11 <sup>b</sup>	138.38±3.10 <sup>b</sup>	95.56±3.63 <sup>a</sup>	102.89±1.60 <sup>a</sup>				
甘氨酸 Gly	甜 Sweet (+)	123.18±0.85 <sup>a</sup>	105.08±7.07 <sup>a</sup>	86.34±19.32 <sup>a</sup>	110.32±1.75 <sup>a</sup>	79.64±0.28 <sup>c</sup>	65.37±5.02 <sup>b</sup>	43.16±3.79 <sup>a</sup>	73.71±3.19 <sup>bc</sup>				
苏氨酸 Thr	甜 Sweet (+)	28.50±0.04 <sup>a</sup>	26.44±3.78 <sup>a</sup>	16.50±5.15 <sup>a</sup>	21.22±2.52 <sup>a</sup>	32.33±1.06 <sup>ab</sup>	26.38±0.07 <sup>a</sup>	38.32±4.06 <sup>b</sup>	36.25±2.92 <sup>ab</sup>				
苯丙氨酸 Phe	苦 Bitter (-)	34.31±0.39 <sup>b</sup>	25.93±5.03 <sup>ab</sup>	16.66±4.30 <sup>a</sup>	25.26±3.78 <sup>ab</sup>	11.11±0.20 <sup>a</sup>	13.27±0.29 <sup>ab</sup>	16.02±0.16 <sup>b</sup>	21.50±1.46 <sup>c</sup>				
异亮氨酸 Ile	苦 Bitter (-)	21.32±0.43 <sup>a</sup>	17.79±3.53 <sup>a</sup>	11.06±2.87 <sup>a</sup>	16.03±2.45 <sup>a</sup>	8.07±0.05 <sup>a</sup>	9.74±0.01 <sup>a</sup>	8.59±0.00 <sup>a</sup>	12.35±1.30 <sup>b</sup>				
亮氨酸 Leu	苦 Bitter (-)	54.07±0.58 <sup>b</sup>	43.04±9.04 <sup>ab</sup>	22.30±7.91 <sup>a</sup>	34.84±6.88 <sup>ab</sup>	14.53±0.19 <sup>a</sup>	19.81±0.15 <sup>ab</sup>	14.78±0.13 <sup>a</sup>	23.51±3.12 <sup>b</sup>				
组氨酸 His	苦 Bitter (-)	18.14±0.49 <sup>b</sup>	19.86±0.79 <sup>b</sup>	9.57±2.34 <sup>a</sup>	13.03±2.99 <sup>ab</sup>	11.62±0.10 <sup>a</sup>	15.30±0.40 <sup>b</sup>	16.92±0.35 <sup>b</sup>	25.34±0.64 <sup>c</sup>				
酪氨酸 Tyr	苦 Bitter (-)	41.04±0.91 <sup>a</sup>	32.22±4.19 <sup>a</sup>	22.58±7.63 <sup>a</sup>	36.39±4.40 <sup>a</sup>	19.71±0.78 <sup>a</sup>	17.61±0.40 <sup>a</sup>	19.69±1.11 <sup>a</sup>	26.70±1.28 <sup>b</sup>				
精氨酸 Arg	苦/甜 Bitter/sweet (+)	191.14±6.32 <sup>a</sup>	178.00±5.10 <sup>a</sup>	169.14±41.51 <sup>a</sup>	175.47±25.89 <sup>a</sup>	191.89±4.47 <sup>c</sup>	169.87±1.21 <sup>b</sup>	148.22±1.06 <sup>a</sup>	211.89±7.77 <sup>d</sup>				
缬氨酸 Val	甜/苦 Sweet/bitter (+)	30.70±0.30 <sup>a</sup>	26.64±3.94 <sup>a</sup>	16.75±5.11 <sup>a</sup>	22.41±3.18 <sup>a</sup>	13.51±0.02 <sup>a</sup>	15.72±0.92 <sup>a</sup>	12.98±0.60 <sup>a</sup>	22.37±2.08 <sup>b</sup>				
半胱氨酸 Cys	苦/甜/硫 Bitter/sweet/sulfurous (-)	10.16±0.03 <sup>a</sup>	13.74±0.46 <sup>a</sup>	12.17±2.59 <sup>a</sup>	15.16±1.72 <sup>a</sup>	10.82±0.04 <sup>b</sup>	9.05±0.61 <sup>b</sup>	6.24±0.55 <sup>a</sup>	10.29±0.47 <sup>b</sup>				
甲硫氨酸 Met	苦/甜/硫 Bitter/sweet/sulfurous (-)	17.16±0.29 <sup>a</sup>	14.27±1.52 <sup>a</sup>	10.58±3.15 <sup>a</sup>	14.68±1.67 <sup>a</sup>	9.93±0.08 <sup>b</sup>	6.93±0.17 <sup>a</sup>	9.73±0.58 <sup>b</sup>	19.92±0.93 <sup>c</sup>				
赖氨酸 Lys	甜/苦 Sweet/bitter (-)	71.20±0.94 <sup>b</sup>	60.11±7.24 <sup>ab</sup>	36.28±12.9 <sup>a</sup>	52.83±7.87 <sup>ab</sup>	37.50±0.45 <sup>b</sup>	49.75±0.66 <sup>c</sup>	31.85±0.15 <sup>a</sup>	45.00±2.49 <sup>c</sup>				
脯氨酸 Pro	甜/苦 Sweet/bitter (+)	82.21±2.50 <sup>ab</sup>	54.17±2.82 <sup>a</sup>	64.90±12.88 <sup>ab</sup>	98.16±11.15 <sup>b</sup>	57.43±1.93 <sup>b</sup>	51.32±0.64 <sup>a</sup>	68.86±1.44 <sup>c</sup>	79.43±0.09 <sup>d</sup>				
甜味氨基酸 Sweet FAA		366.23±6.34 <sup>b</sup>	380.62±3.63 <sup>b</sup>	247.06±50.11 <sup>a</sup>	370.94±0.29 <sup>b</sup>	309.86±0.73 <sup>c</sup>	285.92±7.20 <sup>b</sup>	249.51±4.53 <sup>a</sup>	295.80±4.5 <sup>bc</sup>				
鲜味氨基酸 Umami FAA		89.63±4.35 <sup>a</sup>	97.45±0.69 <sup>ab</sup>	111.75±19.70 <sup>ab</sup>	134.43±3.35 <sup>b</sup>	66.70±2.06 <sup>b</sup>	61.59±0.35 <sup>b</sup>	51.09±3.73 <sup>a</sup>	59.44±1.93 <sup>ab</sup>				
苦味氨基酸 Bitter FAA		134.57±2.40 <sup>b</sup>	112.91±17.56 <sup>ab</sup>	65.51±20.75 <sup>a</sup>	100.28±16.71 <sup>ab</sup>	53.93±0.63 <sup>a</sup>	62.46±0.13 <sup>a</sup>	59.98±0.89 <sup>a</sup>	87.90±5.07 <sup>b</sup>				
总计 Total		945.09±21.38 <sup>a</sup>	909.66±44.25 <sup>a</sup>	685.90±160.12 <sup>a</sup>	911.46±57.19 <sup>a</sup>	705.25±6.67 <sup>b</sup>	674.56±7.11 <sup>b</sup>	585.61±2.35 <sup>a</sup>	774.12±26.71 <sup>c</sup>				

表 4 不同养殖水域中华绒螯蟹蟹肉呈味核苷酸的含量  
Tab.4 Content of flavor nucleotide in crab meat of *E. sinensis* in different regions/(mg/100 g)

核苷酸 Nucleotide	雄蟹蟹肉 Male crab meat					雌蟹蟹肉 Female crab meat						
	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua
AMP	108.50±7.51 <sup>a</sup>	91.76±6.46 <sup>a</sup>	159.25±1.19 <sup>b</sup>	107.1±6.61 <sup>a</sup>	141.19±4.62 <sup>b</sup>	117.67±9.69 <sup>a</sup>	110.57±0.00 <sup>a</sup>	104.10±3.73 <sup>a</sup>	141.19±4.62 <sup>b</sup>	117.67±9.69 <sup>a</sup>	110.57±0.00 <sup>a</sup>	104.10±3.73 <sup>a</sup>
IMP	5.75±0.26 <sup>ab</sup>	3.66±0.17 <sup>a</sup>	7.12±1.15 <sup>b</sup>	8.33±0.94 <sup>b</sup>	10.39±3.02 <sup>b</sup>	2.62±0.55 <sup>a</sup>	3.15±0.41 <sup>a</sup>	6.29±0.96 <sup>ab</sup>	10.39±3.02 <sup>b</sup>	2.62±0.55 <sup>a</sup>	3.15±0.41 <sup>a</sup>	6.29±0.96 <sup>ab</sup>
GMP	26.27±2.39 <sup>a</sup>	28.28±0.32 <sup>a</sup>	45.25±5.70 <sup>b</sup>	27.83±1.24 <sup>a</sup>	26.39±1.17 <sup>a</sup>	28.09±0.81 <sup>a</sup>	30.14±6.04 <sup>a</sup>	26.32±0.68 <sup>a</sup>	26.39±1.17 <sup>a</sup>	28.09±0.81 <sup>a</sup>	30.14±6.04 <sup>a</sup>	26.32±0.68 <sup>a</sup>
Hx	0.72±0.02 <sup>a</sup>	0.79±0.08 <sup>a</sup>	0.89±0.08 <sup>a</sup>	0.66±0.07 <sup>a</sup>	0.76±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>	0.63±0.33 <sup>a</sup>	0.53±0.34 <sup>a</sup>	0.76±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>	0.63±0.33 <sup>a</sup>	0.53±0.34 <sup>a</sup>
HxR	4.84±0.16 <sup>a</sup>	9.09±1.02 <sup>b</sup>	9.23±0.80 <sup>b</sup>	9.29±1.06 <sup>b</sup>	7.08±1.68 <sup>a</sup>	10.21±2.03 <sup>a</sup>	6.58±1.44 <sup>a</sup>	5.77±1.96 <sup>a</sup>	7.08±1.68 <sup>a</sup>	10.21±2.03 <sup>a</sup>	6.58±1.44 <sup>a</sup>	5.77±1.96 <sup>a</sup>

表 5 不同养殖水域中华绒螯蟹蟹膏和蟹黄呈味核苷酸的含量  
Tab.5 Content of flavor nucleotide in crab paste and yolk of *E. sinensis* in different regions/(mg/100 g)

核苷酸 Nucleotide	蟹膏 Crab paste					蟹黄 Crab yolk						
	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua
AMP	25.89±1.67 <sup>a</sup>	25.00±0.50 <sup>a</sup>	29.35±3.65 <sup>a</sup>	27.34±2.17 <sup>a</sup>	543.71±29.05 <sup>a</sup>	752.40±23.05 <sup>b</sup>	880.98±41.43 <sup>c</sup>	859.86±16.54 <sup>bc</sup>	543.71±29.05 <sup>a</sup>	752.40±23.05 <sup>b</sup>	880.98±41.43 <sup>c</sup>	859.86±16.54 <sup>bc</sup>
IMP	1.46±0.07 <sup>b</sup>	1.18±0.02 <sup>ab</sup>	0.75±0.20 <sup>a</sup>	0.90±0.26 <sup>ab</sup>	14.17±2.03 <sup>a</sup>	15.47±1.68 <sup>a</sup>	14.67±1.75 <sup>a</sup>	11.62±0.56 <sup>a</sup>	14.17±2.03 <sup>a</sup>	15.47±1.68 <sup>a</sup>	14.67±1.75 <sup>a</sup>	11.62±0.56 <sup>a</sup>
GMP	11.53±0.83 <sup>b</sup>	15.55±1.18 <sup>c</sup>	6.22±0.67 <sup>a</sup>	7.56±0.09 <sup>a</sup>	50.94±5.32 <sup>a</sup>	65.84±0.73 <sup>ab</sup>	66.74±5.27 <sup>b</sup>	59.31±0.01 <sup>ab</sup>	50.94±5.32 <sup>a</sup>	65.84±0.73 <sup>ab</sup>	66.74±5.27 <sup>b</sup>	59.31±0.01 <sup>ab</sup>
Hx	0.77±0.19 <sup>a</sup>	0.70±0.04 <sup>a</sup>	0.75±0.13 <sup>a</sup>	0.72±0.12 <sup>a</sup>	39.45±0.63 <sup>a</sup>	42.60±1.66 <sup>ab</sup>	43.06±3.03 <sup>ab</sup>	47.71±1.02 <sup>b</sup>	39.45±0.63 <sup>a</sup>	42.60±1.66 <sup>ab</sup>	43.06±3.03 <sup>ab</sup>	47.71±1.02 <sup>b</sup>
HxR	4.03±0.79 <sup>a</sup>	6.83±0.21 <sup>b</sup>	5.07±0.49 <sup>ab</sup>	5.05±0.29 <sup>ab</sup>	5.33±1.17 <sup>a</sup>	5.51±0.39 <sup>a</sup>	4.73±0.58 <sup>a</sup>	4.43±0.35 <sup>a</sup>	5.33±1.17 <sup>a</sup>	5.51±0.39 <sup>a</sup>	4.73±0.58 <sup>a</sup>	4.43±0.35 <sup>a</sup>

表 6 不同养殖水域中华绒螯蟹肉滋味活性物质及其 TAV 值与 EUC 含量  
Tab.6 TAV value and content of EUC based on taste active compounds in crab meat of *E.sinensis* in different regions

呈味物质 Taste substance	雄蟹蟹肉 Male crab meat					雌蟹蟹肉 Female crab meat				
	味道阈值 (mg/100 g)	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	太湖 Tai Lake
谷氨酸 Glu	30	1.66±0.08 <sup>a</sup>	1.60±0.09 <sup>a</sup>	2.94±0.24 <sup>c</sup>	2.35±0.11 <sup>b</sup>	2.22±0.02 <sup>bc</sup>	2.42±0.08 <sup>c</sup>	2.07±0.01 <sup>b</sup>	1.32±0.10 <sup>a</sup>	1.32±0.10 <sup>a</sup>
组氨酸 His	20	0.71±0.13 <sup>a</sup>	1.04±0.23 <sup>ab</sup>	0.95±0.11 <sup>ab</sup>	1.36±0.09 <sup>b</sup>	0.87±0.03 <sup>a</sup>	1.38±0.05 <sup>c</sup>	1.10±0.04 <sup>b</sup>	1.24±0.03 <sup>bc</sup>	1.24±0.03 <sup>bc</sup>
甘氨酸 Gly	130	3.60±0.05 <sup>b</sup>	2.94±0.06 <sup>a</sup>	3.66±0.02 <sup>b</sup>	3.57±0.08 <sup>b</sup>	3.26±0.02 <sup>c</sup>	2.46±0.01 <sup>a</sup>	3.42±0.06 <sup>d</sup>	2.99±0.01 <sup>b</sup>	2.99±0.01 <sup>b</sup>
精氨酸 Arg	50	9.00±0.04 <sup>a</sup>	10.87±0.16 <sup>b</sup>	10.88±0.34 <sup>b</sup>	12.49±0.42 <sup>c</sup>	10.28±0.6 <sup>ab</sup>	8.80±0.29 <sup>a</sup>	10.76±0.19 <sup>b</sup>	11.22±0.46 <sup>c</sup>	11.22±0.46 <sup>c</sup>
丙氨酸 Ala	60	4.37±0.01 <sup>ab</sup>	5.51±0.11 <sup>b</sup>	4.04±0.45 <sup>a</sup>	4.20±0.38 <sup>a</sup>	5.24±0.06 <sup>a</sup>	6.76±0.09 <sup>c</sup>	5.26±0.02 <sup>a</sup>	5.84±0.07 <sup>b</sup>	5.84±0.07 <sup>b</sup>
赖氨酸 Lys	50	0.47±0.09 <sup>ab</sup>	0.37±0.08 <sup>a</sup>	0.72±0.09 <sup>b</sup>	0.30±0.01 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>c</sup>	1.20±0.03 <sup>d</sup>	0.62±0.01 <sup>b</sup>	0.43±0.03 <sup>a</sup>	0.43±0.03 <sup>a</sup>
AMP	50	2.17±0.15 <sup>a</sup>	1.84±0.13 <sup>a</sup>	3.19±0.03 <sup>b</sup>	2.14±0.13 <sup>a</sup>	2.83±0.10 <sup>b</sup>	2.36±0.20 <sup>a</sup>	2.21±0.00 <sup>a</sup>	2.09±0.08 <sup>a</sup>	2.09±0.08 <sup>a</sup>
GMP	12.5	2.10±0.19 <sup>a</sup>	2.27±0.03 <sup>a</sup>	3.62±0.46 <sup>b</sup>	2.23±0.10 <sup>a</sup>	2.11±0.09 <sup>a</sup>	2.25±0.07 <sup>a</sup>	2.41±0.48 <sup>a</sup>	2.11±0.06 <sup>a</sup>	2.11±0.06 <sup>a</sup>
EUC/(g MSG/100 g)		5.29±0.49 <sup>a</sup>	5.31±0.08 <sup>a</sup>	15.29±2.58 <sup>b</sup>	8.00±0.83 <sup>a</sup>	8.13±0.64 <sup>b</sup>	7.57±0.34 <sup>b</sup>	7.05±1.10 <sup>b</sup>	4.21±0.34 <sup>a</sup>	4.21±0.34 <sup>a</sup>

表 7 不同养殖水域中华绒螯蟹膏和蟹黄滋味活性物质及其 TAV 值与 EUC 含量  
Tab.7 TAV value and content of EUC based on taste active compounds in crab paste and yolk of *E.sinensis* in different regions

呈味物质 Taste substance	蟹膏 Crab paste					蟹黄 Crab yolk				
	味道阈值 (mg/100 g)	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	阳澄湖 Yangcheng Lake	固城湖 Gucheng Lake	太湖 Tai Lake	兴化 Xinghua	太湖 Tai Lake
谷氨酸 Glu	30	2.00±0.03 <sup>a</sup>	2.38±0.02 <sup>ab</sup>	3.14±0.55 <sup>bc</sup>	3.86±0.13 <sup>c</sup>	1.75±0.07 <sup>b</sup>	1.99±0.01 <sup>c</sup>	1.51±0.02 <sup>a</sup>	1.59±0.04 <sup>a</sup>	1.59±0.04 <sup>a</sup>
组氨酸 His	20	0.91±0.03 <sup>b</sup>	0.99±0.04 <sup>b</sup>	0.48±0.12 <sup>a</sup>	0.65±0.15 <sup>ab</sup>	0.59±0.01 <sup>a</sup>	0.77±0.03 <sup>b</sup>	0.85±0.02 <sup>b</sup>	1.27±0.03 <sup>c</sup>	1.27±0.03 <sup>c</sup>
甘氨酸 Gly	130	0.95±0.01 <sup>a</sup>	0.81±0.06 <sup>a</sup>	0.67±0.15 <sup>a</sup>	0.85±0.01 <sup>a</sup>	0.61±0.00 <sup>b</sup>	0.50±0.04 <sup>b</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	0.57±0.03 <sup>b</sup>	0.57±0.03 <sup>b</sup>
精氨酸 Arg	50	3.83±0.13 <sup>a</sup>	3.56±0.10 <sup>a</sup>	3.38±0.83 <sup>a</sup>	3.51±0.52 <sup>a</sup>	3.84±0.09 <sup>c</sup>	3.40±0.03 <sup>b</sup>	2.97±0.03 <sup>a</sup>	4.24±0.16 <sup>d</sup>	4.24±0.16 <sup>d</sup>
丙氨酸 Ala	60	2.06±0.05 <sup>b</sup>	3.13±0.05 <sup>c</sup>	1.28±0.21 <sup>a</sup>	2.29±0.10 <sup>b</sup>	2.29±0.00 <sup>b</sup>	2.31±0.06 <sup>b</sup>	1.59±0.06 <sup>a</sup>	1.72±0.03 <sup>a</sup>	1.72±0.03 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lys	50	1.43±0.02 <sup>b</sup>	1.21±0.15 <sup>ab</sup>	0.73±0.26 <sup>a</sup>	1.06±0.16 <sup>ab</sup>	0.75±0.01 <sup>b</sup>	1.00±0.02 <sup>c</sup>	0.64±0.01 <sup>a</sup>	0.90±0.05 <sup>c</sup>	0.90±0.05 <sup>c</sup>
AMP	50	0.52±0.04 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.59±0.08 <sup>a</sup>	0.55±0.05 <sup>a</sup>	10.88±0.59 <sup>a</sup>	15.05±0.46 <sup>b</sup>	17.62±0.83 <sup>c</sup>	17.20±0.33 <sup>bc</sup>	17.20±0.33 <sup>bc</sup>
GMP	12.5	0.93±0.07 <sup>b</sup>	1.25±0.10 <sup>c</sup>	0.50±0.06 <sup>a</sup>	0.61±0.01 <sup>a</sup>	4.08±0.43 <sup>a</sup>	5.27±0.06 <sup>ab</sup>	5.34±0.42 <sup>b</sup>	4.74±0.00 <sup>ab</sup>	4.74±0.00 <sup>ab</sup>
EUC/(g MSG/100 g)		2.44±0.00 <sup>a</sup>	3.68±0.28 <sup>a</sup>	2.60±0.31 <sup>a</sup>	3.37±0.26 <sup>a</sup>	14.03±1.13 <sup>a</sup>	22.02±0.40 <sup>b</sup>	17.20±2.34 <sup>ab</sup>	17.74±0.52 <sup>ab</sup>	17.74±0.52 <sup>ab</sup>

表 8 不同养殖水域中华绒螯蟹游离脂肪酸含量  
Tab.8 Content of free fatty acid in edible parts of *E. sinensis* in different regions/(mg/100 g)

游离脂肪酸 Free fatty acid	蟹膏 Crab paste						蟹黄 Crab yolk							
	阳澄湖 Yangcheng Lake		固城湖 Gucheng Lake		太湖 Tai Lake		兴化 Xinghua		固城湖 Gucheng Lake		太湖 Tai Lake		兴化 Xinghua	
	Yangcheng Lake	Gucheng Lake	Gucheng Lake	Tai Lake	Tai Lake	Xinghua	Yangcheng Lake	Gucheng Lake	Gucheng Lake	Tai Lake	Tai Lake	Xinghua	Xinghua	
月桂酸 C12:0	6.72±0.05 <sup>b</sup>	4.36±0.03 <sup>a</sup>	6.88±0.13 <sup>b</sup>	6.77±0.01 <sup>b</sup>	5.72±0.30 <sup>a</sup>	10.36±0.50 <sup>b</sup>	6.71±0.07 <sup>a</sup>	6.64±0.03 <sup>a</sup>	6.71±0.07 <sup>a</sup>	6.71±0.07 <sup>a</sup>	6.71±0.07 <sup>a</sup>	6.64±0.03 <sup>a</sup>	6.64±0.03 <sup>a</sup>	
肉豆蔻酸 C14:0	36.66±0.50 <sup>c</sup>	26.07±0.12 <sup>b</sup>	20.51±0.09 <sup>a</sup>	25.00±0.51 <sup>b</sup>	35.89±0.28 <sup>b</sup>	87.06±1.85 <sup>d</sup>	49.27±0.66 <sup>c</sup>	31.14±0.07 <sup>a</sup>	49.27±0.66 <sup>c</sup>	49.27±0.66 <sup>c</sup>	49.27±0.66 <sup>c</sup>	31.14±0.07 <sup>a</sup>	31.14±0.07 <sup>a</sup>	
肉豆蔻烯酸 C14:1	7.08±0.03 <sup>c</sup>	3.02±0.05 <sup>a</sup>	7.84±0.05 <sup>d</sup>	4.23±0.02 <sup>b</sup>	7.18±0.03 <sup>d</sup>	4.90±0.01 <sup>c</sup>	3.94±0.05 <sup>b</sup>	2.93±0.04 <sup>a</sup>	3.94±0.05 <sup>b</sup>	3.94±0.05 <sup>b</sup>	3.94±0.05 <sup>b</sup>	2.93±0.04 <sup>a</sup>	2.93±0.04 <sup>a</sup>	
十五烷酸 C15:0	9.83±0.05 <sup>d</sup>	6.41±0.01 <sup>a</sup>	6.96±0.07 <sup>c</sup>	6.67±0.02 <sup>b</sup>	8.32±0.02 <sup>b</sup>	15.51±0.06 <sup>d</sup>	9.35±0.01 <sup>c</sup>	5.89±0.03 <sup>a</sup>	9.35±0.01 <sup>c</sup>	9.35±0.01 <sup>c</sup>	9.35±0.01 <sup>c</sup>	5.89±0.03 <sup>a</sup>	5.89±0.03 <sup>a</sup>	
棕榈酸 C16:0	343.38±1.19 <sup>d</sup>	182.01±1.10 <sup>a</sup>	271.99±0.90 <sup>b</sup>	307.17±1.68 <sup>c</sup>	367.47±1.98 <sup>b</sup>	451.39±1.10 <sup>c</sup>	513.04±2.88 <sup>d</sup>	267.20±2.10 <sup>a</sup>	513.04±2.88 <sup>d</sup>	513.04±2.88 <sup>d</sup>	513.04±2.88 <sup>d</sup>	267.20±2.10 <sup>a</sup>	267.20±2.10 <sup>a</sup>	
棕榈油酸 C16:1	141.16±0.60 <sup>c</sup>	137.30±1.14 <sup>c</sup>	121.68±1.59 <sup>b</sup>	106.29±1.10 <sup>a</sup>	200.77±0.63 <sup>b</sup>	257.56±1.40 <sup>d</sup>	248.00±2.81 <sup>c</sup>	126.09±0.80 <sup>a</sup>	248.00±2.81 <sup>c</sup>	248.00±2.81 <sup>c</sup>	248.00±2.81 <sup>c</sup>	126.09±0.80 <sup>a</sup>	126.09±0.80 <sup>a</sup>	
十七烷酸 C17:0	7.77±0.02 <sup>d</sup>	2.58±0.02 <sup>a</sup>	4.61±0.01 <sup>b</sup>	5.59±0.04 <sup>c</sup>	8.75±0.06 <sup>c</sup>	8.17±0.05 <sup>b</sup>	9.32±0.05 <sup>d</sup>	3.60±0.04 <sup>a</sup>	9.32±0.05 <sup>d</sup>	9.32±0.05 <sup>d</sup>	9.32±0.05 <sup>d</sup>	3.60±0.04 <sup>a</sup>	3.60±0.04 <sup>a</sup>	
十七碳烯酸 C17:1	15.92±0.07 <sup>d</sup>	7.54±0.05 <sup>a</sup>	9.27±0.06 <sup>b</sup>	12.24±0.03 <sup>c</sup>	21.73±0.60 <sup>b</sup>	21.71±0.61 <sup>b</sup>	22.25±0.06 <sup>b</sup>	8.86±0.11 <sup>a</sup>	22.25±0.06 <sup>b</sup>	22.25±0.06 <sup>b</sup>	22.25±0.06 <sup>b</sup>	8.86±0.11 <sup>a</sup>	8.86±0.11 <sup>a</sup>	
硬脂酸 C18:0	83.31±0.10 <sup>d</sup>	50.56±0.41 <sup>a</sup>	68.58±0.49 <sup>b</sup>	75.84±0.68 <sup>c</sup>	111.24±0.68 <sup>c</sup>	87.01±0.07 <sup>b</sup>	174.70±0.51 <sup>d</sup>	53.81±0.00 <sup>a</sup>	174.70±0.51 <sup>d</sup>	174.70±0.51 <sup>d</sup>	174.70±0.51 <sup>d</sup>	53.81±0.00 <sup>a</sup>	53.81±0.00 <sup>a</sup>	
油酸 C18:1	389.66±0.60 <sup>c</sup>	221.58±0.49 <sup>a</sup>	366.89±1.70 <sup>b</sup>	429.98±0.89 <sup>d</sup>	627.03±1.14 <sup>c</sup>	528.05±1.86 <sup>b</sup>	667.64±2.48 <sup>d</sup>	389.66±0.50 <sup>a</sup>	667.64±2.48 <sup>d</sup>	667.64±2.48 <sup>d</sup>	667.64±2.48 <sup>d</sup>	389.66±0.50 <sup>a</sup>	389.66±0.50 <sup>a</sup>	
亚油酸 C18:2	233.23±1.04 <sup>c</sup>	188.28±1.98 <sup>b</sup>	334.76±0.55 <sup>d</sup>	113.59±1.50 <sup>a</sup>	130.72±0.52 <sup>b</sup>	102.96±2.53 <sup>a</sup>	236.76±1.60 <sup>d</sup>	151.43±1.14 <sup>c</sup>	236.76±1.60 <sup>d</sup>	236.76±1.60 <sup>d</sup>	236.76±1.60 <sup>d</sup>	151.43±1.14 <sup>c</sup>	151.43±1.14 <sup>c</sup>	
α-亚麻酸 C18:3	32.00±0.41 <sup>d</sup>	20.79±0.20 <sup>c</sup>	19.74±0.01 <sup>b</sup>	10.87±0.02 <sup>a</sup>	37.77±0.98 <sup>d</sup>	25.39±1.10 <sup>b</sup>	30.02±0.93 <sup>c</sup>	15.04±0.45 <sup>a</sup>	30.02±0.93 <sup>c</sup>	30.02±0.93 <sup>c</sup>	30.02±0.93 <sup>c</sup>	15.04±0.45 <sup>a</sup>	15.04±0.45 <sup>a</sup>	
花生酸 C20:0	2.64±0.01 <sup>c</sup>	1.22±0.01 <sup>a</sup>	1.84±0.05 <sup>b</sup>	1.79±0.02 <sup>b</sup>	2.57±0.01 <sup>c</sup>	1.99±0.01 <sup>b</sup>	6.49±0.03 <sup>d</sup>	1.33±0.02 <sup>a</sup>	6.49±0.03 <sup>d</sup>	6.49±0.03 <sup>d</sup>	6.49±0.03 <sup>d</sup>	1.33±0.02 <sup>a</sup>	1.33±0.02 <sup>a</sup>	
二十碳烯酸 C20:1	39.06±0.90 <sup>c</sup>	38.08±0.03 <sup>c</sup>	12.53±0.12 <sup>a</sup>	22.91±0.32 <sup>b</sup>	48.91±0.10 <sup>c</sup>	36.00±0.10 <sup>b</sup>	64.38±0.49 <sup>d</sup>	28.92±0.50 <sup>a</sup>	64.38±0.49 <sup>d</sup>	64.38±0.49 <sup>d</sup>	64.38±0.49 <sup>d</sup>	28.92±0.50 <sup>a</sup>	28.92±0.50 <sup>a</sup>	
二十碳二烯酸 C20:2	9.06±0.17 <sup>c</sup>	7.28±0.07 <sup>a</sup>	8.60±0.01 <sup>b</sup>	11.99±0.08 <sup>d</sup>	14.80±0.02 <sup>c</sup>	9.10±0.07 <sup>a</sup>	15.90±0.01 <sup>d</sup>	11.72±0.13 <sup>b</sup>	15.90±0.01 <sup>d</sup>	15.90±0.01 <sup>d</sup>	15.90±0.01 <sup>d</sup>	11.72±0.13 <sup>b</sup>	11.72±0.13 <sup>b</sup>	
花生三烯酸 C20:3	1.06±0.01 <sup>b</sup>	0.96±0.05 <sup>ab</sup>	0.84±0.00 <sup>a</sup>	0.95±0.04 <sup>ab</sup>	1.72±0.01 <sup>b</sup>	1.92±0.03 <sup>c</sup>	0.90±0.01 <sup>a</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>a</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>	
花生四烯酸 C20:4	51.20±0.14 <sup>c</sup>	21.39±0.05 <sup>b</sup>	12.63±0.05 <sup>a</sup>	60.63±0.05 <sup>d</sup>	45.12±0.02 <sup>d</sup>	43.01±0.10 <sup>c</sup>	40.13±0.34 <sup>b</sup>	18.02±0.11 <sup>a</sup>	40.13±0.34 <sup>b</sup>	40.13±0.34 <sup>b</sup>	40.13±0.34 <sup>b</sup>	18.02±0.11 <sup>a</sup>	18.02±0.11 <sup>a</sup>	
二十碳五烯酸 EPA C20:5	143.56±0.55 <sup>c</sup>	389.88±0.76 <sup>d</sup>	117.46±1.37 <sup>b</sup>	111.46±1.27 <sup>a</sup>	130.15±0.56 <sup>c</sup>	116.93±0.47 <sup>b</sup>	196.03±1.02 <sup>d</sup>	54.94±0.75 <sup>a</sup>	196.03±1.02 <sup>d</sup>	196.03±1.02 <sup>d</sup>	196.03±1.02 <sup>d</sup>	54.94±0.75 <sup>a</sup>	54.94±0.75 <sup>a</sup>	
山萘酸 C22:0	2.07±0.01 <sup>b</sup>	2.04±0.00 <sup>b</sup>	1.06±0.05 <sup>a</sup>	2.21±0.00 <sup>c</sup>	1.11±0.01 <sup>a</sup>	1.70±0.01 <sup>b</sup>	2.06±0.00 <sup>c</sup>	1.09±0.00 <sup>a</sup>	2.06±0.00 <sup>c</sup>	2.06±0.00 <sup>c</sup>	2.06±0.00 <sup>c</sup>	1.09±0.00 <sup>a</sup>	1.09±0.00 <sup>a</sup>	
二十二碳烯酸 C22:1	15.32±0.01 <sup>c</sup>	40.99±0.80 <sup>d</sup>	2.14±0.02 <sup>a</sup>	5.94±0.05 <sup>b</sup>	19.56±0.05 <sup>c</sup>	9.57±0.01 <sup>a</sup>	29.34±0.16 <sup>d</sup>	10.36±0.01 <sup>b</sup>	29.34±0.16 <sup>d</sup>	29.34±0.16 <sup>d</sup>	29.34±0.16 <sup>d</sup>	10.36±0.01 <sup>b</sup>	10.36±0.01 <sup>b</sup>	
二十二碳三烯酸 C22:3	1.95±0.00 <sup>b</sup>	6.28±0.07 <sup>c</sup>	1.61±0.01 <sup>a</sup>	6.71±0.02 <sup>d</sup>	5.58±0.07 <sup>c</sup>	5.86±0.02 <sup>d</sup>	4.16±0.01 <sup>b</sup>	2.68±0.03 <sup>a</sup>	5.86±0.02 <sup>d</sup>	5.86±0.02 <sup>d</sup>	5.86±0.02 <sup>d</sup>	2.68±0.03 <sup>a</sup>	2.68±0.03 <sup>a</sup>	
二十二碳四烯酸 C22:4	2.73±0.02 <sup>b</sup>	2.61±0.04 <sup>b</sup>	1.02±0.08 <sup>a</sup>	3.80±0.04 <sup>c</sup>	3.40±0.01 <sup>b</sup>	6.27±0.06 <sup>d</sup>	5.05±0.05 <sup>c</sup>	2.25±0.00 <sup>a</sup>	6.27±0.06 <sup>d</sup>	6.27±0.06 <sup>d</sup>	6.27±0.06 <sup>d</sup>	2.25±0.00 <sup>a</sup>	2.25±0.00 <sup>a</sup>	
二十二碳五烯酸 C22:5	6.66±0.15 <sup>c</sup>	5.04±0.05 <sup>b</sup>	2.01±0.01 <sup>a</sup>	9.94±0.01 <sup>d</sup>	13.77±0.18 <sup>b</sup>	15.91±0.01 <sup>c</sup>	16.47±0.02 <sup>d</sup>	5.20±0.01 <sup>a</sup>	15.91±0.01 <sup>c</sup>	15.91±0.01 <sup>c</sup>	15.91±0.01 <sup>c</sup>	5.20±0.01 <sup>a</sup>	5.20±0.01 <sup>a</sup>	
二十二碳六烯酸 DHAC22:6	176.16±0.50 <sup>c</sup>	116.13±0.47 <sup>a</sup>	116.21±0.30 <sup>a</sup>	139.62±0.52 <sup>b</sup>	211.94±0.85 <sup>c</sup>	143.38±1.09 <sup>b</sup>	280.71±0.56 <sup>d</sup>	103.25±0.74 <sup>a</sup>	143.38±1.09 <sup>b</sup>	143.38±1.09 <sup>b</sup>	143.38±1.09 <sup>b</sup>	103.25±0.74 <sup>a</sup>	103.25±0.74 <sup>a</sup>	
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid	492.38±1.91 <sup>d</sup>	275.26±1.41 <sup>a</sup>	382.43±1.59 <sup>b</sup>	431.05±2.93 <sup>c</sup>	541.07±2.74 <sup>b</sup>	663.19±3.65 <sup>c</sup>	770.94±4.21 <sup>d</sup>	370.70±2.15 <sup>a</sup>	663.19±3.65 <sup>c</sup>	663.19±3.65 <sup>c</sup>	663.19±3.65 <sup>c</sup>	370.70±2.15 <sup>a</sup>	370.70±2.15 <sup>a</sup>	
单不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acid	608.19±2.14 <sup>d</sup>	448.51±2.50 <sup>a</sup>	520.36±3.55 <sup>b</sup>	581.6±2.42 <sup>c</sup>	925.19±2.30 <sup>c</sup>	857.79±3.99 <sup>b</sup>	1035.56±5.74 <sup>d</sup>	566.82±0.96 <sup>a</sup>	857.79±3.99 <sup>b</sup>	857.79±3.99 <sup>b</sup>	857.79±3.99 <sup>b</sup>	566.82±0.96 <sup>a</sup>	566.82±0.96 <sup>a</sup>	
多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acid	657.61±2.99 <sup>c</sup>	758.63±0.32 <sup>d</sup>	614.88±2.21 <sup>b</sup>	469.55±0.52 <sup>a</sup>	594.98±3.23 <sup>c</sup>	470.73±1.78 <sup>b</sup>	826.13±4.51 <sup>d</sup>	365.50±3.38 <sup>a</sup>	470.73±1.78 <sup>b</sup>	470.73±1.78 <sup>b</sup>	470.73±1.78 <sup>b</sup>	365.50±3.38 <sup>a</sup>	365.50±3.38 <sup>a</sup>	
总计 Total	1 758.18±7.04 <sup>c</sup>	1 482.40±3.60 <sup>a</sup>	1 517.67±7.35 <sup>b</sup>	1 482.19±5.86 <sup>a</sup>	2 061.24±8.27 <sup>c</sup>	1 991.72±5.87 <sup>b</sup>	2 632.63±14.46 <sup>d</sup>	1 303.03±6.50 <sup>a</sup>	1 991.72±5.87 <sup>b</sup>	1 991.72±5.87 <sup>b</sup>	1 991.72±5.87 <sup>b</sup>	1 303.03±6.50 <sup>a</sup>	1 303.03±6.50 <sup>a</sup>	



湖蟹总游离脂肪酸含量要大于池塘养殖的兴化蟹。本研究结果可为分析中华绒螯蟹养殖水域的来源和消费者的喜好原因提供一定的参考,也对生产优质中华绒螯蟹和进一步促进中华绒螯蟹产业的发展具有较大的现实意义。

## 参 考 文 献

- Bureau of Fishery and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. 2020 China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [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. 2020 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- CAO R, ZHAO L, WANG L Z, *et al.* Taste characteristic analysis of *Porphyra yezoensis* during different harvest periods: A study based on electronic tongue technology. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 147–154 [曹荣, 赵玲, 王联珠, 等. 基于电子舌技术分析不同采收期紫菜的滋味特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 147–154]
- CHEN J. An empirical analysis on competitiveness and development of Jiangsu hairy crab industry. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009, 1–65 [陈加. 江苏省河蟹产业竞争力与产业发展研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 1–65]
- CHEN X L, HU W, MA C B, *et al.* Effects of clove oil on storage quality of crab cream and shrimp sauce. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 181–191 [陈小雷, 胡王, 马朝彬, 等. 丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏品质的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 181–191]
- DENG W H, ZHAO Y, LI J K, *et al.* The role of free fatty acid in the flavor of several common foods. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(11), 422–425 [邓文辉, 赵燕, 李建科, 等. 游离脂肪酸在几种常见食品风味形成中的作用. *食品工业科技*, 2012, 33(11): 422–425]
- GU J P. Effect of free amino acids on the formation of aroma compounds derived from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) meat. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019, 1–45 [顾吉萍. 游离氨基酸对中华绒螯蟹肌肉香气形成的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019, 1–45]
- HONG H, REGENSTEIN JM, LUO Y K. 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
- HUA Q, GAO P, XU Y S, *et al.* Effect of commercial starter cultures on the quality characteristics of fermented fish-chili paste. *LWT—Food Science and Technology*, 2020, 122: 1–10
- LI N. Effect of water-soluble precursors on the formation of aroma compounds in steamed Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) abdominal meat. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017, 1–67 [李楠. 水溶性风味前体物质对蒸制中华绒螯蟹体肉香气的作用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017, 1–67]
- 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]
- LIU T T, LIANG Z Y, FAN S Q, *et al.* Analysis of characteristic taste components of soldier crab (*Mictyris brevidactylus*). *Food Science*, 2018, 39(14): 236–241 [刘天天, 梁中永, 范思华, 等. 北海沙蟹特征滋味成分的分析. *食品科学*, 2018, 39(14): 236–241]
- MA H J, SHI W Z, SONG J, *et al.* Effects of ultra-high pressure treatment on flavor substances in grass carp. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(8): 204–212 [马海建, 施文正, 宋洁, 等. 超高压处理对草鱼鱼肉风味物质的影响. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 204–212]
- NI Y Q, WU N, WANG X C. Changes of fatty acids composition in gonad of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) during heating process. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(19): 96–100 [倪逸群, 吴娜, 王锡昌. 加热过程中中华绒螯蟹性腺内脂肪酸的变化. *食品工业科技*, 2016, 37(19): 96–100]
- SHAO Y, YU D W, YANG F, *et al.* Comparison of the taste compounds in different grades of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 192–198 [邵洋, 余达威, 杨方, 等. 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]
- WANG J B, WEN L, LI Z P, *et al.* Analysis and evaluation of the characteristic taste components in *Portobello mushroom*. *Journal of Food Science*, 2018, 83(6): 1542–1551
- WANG S, HE Y, WANG Y Y, *et al.* Comparison of flavour qualities of three sourced *Eriocheir sinensis*. *Food Chemistry*, 2016, 200: 24–31
- WANG X, HAN G, ZHANG X J, *et al.* Nutritional composition and flavor components of male Chinese mitten handed crab *Eriocheir sinensis* from different waters. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(5): 688–696 [王潇, 韩刚, 张小军, 等. 不同水域中华绒螯蟹雄体营养成分及风味成分差异性研究. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(5): 688–696]
- WU N. Formation mechanism of key odorants derived from lipid oxidation and degradation in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2017, 1–103 [吴娜. 基于脂质热氧化降解解析中华绒螯蟹关键香气物质的形成机制. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2017, 1–103]
- XU Y S, LI L, REGENSTEIN J M, *et al.* The contribution of autochthonous microflora on free fatty acids release and flavor development in low-salt fermented fish. *Food Chemistry*, 2018, 256: 259–267
- 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 J Q, ZHANG L, WANG X C. Effects of rice culture and pond culture on the quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir*

- sinensis*). Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(13): 229–236 [张家奇, 张龙, 王锡昌. 稻田养殖和池塘养殖对中华绒螯蟹滋味品质的影响. 食品工业科技, 2017, 38(13): 229–236]
- ZHANG N. Study on flavor compounds of Chinese mitten crab. Master's Thesis of Jiangnan University, 2008, 1–46 [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, 1–46]
- ZHANG T Q, ZHOU G, ZHOU Q S, *et al.* Comparison and analysis of fatty acid composition of *Eriocheir sinensis* in different proliferation and culturing mode. Freshwater Fisheries, 2007, 37(1): 53–57 [张彤晴, 周刚, 朱清顺, 等. 不同增殖模式中华绒螯蟹脂肪酸比较分析. 淡水渔业, 2007, 37(1): 53–57]
- ZHENG H B. Analysis and comparison of the Chinese mitten crab. Master's Thesis of Jiangnan University, 2008, 1–59 [郑海波. 中华绒螯蟹的品质分析与比较. 江南大学硕士研究生学位论文, 2008, 1–59]

(编辑 陈 辉)

## Analysis of Flavor Compounds of Chinese Mitten Crabs (*Eriocheir sinensis*) from Different Regions

GUO Honghui<sup>1,2</sup>, YANG Fang<sup>1,2①</sup>, GAO Pei<sup>1,2</sup>, YU Dawei<sup>1,2</sup>,  
XU Yanshun<sup>1,2</sup>, JIANG Qixing<sup>1,2</sup>, XIA Wenshui<sup>1,2①</sup>

(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 edible yield and flavor characteristics of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) from four regions in Jiangsu Province, China, to provide a theoretical basis and guidance for understanding consumer preference. For this, representative authentic Chinese mitten crabs from Yangcheng Lake, Gucheng Lake, Tai Lake, and Xinghua were used. The edible yield, flavor profiles, free amino acids, flavor nucleotides, and free fatty acids were measured, and the degree of flavor was evaluated using the taste activity value and equivalent umami concentration (EUC). The results showed that Tai Lake crabs had the highest edible yield [(33.08±0.31)% in male crabs, (37.65±1.09)% in females]. Yangcheng Lake and Gucheng Lake crabs had similar flavor profiles, as did Tai Lake and Xinghua crabs; however, Yangcheng Lake and Gucheng Lake crabs were sweeter, whereas Tai Lake and Xinghua crabs had a better umami flavor, although their bitterness and astringency were also high. Yangcheng Lake crabs had the highest sweet amino acid content in whole edible parts, male crab meat, female crab meat, and crab yolk: (676.65±1.30) mg/100 g, (899.00±2.88) mg/100 g, (950.34±4.78) mg/100 g, and (309.86±0.73) mg/100 g, respectively. Whole edible parts and male crab meat from Tai Lake crabs had the highest umami amino acid content [(98.06±4.07) mg/100 g and (123.76±6.72) mg/100 g, respectively] and the highest EUC values [(11.62±0.66) g MSG/100 g and (15.29±2.58) g MSG/100 g, respectively]. Finally, total free fatty acids in Yangcheng Lake, Gucheng Lake, and Tai Lake crabs were higher than those in Xinghua crabs. In conclusion, the results indicate differences in the edible yield and flavor of Chinese mitten crabs from different locations. Overall, Yangcheng Lake crabs had the most prominent sweet flavor. Tai Lake crabs had the highest edible yield and their flavor profiles included a marked degree of umami; however, they also had a bitter flavor. Umami flavor was present in female crab meat and crab yolk from Yangcheng Lake and Gucheng Lake, in addition to male crab meat and crab paste of Tai Lake and Xinghua.

**Key words** Chinese mitten crab; Different regions; Edible yield; Taste profile; Free amino acids; Flavor nucleotides; Free fatty acids

① Corresponding author: YANG Fang, E-mail: yangfang\_8\_9@126.com; XIA Wenshui, E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201228001

http://www.yykxjz.cn/

王凤霞, 张姗姗, 张轩铭, 王利振, 张梦启, 李培海, 李晓彬, 刘可春, 邢澍. 山东 4 种常见虾虾头品质分析与评价. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 228–235

WANG F X, ZHANG S S, ZHANG X M, WANG L Z, ZHANG M Q, LI P H, LI X B, LIU K C, XING S. Analysis and evaluation of shrimp head quality from four common shrimp species in Shandong Province, China. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 228–235

## 山东 4 种常见虾虾头品质分析与评价\*

王凤霞<sup>1</sup> 张姗姗<sup>1</sup> 张轩铭<sup>1</sup> 王利振<sup>1</sup> 张梦启<sup>1</sup>  
李培海<sup>1</sup> 李晓彬<sup>1,2①</sup> 刘可春<sup>1①</sup> 邢澍<sup>3</sup>

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省科学院生物研究所 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心 山东 济南 250103; 2. 山东省生物工程技术创新中心 山东 菏泽 274000; 3. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 化学与制药学院 山东 济南 250353)

**摘要** 为了充分利用虾头废弃物资源, 本研究以山东 4 种常见虾——克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、中国对虾(*Penaeus orientalis*)及凡纳滨对虾(*Litopenaeus vanmamei*)鲜虾头为原料, 测定了不同来源虾头的蛋白质、氨基酸、磷脂、虾青素和甲壳素含量, 从而对这 4 种虾头品质进行营养成分分析及品质评价。结果显示, 4 种虾头副产物所占比例较高, 其中, 日本对虾、中国对虾和凡纳滨对虾 3 种对虾虾头占比达到 40%左右, 克氏原螯虾虾头占比甚至达到 85.52%; 4 种虾头蛋白质含量丰富, 约占鲜虾头质量的 12.47%~14.91%; 4 种虾头蛋白中人体必需氨基酸含量达到 40%以上, 且鲜、甜味氨基酸含量较高; 日本对虾、中国对虾及凡纳滨对虾 3 种对虾虾头中磷脂含量远高于克氏原螯虾, 达到 12.38~15.00 mg/g, 而克氏原螯虾仅为 3.39 mg/g; 虾青素含量以凡纳滨对虾和日本对虾虾头中含量较高, 分别达到 68.46 和 61.62 μg/g, 中国对虾为 41.42 μg/g, 克氏原螯虾则为 30.71 μg/g; 而克氏原螯虾虾头的甲壳素含量约为 3 种对虾虾头的 3 倍, 达到 4.67%左右。由此可见, 4 种虾头中含有丰富的蛋白质和氨基酸, 而不同品种虾头中磷脂、虾青素及甲壳素等成分含量差异较大, 可针对不同来源的虾头进行有针对性的高附加值成分的开发利用。

**关键词** 虾头; 成分分析; 品质评价

**中图分类号** S985.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0228-08

虾头是冷冻虾仁加工过程中最主要的废弃物, 约占整个虾体质量的 35%~45% (Cao *et al*, 2014)。据《中国渔业统计年鉴 2020》(农业农村部渔业渔政管理局, 2020)报道, 2019 年我国海虾和淡水虾养殖和捕捞产量达 600 万 t 以上, 其中, 约有 48.7 万 t 的对虾和 50.99 万 t 的克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)被加

工成去头、壳的虾仁, 由此产生的虾头废弃物在 30 万 t 以上。近年来, 对虾头废弃物的研究较为热门, 主要原因有 2 个: 一是虾头废弃物极易腐败变质, 造成严重的环境污染(Hossain *et al*, 2018); 二是虾头中富含蛋白质/肽(Guo *et al*, 2019; Jiang *et al*, 2020; Prameela *et al*, 2017)、氨基酸(Suparmi *et al*, 2020)、甲

\* 山东省重点研发计划项目(2019GSF107053)和齐鲁工业大学(山东省科学院)青年博士合作基金项目(2017BSH2017)共同资助 [This work was supported by the grants from the Key Research and Development Program of Shandong (2019GSF107053), and the Young Doctoral Collaborative Fund (2017BSH2017) of Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences)]. 王凤霞, E-mail: hai919@126.com

① 通讯作者: 李晓彬, 副研究员, E-mail: lixb@sdas.org; 刘可春, 研究员, E-mail: hliukch@sdas.org

收稿日期: 2020-12-28, 收修改稿日期: 2021-01-12

壳素(Guo *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020)、类胡萝卜素(尤其是虾青素)(Gómez-Guillén *et al.*, 2018; Prameela *et al.*, 2017; Núñez-Gastélum *et al.*, 2016)和磷脂(Li *et al.*, 2018; 崔益玮等, 2018; 李晓彬等, 2018)等营养成分及生物活性物质。蛋白质及其水解产物氨基酸等是人体最重要的营养素之一, 磷脂和虾青素因具有天然抗氧化活性而备受青睐, 而甲壳素则被人们称为人体必需的“第六生命要素”。目前, 虾头废弃物多被用作动物饲料、肥料或生产虾头酱等调味品, 产品附加值不高, 如能充分利用这些虾头废弃物生产蛋白/肽、磷脂、虾青素和甲壳素等高附加值产物, 既可以减少环境污染, 还能产生非常可观的经济效益, 可谓一举两得。

据《中国渔业统计年鉴 2020》报道, 克氏原螯虾是全国养殖面积最大的淡水虾, 而凡纳滨对虾(*Litopenaeus vanmamei*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)和中国对虾(*Penaeus orientalis*)占全国虾类海水养殖面积的 87%以上, 也是山东养殖规模最大的 4 种虾(姜燕等, 2019)。目前, 尚未有对这 4 种虾头原料品质进行评价的报道。为了充分利用虾头资源, 本研究对山东这 4 种代表性虾的新鲜虾头进行蛋白质、氨基酸、磷脂、虾青素以及甲壳素等营养成分分析, 并通过对其营养品质的评价来评估各类虾头的开发利用价值。同时, 通过比较各类虾头中的营养成分差异, 为不同品种虾头资源开展有针对性的高值化利用提供理论依据, 以期进一步促进虾类养殖、加工产业的发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

**1.1.1 材料** 虾头原料: 4 种鲜虾原料 2019 年 10 月中旬购于山东省济南海鲜大市场; 克氏原螯虾产自山东省济宁市鱼台县; 日本对虾、中国对虾和凡纳滨对虾均产自山东日照。清洗后切取虾头, 于-18℃冰箱冷冻保存备用。

牛血清  $\gamma$ -球蛋白: 上海源叶生物科技有限公司; 虾青素标准品: Carote Nature 公司, 瑞士; 抗坏血酸、考马斯亮蓝 G250: 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 仪器设备** DS-200 电动高速组织捣碎机, 江苏江阴科研仪器厂; TS-100C 台式恒温摇床, 江苏常州市金坛高科仪器厂; Allegra 64R 高速冷冻离心机, BECKMAN 公司, 美国; TD6M 台式低速离心机, 湖南湘立科学仪器有限公司; UV-2100 紫外可见分光光度计, UNICO 公司, 美国; LGJ-10 实验型真空冷

冻干燥机, 北京松源华兴生物技术有限公司; SPD-20A 高效液相色谱仪, 岛津仪器(苏州)有限公司; DHG-9070A 鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; 高速多功能粉碎机, 上海缘沃工贸有限公司; 海尔 BCD-455WLDPC 冰箱, 青岛海尔; Sartorius BS224S 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 虾头占全虾质量比测定** 4 种虾分别随机选取 5 只, 在切取虾头前后分别称量全虾质量及其虾头质量, 计算每种虾的虾头占全虾质量比。

**1.2.2 粗蛋白提取及含量测定** 从冰箱取出冷冻虾头, 解冻后迅速称取 100.00 g 左右, 切小块, 先加入少量预冷生理盐水, 用高速组织搅碎机搅碎, 再加入大约 5 倍体积( $m/v$ )的预冷生理盐水匀浆, 匀浆液 4℃浸提过夜, 8 层纱布过滤, 滤液于 4℃、10 000 r/min 条件下离心 15 min, 小心刮去上层油脂, 收集上清液, 弃沉淀。上清液即为虾头粗蛋白提取液, 精确量取其体积后分装至小瓶中, 于-18℃保存备用(王凤霞, 2013)。

蛋白质含量测定方法采用 Bradford 法(Cheng *et al.*, 2016), 以牛血清  $\gamma$ -球蛋白作为标准蛋白, 以考马斯亮蓝 G250 作为染色剂, 测定溶液在 595 nm 处的吸光度, 以吸光度值为纵坐标, 以蛋白浓度(mg/mL)为横坐标, 得蛋白标准曲线为  $y=0.5366x-0.0002$  ( $R^2=0.9988$ )。然后, 对虾头粗蛋白提取液进行适当稀释后测定稀释液在 595 nm 处的吸光度值, 由标准曲线求算稀释液的蛋白质含量(mg/mL), 虾头蛋白质含量比按公式(1)计算:

$$\text{蛋白质含量}(\%) = \frac{c_1 \times D_1 \times V_1}{1000 \times m} \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $c_1$  表示根据吸光度值计算出的稀释液的蛋白质溶液质量浓度(mg/mL);  $D_1$  表示粗蛋白提取液稀释倍数;  $V_1$  表示粗蛋白提取液体积(mL);  $m$  表示所用鲜虾头质量(g)。

**1.2.3 氨基酸种类及含量测定** 粗蛋白样品用真空冷冻干燥机制成冻干粉, 测定方法参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》。

**1.2.4 磷脂提取及含量测定** 称取大约 100.00 g 解冻虾头并搅碎, 用 7 倍体积( $m/v$ )的 95%乙醇振荡提取(室温、90 r/min)约 16 h, 提取液离心(5000 r/min, 15 min)后收集上清液, 即为虾头磷脂提取液, 精确量取其体积后迅速分装至小瓶中, 于 4℃下保存备用(Li *et al.*, 2018)。

虾头磷脂含量的测定采用紫外分光光度法(袁延强等, 2011)。对虾头磷脂提取液先进行适当稀释, 稀释液取样测定体积为 0.2 mL, 进行消化、中和、

显色后测定其在 820 nm 处的吸光度值,由磷标准曲线  $y=0.8458x+0.0057$  ( $R^2=0.9998$ )求得稀释液的含磷量,据公式(2)求得虾头磷脂含量:

$$\text{磷脂含量(mg/g)} = \frac{c_2 \times 10 \times 26.3 \times D_2 \times V_2}{0.2 \times 1000 \times m} \quad (2)$$

式中,  $c_2$  表示根据吸光度值计算出的稀释液的含磷量( $\mu\text{g/mL}$ );  $D_2$  表示磷脂提取液稀释倍数;  $V_2$  表示磷脂提取液体积( $\text{mL}$ );  $m$  表示所用鲜虾头质量( $\text{g}$ )。

**1.2.5 虾青素提取及含量测定** 制备方法与 1.2.4 节磷脂提取液基本一致,区别在于提取溶剂为二氯甲烷。

虾头虾青素含量测定参照相关文献(高岩等, 2020)。以二氯甲烷作为溶剂,虾头虾青素提取液进行适当稀释后测定稀释液在 472 nm 波长下的吸光度值,由虾青素标准曲线  $y=0.1818x+0.017$  ( $R^2=0.9974$ )求得稀释液虾青素含量,据公式(3)求得虾头虾青素含量:

$$\text{虾青素含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{c_3 \times D_3 \times V_3}{m} \quad (3)$$

式中,  $c_3$  表示根据吸光度值计算出的稀释液的虾青素含量( $\mu\text{g/mL}$ );  $D_3$  表示虾青素提取液稀释倍数;  $V_3$  表示虾青素提取液体积( $\text{mL}$ );  $m$  表示所用鲜虾头质量( $\text{g}$ )。

**1.2.6 甲壳素制备及含量测定** 甲壳素的制备及含量测定方法参见张巧等(2020),即称取大约 100.00 g 解冻虾头(质量为  $m_1$ ),于 50℃ 干燥至恒重,粉碎、称重( $m_2$ )后备用。分别称取 10.00 g 虾头细粉( $m_3$ ),加入 1.5 mol/L HCl(料液比 1:40)浸泡 6 h,进行脱钙处理,用清水洗至中性;再用质量分数为 2% 的 NaOH 溶液(料液比 1:30)浸泡处理 24 h,脱除蛋白质和脂类等大分子,用清水洗至中性,得到颜色略深的絮状物;接着用质量分数为 10% 的 NaOH 溶液(料液比 1:20)浸泡处理 4 h,至絮状物呈现白色,用清水洗至中性,50℃ 烘干至恒重,得到纯甲壳素,称重( $m_4$ )。

虾头甲壳素含量测定按公式(4)计算:

$$\text{甲壳素含量}(\%) = \frac{m_2 \times m_4}{m_1 \times m_3} \times 100\% \quad (4)$$

### 1.3 数据处理方法

每个试验重复 3 次,结果以 Mean±SD 表示。采用 Graphpad prism V6.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),显著性水平  $P<0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 4 种虾头占全虾质量比

4 种虾头占全虾质量比情况见表 1。由表 1 可见,克氏原螯虾虾头占全虾质量比最高,达到 85.52% 左右( $P<0.05$ );其他 3 种虾头占全虾质量比亦高达 36.77%~42.35%。

### 2.2 4 种虾头中蛋白质、磷脂、虾青素和甲壳素含量比较

为了探明 4 种虾头废弃物中蛋白质、磷脂、虾青素及甲壳素含量的差异,分别对其进行了的比较分析,其结果见表 2。

由表 2 可以看出,4 种虾头废弃物中蛋白含量都比较丰富,约占虾头质量的 12.47%~14.91%。克氏原螯虾与凡纳滨对虾、日本对虾与中国对虾之间虾头蛋白含量差异不显著,而这 2 组虾头之间蛋白含量有显著性差异( $P<0.05$ )。

不同品种虾头废弃物中磷脂含量差异较大( $P<0.05$ )。其中,日本对虾最高,达到(15.00±0.13) mg/g;中国对虾和凡纳滨对虾分别为(12.38±0.16) mg/g 和(12.61±0.23) mg/g;克氏原螯虾虾头废弃物中磷脂含量远远低于其他 3 种虾,仅为(3.39±0.09) mg/g。

4 种虾头废弃物中虾青素含量以凡纳滨对虾为最高,达到(68.46±1.28)  $\mu\text{g/g}$ ;其次为日本对虾,为(61.62±1.59)  $\mu\text{g/g}$ ;中国对虾为(41.42±1.03)  $\mu\text{g/g}$ ;而克氏原螯虾仅为(30.71±1.23)  $\mu\text{g/g}$ 。不同品种来源虾头中虾青素含量差异显著( $P<0.05$ )。

表 1 4 种虾头占全虾质量比

Tab.1 Proportions of the head to whole body in four kinds of shrimps

品种 Species	全虾 Whole shrimp/g	虾头 Shrimp head/g	虾头/全虾 Head/Whole shrimp/%
克氏原螯虾 <i>P. clarkia</i>	38.15±5.07	32.59±4.02	85.52±0.91 <sup>a</sup>
日本对虾 <i>P. japonicus</i>	70.29±3.28	28.58±1.21	40.67±0.80 <sup>b</sup>
中国对虾 <i>P. orientalis</i>	48.19±3.27	20.41±1.42	42.35±0.29 <sup>b</sup>
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	30.05±1.29	11.05±0.69	36.77±1.20 <sup>c</sup>

注: 同列数据肩标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

Note: In the same column, values with different small letter superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ). The same as below



表 2 4 种虾头中蛋白质、磷脂、虾青素和甲壳素含量比较

Tab.2 Comparison of protein, phospholipids, astaxanthin, and chitin contents in the four kinds of fresh shrimp heads

品种 Species	蛋白含量 Protein contents/%	磷脂含量 Phospholipids contents/(mg/g)	虾青素含量 Astaxanthin contents/( $\mu\text{g/g}$ )	甲壳素含量 Chitin contents/%
克氏原螯虾 <i>P. clarkia</i>	12.47 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	3.39 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	30.71 $\pm$ 1.23 <sup>d</sup>	4.67 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
日本对虾 <i>P. japonicus</i>	14.91 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	15.00 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	61.62 $\pm$ 1.59 <sup>b</sup>	1.63 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
中国对虾 <i>P. orientalis</i>	14.43 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	12.38 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	41.42 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>	1.77 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
凡纳滨对虾 <i>L. vanmamei</i>	12.97 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	12.61 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	68.46 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>

甲壳素含量则以克氏原螯虾虾头废弃物中为最高, 占到虾头鲜重的(4.67 $\pm$ 0.16)%; 而日本对虾、中国对虾以及凡纳滨对虾分别占比(1.63 $\pm$ 0.11)%、(1.77 $\pm$ 0.13)%和(1.70 $\pm$ 0.18)%。3 种对虾虾头废弃物中甲壳素含量差异不显著, 但都与克氏原螯虾虾头之间差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.3 4 种虾头氨基酸成分与含量比较

食品中蛋白质营养价值的高低, 主要取决于其所含氨基酸的组成与含量(赵亭亭等, 2018)。4 种鲜虾头蛋白提取物中 17 种水解氨基酸的含量结果见表 3。由表 3 数据可以看出, 4 种鲜虾头氨基酸种类齐全, 其中, 人体必需氨基酸含量占到 40%以上, 日本对虾甚至达到 46.78%左右。4 种鲜虾头中必需氨基酸含量较高的 5 种氨基酸为赖氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸; 4 种鲜虾头中鲜味氨基酸——谷氨酸含量是 17 种氨基酸中含量最高的, 其中, 日本对虾鲜虾头中谷氨酸相对含量最高, 达到(14.68 $\pm$ 0.05) mg/g ( $P<0.05$ ), 中国对虾和凡纳滨对虾含量接近, 约为(13.33 $\pm$ 0.06)和(13.06 $\pm$ 0.06) mg/g, 克氏原螯虾为 12.53 mg/g ( $P<0.05$ )。日本对虾、中国对虾以及凡纳滨对虾鲜虾头鲜、甜味氨基酸约占总氨基酸的 40%, 而克氏原螯虾达到 48.52%左右, 与 3 种对虾间差异显著( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 虾头废弃物进行开发利用的必要性

虾头是虾仁加工过程中最主要的副产物, 以前常被当作废物扔掉或用作动物饲料、肥料等。结果表明, 所研究的 4 种虾头副产物占整个虾体质量的比例较高, 克氏原螯虾虾头甚至占全虾质量的 85%左右, 而日本对虾、中国对虾以及凡纳滨对虾 3 种对虾虾头占

全虾质量的 40%左右。若将虾头直接废弃, 不仅容易造成环境污染, 还容易造成资源的极大浪费, 因此, 非常有必要对虾头废弃物资源进行充分的开发利用。

### 3.2 虾头废弃物资源进行相关蛋白质水解物/肽、氨基酸产品开发的可行性

冷冻虾加工过程中产生的蛋白水解物是最主要的环境污染源(Prameela *et al*, 2017)。本研究 4 种虾头中蛋白含量都比较丰富, 约占鲜虾头质量的 12.47%~14.91%。虾头蛋白水解后得到的氨基酸中, 人体必需氨基酸含量占 40%以上, 日本对虾甚至达到 46.78%左右; 且 3 种对虾虾头中, 鲜、甜味氨基酸约占总氨基酸的 40%, 克氏原螯虾甚至达到 48.52%左右。Nirmal 等(2020)研究表明, 当虾头废弃物被蛋白酶水解时, 70%以上的蛋白质以蛋白水解物形式得到回收。蛋白水解物、多肽或氨基酸除作为营养素外, 因其具有抗氧化及抗菌(Djellouli *et al*, 2020)、血管紧张素转化酶(ACE)抑制(Gao *et al*, 2014)和  $\beta$ -分泌酶抑制(Li-Chan *et al*, 2016)等活性, 还可广泛应用于医药和化妆品等行业。目前, 利用微生物发酵法或蛋白酶水解法生产活性肽及氨基酸的技术已非常成熟, 因此, 可以考虑利用这样的技术对廉价的虾头废弃物资源进行蛋白水解物/肽及氨基酸等产品的开发。

### 3.3 虾头废弃物作为提取磷脂、虾青素原料来源的可行性

磷脂和虾青素均属于脂溶性活性成分。磷脂是一种天然抗氧化剂, 像大豆卵磷脂已被广泛用作功能性保健食品。而海洋来源的磷脂因侧链部分含有二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)这种  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸(PUFA), 被认为比大豆来源的磷脂营养价值更高(Shen *et al*, 2021), 因此, 常被作为功能性保健食品的活性成分进行开发利用(Wang *et al*, 2020)。

表 3 4 种虾头氨基酸含量比较  
Tab.3 Comparison of amino acid contents in the four kinds of fresh shrimp heads

氨基酸种类 Amino acid type	氨基酸名称 Amino acid name	虾头氨基酸含量 Amino acid content in shrimp head/(mg/g)				
		克氏原螯虾 <i>P. clarkia</i>	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	中国对虾 <i>P. orientalis</i>	凡纳滨对虾 <i>L. vanmamei</i>	
必需氨基酸 Essential amino acid (EAA)	赖氨酸 Lys	5.13±0.02 <sup>d</sup>	10.05±0.04 <sup>a</sup>	9.02±0.04 <sup>b</sup>	8.83±0.04 <sup>c</sup>	
	苯丙氨酸 Phe	4.30±0.04 <sup>c</sup>	6.51±0.02 <sup>a</sup>	5.43±0.03 <sup>b</sup>	5.41±0.04 <sup>b</sup>	
	甲硫氨酸 Met <sup>▲</sup>	1.34±0.01 <sup>d</sup>	2.65±0.03 <sup>a</sup>	2.13±0.02 <sup>b</sup>	1.93±0.01 <sup>c</sup>	
	苏氨酸 Thr <sup>▲</sup>	2.46±0.02 <sup>c</sup>	1.93±0.02 <sup>d</sup>	3.43±0.02 <sup>a</sup>	3.09±0.02 <sup>b</sup>	
	异亮氨酸 Ile	3.73±0.03 <sup>d</sup>	5.61±0.03 <sup>a</sup>	4.80±0.04 <sup>b</sup>	4.42±0.04 <sup>c</sup>	
	亮氨酸 Leu	6.24±0.03 <sup>d</sup>	8.29±0.05 <sup>a</sup>	7.46±0.03 <sup>b</sup>	7.13±0.03 <sup>c</sup>	
	缬氨酸 Val	3.97±0.04 <sup>c</sup>	5.62±0.05 <sup>a</sup>	4.65±0.03 <sup>b</sup>	4.60±0.05 <sup>b</sup>	
	酪氨酸 Tyr	1.95±0.02 <sup>b</sup>	1.64±0.02 <sup>c</sup>	3.35±0.02 <sup>a</sup>	3.32±0.02 <sup>a</sup>	
	非必需氨基酸 Nonessential amino acid (NEAA)	丙氨酸 Ala <sup>▲</sup>	5.26±0.02 <sup>b</sup>	6.10±0.03 <sup>a</sup>	5.33±0.03 <sup>b</sup>	5.28±0.03 <sup>b</sup>
		脯氨酸 Pro	2.98±0.04 <sup>d</sup>	4.30±0.03 <sup>c</sup>	6.02±0.05 <sup>a</sup>	5.40±0.04 <sup>b</sup>
组氨酸 His		2.70±0.03 <sup>a</sup>	2.12±0.03 <sup>c</sup>	2.22±0.03 <sup>c</sup>	2.48±0.03 <sup>b</sup>	
精氨酸 Arg		2.18±0.03 <sup>d</sup>	7.95±0.06 <sup>b</sup>	9.89±0.04 <sup>a</sup>	7.27±0.06 <sup>c</sup>	
丝氨酸 Ser <sup>▲</sup>		2.09±0.02 <sup>b</sup>	1.36±0.03 <sup>c</sup>	2.20±0.02 <sup>b</sup>	2.77±0.03 <sup>a</sup>	
胱氨酸 Cys		0.72±0.02 <sup>c</sup>	0.60±0.03 <sup>d</sup>	1.17±0.02 <sup>a</sup>	1.02±0.02 <sup>b</sup>	
甘氨酸 Gly <sup>▲</sup>		3.73±0.04 <sup>c</sup>	5.81±0.04 <sup>a</sup>	5.48±0.03 <sup>b</sup>	5.78±0.04 <sup>a</sup>	
天冬氨酸 Asp <sup>●</sup>		5.45±0.02 <sup>c</sup>	3.25±0.03 <sup>d</sup>	7.42±0.03 <sup>b</sup>	7.93±0.05 <sup>a</sup>	
谷氨酸 Glu <sup>●</sup>	12.53±0.05 <sup>c</sup>	14.68±0.05 <sup>a</sup>	13.33±0.06 <sup>b</sup>	13.06±0.06 <sup>b</sup>		
氨基酸总量 Total amino acid (TAA)		67.68±0.10 <sup>d</sup>	89.85±0.19 <sup>c</sup>	94.77±0.35 <sup>a</sup>	91.00±0.21 <sup>b</sup>	
EAA		28.10±0.03 <sup>d</sup>	42.03±0.16 <sup>a</sup>	38.18±0.16 <sup>b</sup>	36.64±0.14 <sup>c</sup>	
NEAA		39.58±0.07 <sup>d</sup>	47.82±0.06 <sup>c</sup>	56.29±0.13 <sup>a</sup>	54.35±0.09 <sup>b</sup>	
鲜味氨基酸 Umami amino acid (UAA)		17.98±0.06 <sup>c</sup>	17.94±0.07 <sup>c</sup>	20.63±0.04 <sup>b</sup>	20.99±0.02 <sup>a</sup>	
甜味氨基酸 Sweet amino acid (SAA)		14.86±0.05 <sup>d</sup>	17.33±0.05 <sup>b</sup>	18.53±0.14 <sup>a</sup>	16.37±0.06 <sup>c</sup>	
UAA+SAA		32.84±0.09 <sup>d</sup>	35.27±0.07 <sup>c</sup>	39.20±0.15 <sup>a</sup>	37.36±0.07 <sup>b</sup>	
EAA/TAA/%		41.52±0.02 <sup>b</sup>	46.78±0.08 <sup>a</sup>	40.29±0.13 <sup>c</sup>	40.27±0.08 <sup>c</sup>	
(UAA+SAA)/TAA/%		48.52±0.14 <sup>a</sup>	39.25±0.01 <sup>b</sup>	41.36±0.14 <sup>b</sup>	41.06±0.03 <sup>b</sup>	

注：●为鲜味氨基酸，▲为甜味氨基酸；同行数据肩标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: The symbols (● and ▲) means the umami amino acid and the sweet amino acid respectively; In the same row, values with different small letter superscripts are significantly different ( $P<0.05$ )

本研究表明,日本对虾、中国对虾和凡纳滨对虾 3 种对虾虾头的磷脂含量为 12.38~15.00 mg/g,而克氏原螯虾虾头的磷脂含量仅为 3.39 mg/g 左右。由于虾的磷脂成分主要存在于虾头废弃物中(崔益玮等, 2018; 李晓彬等, 2018), 因此, 非常有必要利用这一廉价的虾头资源进行磷脂相关功能性保健食品的开发, 尤其是来源于海洋的 3 种对虾虾头废弃物资源。

虾青素是水生动物中最主要的类胡萝卜素色素, 因其具有较高的抗氧化活性, 虾青素在食品、医药和

化妆品等行业具有广阔的应用前景, 它还是水产养殖饲料中的色素来源(Prameela *et al*, 2017; 赵永强等; 2019)。据报道, 虾青素的抗氧化活性是其他类胡萝卜素, 如玉米黄质、叶黄素、角黄素和  $\beta$ -胡萝卜素的 10 倍, 是  $\alpha$ -生育酚的 100 倍(Naguib, 2000; Silva *et al*, 2015)。由于人体不能合成虾青素, 只能从饮食如从虾头、内脏及虾壳等虾加工废弃物中获得(Nirmal *et al*, 2020)。本研究表明, 日本对虾和凡纳滨对虾虾头中虾青素含量分别达到 68.46 和 61.62  $\mu\text{g/g}$  左右, 中

国对虾约为 41.42  $\mu\text{g/g}$ , 而克氏原螯虾仅为 30.71  $\mu\text{g/g}$  左右, 因此, 利用廉价的虾头废弃物资源开发虾青素产品具有较好的前景。对 4 种虾头而言, 可以优先考虑日本对虾和凡纳滨对虾虾头副产物作为开发虾青素产品的原料来源, 其次考虑中国对虾虾头作为原料来源。

### 3.4 克氏原螯虾虾头废弃物作为开发甲壳素类相关产品原料来源的可行性

甲壳素是自然界中唯一带正电的阳性膳食纤维, 甲壳素及其脱乙酰基产物壳聚糖在农业、食品、化妆品、化工、生物医药等行业的潜在用途已得到广泛认可(Liu *et al.*, 2020)。甲壳素在虾、蟹壳中含量普遍较高, 且由虾、蟹壳制备甲壳素及其衍生物的技术相对比较成熟, 因此, 在利用虾头废弃物提取蛋白/肽及脂溶性的磷脂、虾青素成分后, 下脚料进一步制备高附加值甲壳素类产品具有广阔前景。为探明 4 种虾头中甲壳素含量情况, 本研究对 4 种虾头甲壳素含量进行了分析比较。研究表明, 克氏原螯虾虾头甲壳素含量最高, 约占虾头鲜重的 4.67%, 而 3 种对虾虾头甲壳素含量仅为 1.63%~1.77%。因此, 对 4 种虾头废弃物而言, 克氏原螯虾虾头废弃物可能最值得进行甲壳素类相关产品的开发。

## 4 小结

本研究以山东 4 种常见虾——克氏原螯虾、日本对虾、中国对虾及凡纳滨对虾的鲜虾头为原料, 测定了不同来源虾头的蛋白质、氨基酸、磷脂、虾青素、甲壳素含量。研究表明, 4 种虾头占全虾的质量比普遍较高, 日本对虾、中国对虾及凡纳滨对虾 3 种对虾的虾头占全虾质量的 36.77%~42.35%, 克氏原螯虾头占比甚至达到 85.52%, 因此, 有必要对虾头资源进行开发利用, 以免造成环境污染和资源浪费。4 种虾头蛋白质含量都比较丰富, 约占鲜虾头质量的 12.47%~14.91%, 且 4 种虾头蛋白中氨基酸种类齐全, 人体必需氨基酸含量达到 40%以上, 鲜、甜味氨基酸含量较高, 因此, 4 种虾头均适合作为蛋白水解物/肽、氨基酸开发利用的资源; 4 种虾头中克氏原螯虾虾头甲壳素含量远远高于 3 种对虾虾头, 达到 4.67% 左右, 适合用作制备甲壳素类相关产品的原料来源; 而 3 种对虾虾头中磷脂含量则远远高于克氏原螯虾, 可以作为提取磷脂的原料来源; 虾青素含量以凡纳滨对虾和日本对虾虾头中含量相对较高, 其次是中国对虾, 3 种对虾虾头均可作为提取虾青素的原料来源。

本研究为不同品种的虾头中各类高值成分进行

有针对性的开发利用提供了依据, 具有重要的经济和社会意义。

## 参 考 文 献

- CAO W H, TAN C Y, ZHAN X J, *et al.* Ultraviolet irradiation and gradient temperature assisted autolysis for protein recovery from shrimp head waste. *Food Chemistry*, 2014, 164: 136–141
- CHENG Y F, WEI H M, SUN R, *et al.* Rapid method for protein quantitation by Bradford assay after elimination of the interference of polysorbate 80. *Analytical Biochemistry*, 2016, 494: 37–39
- CUI Y W, YU X N, LI S Y, *et al.* Extraction and lipidomic profiling of phospholipids from shrimp heads. *Food Sciences*, 2018, 39(20): 218–225 [崔益玮, 俞喜娜, 李诗言, 等. 虾头中磷脂提取与组学分析. *食品科学*, 2018, 39(20): 218–225]
- DJELLOULI M, LÓPEZ-CABALLERO M E, ARANCIBIA M Y, *et al.* Antioxidant and antimicrobial enhancement by reaction of protein hydrolysates derived from shrimp by-products with glucosamine. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 11(2): 2491–2505
- Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Products Technology Extension Station, Chinese Society of Fisheries. *Chinese Fishery Statistical Yearbook 2020*. Beijing: China Agricultural Press, 2020, 22–89 [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 2020*. 北京: 中国农业出版社, 2020, 22–89]
- GAO X J, YAN P S, ZHU Y P, *et al.* Bioconversion and deodorization of shrimp processing waste by *Xerocomus badius* and inhibitory activity of converted product on angiotensin I converting enzyme. *Biotechnology*, 2014, 13(6): 263–272
- GAO Y, XING L H, SUN W H, *et al.* Research progress on extraction, purification and quantitative detection methods of astaxanthin from different sources. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(5): 1414–1423 [高岩, 邢丽红, 孙伟红, 等. 不同来源虾青素提取、纯化及定量检测方法的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(5): 1414–1423]
- GÓMEZ-GUILLÉN M C, MONTERO P, LÓPEZ-CABALLERO M E, *et al.* Bioactive and technological functionality of a lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) cephalothorax. *LWT—Food Science and Technology*, 2018, 89: 704–711
- GUO N, SUN J N, ZHANG Z H, *et al.* Recovery of chitin and protein from shrimp head waste by endogenous enzyme autolysis and fermentation. *Journal of Ocean University of China*, 2019, 18(3): 719–726
- HOSSAIN M I, SHIKHA F H, SHARMA A D. Waste management status of shrimp processing plants of south and south-west region of Bangladesh. *Journal of Environmental*

- Science and Natural Resources, 2018, 11(1-2): 73-81
- JIANG S Q, ZHANG Z W, YU F M, *et al.* Ameliorative effect of low molecular weight peptides from the head of red shrimp (*Solenocera crassicornis*) against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Functional Foods*, 2020, 72: 104085
- JIANG Y, CAO Z X, XU H Q, *et al.* Analysis and development suggestions of shrimp and crab industry in Shandong Province. *Fishery Guide to be Rich*, 2019, 22: 17-20 [姜燕, 曹振杰, 徐海强, 等. 山东省虾蟹类产业现状分析及发展建议. *渔业致富指南*, 2019, 22: 17-20]
- LI X B, HE Q X, HOU H R, *et al.* Targeted lipidomics profiling of marine phospholipids from different resources by UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS approach. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1096: 107-112
- LI X B, SUN S K, HAN L W, *et al.* Extraction process of phospholipids from shrimp head. *China Oils and Fats*, 2018, 43(1): 112-115 [李晓彬, 孙世康, 韩利文, 等. 对虾虾头中磷脂提取工艺的研究. *中国油脂*, 2018, 43(1): 112-115]
- LI-CHAN E C Y, CHEUNG I W Y, BYUN H. Shrimp (*Pandalopsis dispar*) waste hydrolysate as a source of novel  $\beta$ -secretase inhibitors. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, 19: 11
- LIU Y L, XING R, YANG H Y, *et al.* Chitin extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells by successive two-step fermentation with *Lactobacillus rhamnoides* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 424-433
- NAGUIB Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48(4): 1150-1154
- NIRMAL N P, SANTIVARANGKNA C, RAJPUT M S, *et al.* Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. *Trends in Food Science and Technology*, 2020, 103: 20-35
- NÚÑEZ-GASTÉLUM J A, SÁNCHEZ-MACHADO D I, LÓPEZ-CERVANTES J, *et al.* Astaxanthin and its esters in pigmented oil from fermented shrimp by products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, 25(3): 334-343
- PRAMEELA K, VENKATESH K, IMMANDI S B, *et al.* Next generation nutraceutical from shrimp waste: The convergence of applications with extraction methods. *Food Chemistry*, 2017, 237: 121-132
- SHEN Q, SONG G S, WANG H H, *et al.* Isolation and lipidomics characterization of fatty acids and phospholipids in shrimp waste through GC/FID and HILIC-QTrap/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, 95: 103668
- SILVA F O, TRAMONTE V L C G, PARISENTI J, *et al.* *Litopenaeus vannamei* muscle carotenoids versus astaxanthin: A comparison of antioxidant activity and *in vitro* protective effects against lipid peroxidation. *Food Bioscience*, 2015, 9: 12-19
- SUPARMI E, SARI N I, *et al.* Study on the quality of natural flavor powder made from shrimp waste. *Earth and Environmental Science*, 2020, 430(1): 012007
- TAN Y N, LEE P P, CHEN W N. Microbial extraction of chitin from seafood waste using sugars derived from fruit waste-stream. *AMB Express*, 2020, 10(1): 1664-1669
- WANG F X. Isolation, Purification and its antimetastatic activities *in vitro* of a novel protein from *Eupolyphaga sinensis*. Doctoral Dissertation of Shandong University, 2013 [王凤霞. 中华真地鳖(*Eupolyphaga sinensis*)抗肿瘤蛋白分离纯化及其体外抗转移活性研究. 山东大学博士研究生学位论文, 2013]
- WANG Y L, LIU Y Z, MA L, *et al.* The oxidation mechanism of phospholipids in *Antarctic krill* oil promoted by metal ions. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127448
- YUAN Y Q, HOU H R, WANG X M, *et al.* Determination of total phospholipids in *Ommastrephes bartramii* gonad extracts by spectrophotometry. *Drugs and Clinic*, 2011, 26(1): 63-65 [袁延强, 侯海荣, 王希敏, 等. 分光光度法测定鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂. *现代药物与临床*, 2011, 26(1): 63-65]
- ZHANG Q, LI Y C. Preparation and structural characterization of chitin from shrimp shell of *Penaeus vannamei*. *Food Science and Technology*, 2020, 45(4): 187-192 [张巧, 李永成. 南美白对虾壳甲壳素的提取工艺及结构分析. *食品科技*, 2020, 45(4): 187-192]
- ZHAO T T, ZHANG Y, CHEN C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 89-96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 89-96]
- ZHAO Y Q, TAN J X, LI L H, *et al.* Optimization of the preparation process and the physicochemical properties of Antarctic krill astaxanthin microcapsules. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 185-194 [赵永强, 谈俊晓, 李来好, 等. 南极磷虾青素微胶囊制备工艺优化及其理化性质研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 185-194]

## Analysis and Evaluation of Shrimp Head Quality from Four Common Shrimp Species in Shandong Province, China

WANG Fengxia<sup>1</sup>, ZHANG Shanshan<sup>1</sup>, ZHANG Xuanming<sup>1</sup>, WANG Lizhen<sup>1</sup>,  
ZHANG Mengqi<sup>1</sup>, LI Peihai<sup>1</sup>, LI Xiaobin<sup>1,2①</sup>, LIU Kechun<sup>1①</sup>, XING Shu<sup>3</sup>

(1. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Ji'nan, Shandong 250103, China;

2. Bioengineering Technology Innovation Center of Shandong Province, Heze, Shandong 274000, China;

3. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Ji'nan, Shandong 250353, China)

**Abstract** To make full use of shrimp head waste, the protein, amino acid, phospholipid, astaxanthin, and chitin contents were determined from the fresh heads of four shrimp species, and the quality of the different shrimp heads was compared and evaluated. These shrimp heads came from four common species in the Shandong Province: *Procambarus clarkia*, *Penaeus japonicas*, *Penaeus orientalis*, and *Penaeus vannamei*. The results showed that the weight ratio of the head waste to the whole shrimp weight for the three penaeids reached approximately 40%. The highest weight ratio (85.52%) was observed for *P. clarkia*. All shrimp heads were rich in protein, ranging from 12.47%~14.91% of the fresh shrimp head weight. The essential amino acid contents in the shrimp head proteins of the four species reached more than 40%, and the umami and sweet amino acid contents were also high. Therefore, the shrimp heads of these four species are suitable for the development and utilization of protein hydrolysate/peptide amino acids. The phospholipid contents were 12.38~15.00 mg/g for the three penaeid species heads, and only 3.39 mg/g for the *P. clarkia* heads. The relatively higher astaxanthin content was 68.46 µg/g for *P. vannamei* and 61.62 µg/g for *P. japonicas*, followed by 41.42 µg/g for *P. orientalis* and 30.71 µg/g for *P. clarkia*, respectively. Therefore, the penaeid heads can be used as a raw material for extracting phospholipids and astaxanthin. However, the chitin content in the head of *P. clarkia* was about 3-fold more than that of the three penaeid species, reaching about 4.67%, making it suitable for the preparation of chitin-related products. Findings of this study show that the by-products of the shrimp heads of these four species are rich in protein and amino acids, while the phospholipid, astaxanthin, and chitin contents varied significantly in the shrimp heads. Therefore, high value-added bioactive components can be developed from the shrimp heads of different species and may have a wide range of application.

**Key words** Shrimp head; Component analysis; Quality evaluation

① Corresponding author: LI Xiaobin, E-mail: lixb@sdas.org; LIU Kechun, E-mail: hliukch@sdas.org

# 《渔业科学进展》编辑委员会

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 包振民 BAO Zhenmin 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	叶乃好 YE Naihao	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	李军(美) LI Jun	李纯厚 LI Chunhou
李健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng	张国范 ZHANG Guofan
陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美) CHEN Yong	邵长伟 SHAO Changwei	林洪 LIN Hong
周永灿 ZHOU Yongcan	单秀娟 SHAN Xiujuan	赵宪勇 ZHAO Xiaoyong	俞志明 YU Zhiming
秦启伟 QIN Qiwei	秦松 QIN Song	徐跑 XU Pao	徐皓 XU Hao
黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	崔利锋 CUI Lifeng	董云伟 DONG Yunwei
解绶启 XIE Shouqi	谭志军 TAN Zhijun	薛长湖 XUE Changhu	薛清刚 XUE Qinggang

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 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43卷 第2期 2022年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.43 No.2 Apr. 2022

主管单位	中华人民共和国农业农村部	Administrated	by	Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China
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	Sponsored	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences China Society of Fisheries
出版单位	科学出版社 地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717	Published	by	Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
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	Edited	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn
主编	金显仕	Editor-in-Chief		Jin Xianshi
印刷	青岛国彩印刷股份有限公司	Printed	by	Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
国内发行	中国邮政集团公司山东省分公司	Domestic Distributed	by	China Post Group Corporation Shandong Branch
订购	全国各地邮政局	Subscription		Post Offices All Over China
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	Overseas Distributed	by	China International Book Trading Corporation P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定价: 40.00元



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869



9 772095 986224