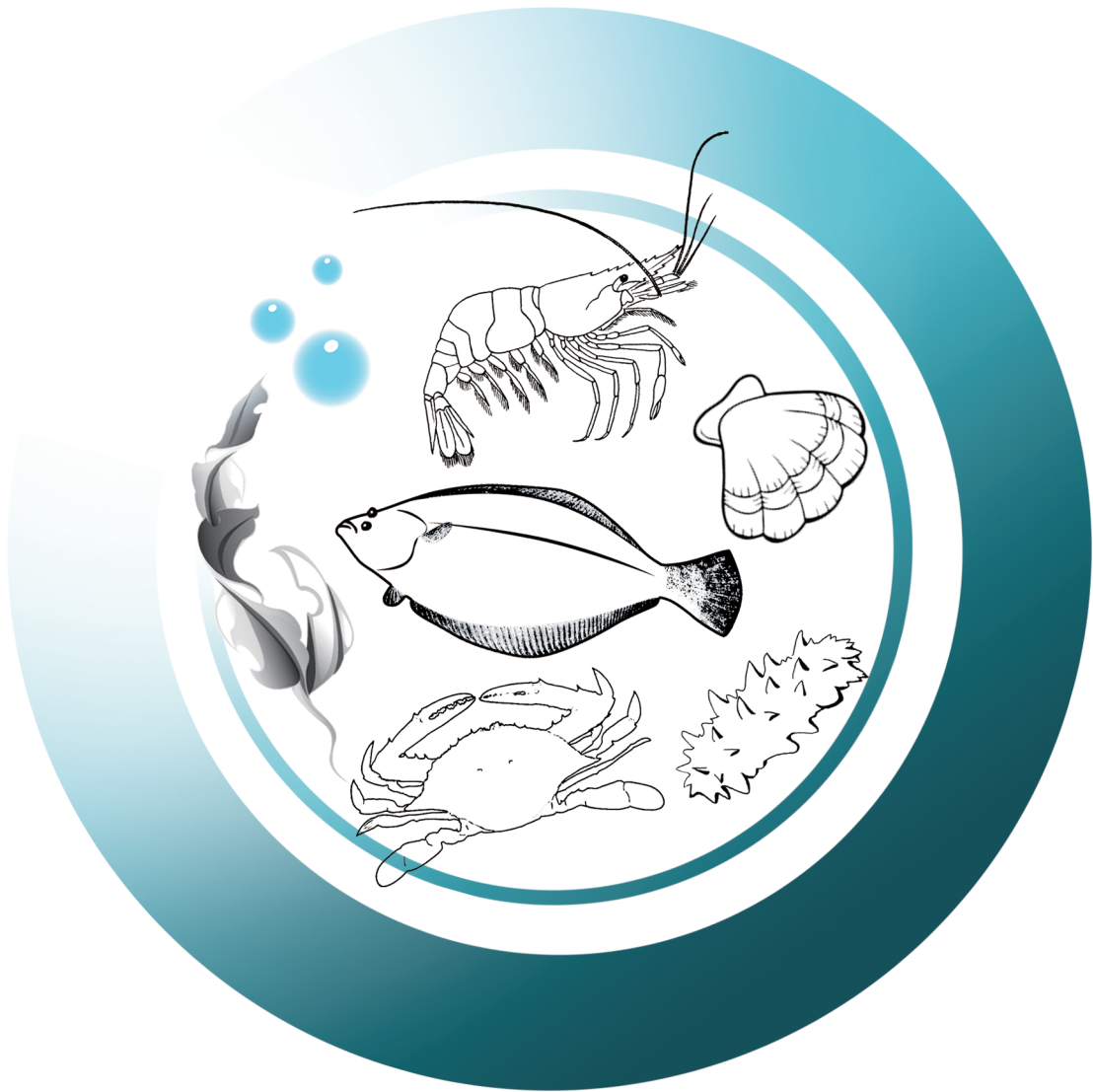


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第43卷 VOL.43 第3期 NO.3



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 3 期

2022 年 6 月

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

目 次

- 浙江南部近海鱼类资源季节分布特征及其影响因素.....马 稳 秦 松 赵 静 (1)
- 半滑舌鳎白细胞介素 12 的 *p35a* 和 *p40c* 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析
.....张 志 华 冯 博 朱 腾 飞 郝 先 才 王 倩 邵 长 伟 王 洪 岩 (12)
- 鲤 *trim25* 多拷贝基因进化和表达调控初探
.....朱 优 秀 江 炎 亮 张 芹 冯 建 新 张 瀚 元 吴 碧 银 许 建 (24)
- 许氏平鲈幼鱼对饲料中精氨酸需求量的研究
.....沈 钰 博 王 际 英 李 宝 山 刘 财 礼 王 晓 艳 黄 炳 山 王 世 信 孙 永 智 (33)
- 皇竹草粉对草鱼幼鱼生长、抗氧化反应和肠道健康的影响
.....李 玉 萍 田 晶 晶 张 凯 夏 耘 王 广 军 郁 二 蒙 李 志 斐 龚 望 宝 谢 骏 (45)
- 大刺鳅消化道结构及食性研究.....马 本 贺 王 海 华 徐 先 栋 李 燕 华 王 梦 杰 吴 斌 陶 志 英 (56)
- 患铁虾综合征罗氏沼虾眼柄转录组研究.....王 国 浩 董 宣 王 一 婷 郭 晓 萌 王 德 浩 孟 凡 增 黄 捷 (64)
- 虾肝肠胞虫感染对脊尾白虾肠道菌群的影响
.....段 健 诚 胡 吉 卉 沈 宇 航 邓 高 威 高 威 牟 华 张 庆 起 高 焕 (75)
- 中国对虾 *ATG5* 基因的克隆及其在 pH、碳酸盐碱度胁迫下的表达分析
.....魏 威 何 玉 英 李 朝 霞 周 雨 欣 李 健 谢 拥 军 (84)
- 温度和氨氮对不同规格红螯螯虾耗氧率与排氨率的影响
.....周 建 聪 蔡 利 杨 静 茹 林 先 鑫 顾 志 峰 石 耀 华 刘 春 胜 (95)
- 罗氏沼虾成虾中氨基脲的分布特征.....莫 梦 松 蔡 楠 李 来 好 王 旭 峰 王 强 关 婉 琪 赵 东 豪 (103)
- 菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面反硝化和厌氧氨氧化反应速率的影响
.....朱 文 君 袁 晟 译 李 健 常 志 强 (110)
- 中华蛸 *vasa* 基因的克隆及表达分析
.....刘 宇 岩 李 凤 辉 边 力 朱 文 静 陈 四 清 曲 江 波 常 青 刘 长 琳 葛 建 龙 (118)
- 基于转录组数据的毛蚶 SSR 分子标记开发与评价.....陈 丽 梅 李 莉 石 栩 蔚 秦 艺 铭 刘 利 华 郭 永 军 (129)
- Foxl2* 基因在虾夷扇贝发育过程中的表达模式分析
.....赵 丹 周 丽 青 郑 言 鑫 孙 秀 俊 吴 彪 刘 志 鸿 吴 宙 吴 磊 (138)
- 薛家岛海水网箱养殖海域贝藻综合养殖效果及其影响因素分析
.....吴 文 广 张 继 红 刘 毅 赵 云 霞 张 坤 阳 王 亮 亮 (146)
- 不同离岸距离的养殖海区对海带养殖性状及苗绳老化的影响
.....刘 义 梁 洲 瑞 余 雯 雯 常 丽 荣 卢 龙 飞 肖 露 阳 郑 言 鑫 刘 福 利 (156)
- 患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析.....阎 永 伟 杨 慧 超 莫 照 兰 李 杰 (165)
- 刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析
.....李 欣 容 廖 梅 杰 李 彬 荣 小 军 畅 孟 阳 王 印 庚 于 永 翔 张 正 范 瑞 用 刘 清 兵 (176)
- 灯光诱饵技术对深水网箱养殖鱼类品质的影响.....李 靖 石 莹 韩 兵 郑 炯 冯 若 燕 (186)
- 池塘和稻田养殖模式对泥鳅营养品质的影响
.....蔡 丽 君 郭 全 友 马 东 林 王 海 华 杨 絮 马 本 贺 黄 海 潮 郑 尧 (196)
- 镀膜冰衣在保持凡纳滨对虾冻藏过程脂质稳定性的作用.....王 善 宇 简 冲 王 灵 昭 杜 云 建 曹 荣 (207)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.43 No.6 June 2022

- Distribution Characteristics and Influencing Factors of Fish Resources in the Offshore Waters South of Zhejiang
.....MA Wen, QIN Song, ZHAO Jing (1)
- Expression and Regulation Analysis of the *p35a* and *p40c* Subunits of Interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis*
Infected by *Vibrio harveyi* ZHANG Zhihua, FENG Bo, ZHU Tengfei,
HAO Xiancai, WANG Qian, SHAO Changwei, WANG Hongyan (12)
- Gene Evolution and Expression Regulation of Multiple Copies of *trim25* in Common Carp, *Cyprinus carpio*
..... ZHU Youxiu, JIANG Yanliang, ZHANG Qin, FENG Jianxin, ZHANG Hanyuan, WU Biyin, XU Jian (24)
- Dietary Arginine Requirement of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegelii*) SHEN Yubo, WANG Jiyong, LI Baoshan,
LIU Caili, WANG Xiaoyan, HUANG Bingshan, WANG Shixin, SUN Yongzhi (33)
- Effects of *Pennisetum sinense* Roxb Meal on Growth, Antioxidant Response, and Intestinal Health of Juvenile Grass
Carp (*Ctenopharyngodon idella*) LI Yuping, TIAN Jingjing, ZHANG Kai, XIA Yun,
WANG Guangjun, YU Ermeng, LI Zhifei, GONG Wangbao, XIE Jun (45)
- Research on Structure of Digestive Tract and Feeding Habits in *Mastacembelus armatus*
..... MA Benhe, WANG Haihua, XU Xiandong, LI Yanhua, WANG Mengjie, WU Bin, TAO Zhiying (56)
- Study on the Eyestalk Transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii* Suffering from Iron Prawn Syndrome
..... WANG Guohao, DONG Xuan, WANG Yiting, GUO Xiaomeng, WANG Dehao, MENG Fanzeng, HUANG Jie (64)
- Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* Infection on the Intestinal Microflora of *Exopalaemon carinicauda*
..... DUAN Jiancheng, HU Jihui, SHEN Yuhang, DENG Gaowei, GAO Wei, MU Hua, ZHANG Qingqi, GAO Huan (75)
- Cloning of *ATG5* Gene of *Fenneropenaeus chinensis* and Expression Analysis under pH and Carbonate Alkalinity Stress
..... WEI Wei, HE Yuying, LI Zhaoxia, ZHOU Yuxin, LI Jian, XIE Yongjun (84)
- Effects of Temperature and Ammonia on Oxygen Consumption and Ammonia Excretion Rates of *Cherax quadricarinatus*
with Different Sizes ZHOU Jiancong, CAI Li, YANG Jingru, LIN Xianxin, GU Zhifeng, SHI Yaohua, LIU Chunsheng (95)
- Distribution Characteristics of Semicarbazone in Adult *Macrobrachium rosenbergii*
..... MO Mengsong, CAI Nan, LI Laihao, WANG Xufeng, WANG Qiang, GUAN Wanqi, ZHAO Donghao (103)
- Effects of *Ruditapes philippinarum* on Denitrification and Anaerobic Ammonia Oxidation Rates of the Sediment/Water
Interface in Seawater Aquaculture Pond ZHU Wenjun, YUAN Shengyi, LI Jian, CHANG Zhiqiang (110)
- Cloning and Expression of the *vasa* Gene in the *Octopus sinensis* LIU Yuyan, LI Fenghui, BIAN Li, ZHU Wenjing,
CHEN Siqing, QU Jiangbo, CHANG Qing, LIU Changlin, GE Jianlong (118)
- Development and Evaluation of SSR Markers Based on Transcriptome Sequencing in *Scapharca kagoshimensis*
..... CHEN Limei, LI Li, SHI Xuwei, QIN Yiming, LIU Lihua, GUO Yongjun (129)
- Expression Pattern of the *Foxl2* Gene in the Scallop *Patinopecten yessoensis* during Development
..... ZHAO Dan, ZHOU Liqing, ZHENG Yanxin, SUN Xiujun, WU Biao, LIU Zhihong, WU Zhou, WU Lei (138)
- Analysis of the Effectiveness of the Polyculture of Shellfish and Algae and Influencing Factors in the Xuejiadao Sea
Cage Aquaculture Area WU Wenguang, ZHANG Jihong, LIU Yi, ZHAO Yunxia, ZHANG Kunyang, WANG Liangliang (146)
- Effects of Cultivation Area of Different Offshore Distances on the Agronomic Traits and Breeding Rope Aging of
Saccharina japonica LIU Yi, LIANG Zhourui, YU Wenwen,
CHANG Lirong, LU Longfei, XIAO Luyang, ZHENG Yanxin, LIU Fuli (156)
- Epiphytic Microbial Communities Associated with *Neopyropia yezoensis* with *Olpidiopsis* Disease
..... YAN Yongwei, YANG Huichao, MO Zhaolan, LI Jie (165)
- Genomic DNA Methylation Levels and Transcriptome Differences of *Apostichopus japonicus* in Response to *Vibrio*
splendidus Infection and Their Association Analysis LI Xinrong, LIAO Meijie, LI Bin, RONG Xiaojun,
CHANG Mengyang, WANG Yingeng, YU Yongxiang, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong, LIU Qingbing (176)
- Effect of Light Trapping Technology on Fish Quality in Deep Water Cage Fish Culture
..... LI Jing, SHI Ying, HAN Bing, ZHENG Jiong, FENG Ruoyan (186)
- Effects of Pond-Cultivation and Paddy-Cultivation Modes on Nutritional Quality of Loach
..... CAI Lijun, GUO Quanyou, MA Donglin, WANG Haihua, YANG Xu, MA Benhe, HUANG Haichao, ZHENG Yao (196)
- Effect of Ice Glazing on the Lipid Stability of *Litopenaeus vannamei* During Frozen Storage
..... WANG Shanyu, JIAN Chong, WANG Lingzhao, DU Yunjian, CAO Rong (207)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210610001

http://www.yykxjz.cn/

马稳, 秦松, 赵静. 浙江南部近海鱼类资源季节分布特征及其影响因素. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 01–11

MA W, QIN S, ZHAO J. Distribution characteristics and influencing factors of fish resources in the offshore waters south of Zhejiang. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 01–11

浙江南部近海鱼类资源季节分布特征及其影响因素*

马 稳¹ 秦 松² 赵 静^{1,3,4}①

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306;

2. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江 温州 325005; 3. 国家远洋渔业工程技术研究中心 上海 201306;

4. 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室 上海 201306)



摘要 根据 2016—2020 年浙江南部鱼类资源调查数据, 运用广义加性模型研究浙江南部各季节鱼类资源与环境因子的关系, 并基于 2020 年环境数据探究鱼类资源时空分布特征。结果显示, 春季、夏季、秋季和冬季最佳模型的偏差解释率分别为 47.9%、68.0%、56.6% 和 45.6%, 交叉验证回归线的斜率平均值为 0.74~1.02, 模型拟合能力和预测能力良好。水温、盐度和叶绿素是影响浙江南部海域鱼类资源密度的主要因子, 在不同季节对鱼类资源密度有不同的影响机制。水温在夏季和秋季对鱼类资源密度影响极显著($P<0.01$), 秋季, 水温和资源密度之间存在显著负相关($r=-0.225$, $P<0.05$); 盐度在不同季节对鱼类资源密度的影响也存在差异, 秋季, 鱼类资源密度随着盐度的增加而增加, 冬季则呈先增加后减小的变化趋势, 且在盐度为 31.5 时达到最大值; 除冬季外, 其他季节叶绿素浓度与鱼类资源密度均显著相关($P<0.05$)。研究表明, 2020 年春季、夏季鱼类资源密度相对较高, 秋季和冬季鱼类资源密度则相对偏低。空间上, 春季, 温台渔场的鱼类资源密度明显高于鱼山渔场; 夏季, 温台渔场和鱼山渔场鱼类资源均较为集中, 主要分布在 27.8°~28.4°N、121.7°~122.9°E 以及 28.9°N、122°E 海域附近。

关键词 广义加性模型; 鱼类资源; 资源分布; 环境因子; 浙江南部近海

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0001-11

浙江南部近海位于我国东海海域, 在闽浙沿岸水和台湾暖流等多种水团的影响下, 营养盐及饵料生物较为充足(张秋华等, 2007; 王玉衡等, 1990), 使得该海域鱼类资源较为丰富。同时, 该海域也是拖网、流刺网以及灯光围网作业的良好渔场。近年来, 受水域污染、过度捕捞等影响, 浙江南部近海鱼类资源衰退明显(杜晓雪等, 2018; 俞存根等, 2009), 国家和地方政府制定了禁渔期和自然保护区等保护措施以保障鱼类等渔业资源的可持续利用, 围绕渔业资源学及其

科学管理的研究也逐步深入。在水域生态系统中, 鱼类群落组成和空间分布对生态系统物质循环和能量流动起到重要作用(郭朋军等, 2020; 从婷婷等, 2021; 刘燕山等, 2021), 鱼类是评价水域生态系统完整与健康的重要指标, 但该海域鱼类资源的时空分布特征及其与环境因子之间的关系尚不明确, 有待进一步探究, 进而可为该海域鱼类资源的保护和持续利用提供支撑。

模型手段是建立与探析渔业资源生物资源量与

* 国家自然科学基金项目(41906074; 31902372)和浙江省渔业资源专项调查项目(158053)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41906074; 31902372), and the Fisheries Resource Survey of Zhejiang Province, China (158053)]. 马 稳, E-mail: ma1997wen@163.com

① 通讯作者: 赵 静, E-mail: jzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2021-06-10, 收修改稿日期: 2021-07-07

环境因子之间关系的有效方式(牛明香等, 2020), 其中, 广义加性模型(generalized additive model, GAM)因限制条件少、运用灵活, 被广泛应用于渔业资源与环境因子的关系研究(Piet, 2002)。该模型在实际应用过程中, 函数表达式不固定, 能够对影响鱼类数量的环境因子进行整体或单独的探究, 是一种探索预测变量与自变量之间复杂关系的有效工具。GAM 相比传统模型, 具有精度高、运用灵活等优点(王圆圆等, 2017), 已在产卵场与鱼类群落多样性预测(吴建辉等, 2019; 万荣等, 2020)、渔业资源分布与环境因子关系(陈新军等, 2007; 郑波等, 2008; Li *et al.*, 2015; 马金等, 2020)等方面得到应用。研究者使用 GAM 在浙江南部近海开展了龙头鱼(*Harpodon nehereus*) (杜晓雪, 2018)和小黄鱼(*Larimichthys polyactis*) (戴黎斌等, 2018)分布规律及影响因素的研究, 发现龙头鱼的分布与底层水温和 pH 密切相关, 而小黄鱼分布的影响因子在不同季节间存在较大差异。但以整体鱼类群落为对象研究鱼类资源分布规律与环境因子之间的关系仍待进一步探究。

渔业资源时空分布和环境因子的关系一直是渔业生态学研究关注的焦点, 如水温对鱼类的洄游分布和生长发育具有重要影响(陈新军, 2014), 盐度在鱼类的生长、繁殖发育和其他生理过程有着较为重要的作用(王云峰等, 2002)。诸多研究也揭示了鱼类的分布规律和特点, 从而为资源量预测、栖息地研究、渔场寻找提供了必要的参考依据和理论支撑。因此, 准确掌握鱼类资源时空分布规律, 对了解种群动态、渔业资源评估与管理策略评价具有重要意义。基于 2016—2020 年渔业资源独立调查数据, 本研究使用 GAM 探究了浙江南部近海鱼类资源与环境因子的关系, 了解其分布规律以及最新动态, 以期为浙江南部近海鱼类资源的养护管理与可持续利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源

数据来源于 2016—2020 年在浙江南部近海调查(图 1), 主要包括水文环境和渔业数据, 调查时间为每年的 2 月(冬季)、5 月(春季)、8 月(夏季)和 11 月(秋季)。调查船为“浙洞渔 10109 号”, 总吨位 800 t, 底拖网(全长约 95 m, 网口宽 40 m, 高 7.5 m), 底纲和浮子纲长度为 80 m, 网囊网目为 2 cm, 拖速为 2~4 kn, 每个调查站点作业时间为 1 h 左右。样品的采集、测定和分析根据国家《海洋调查规范—海洋生物调查》

(GB/T 12763.6-2007)和《海洋监测规范》(GB 17378.3-1998)进行。

由于受到恶劣天气、新冠肺炎疫情等不可抗力因素影响, 部分航次及有关调查内容未能开展, 由此缺少的水文环境数据通过相关网站获取。2017 年 2 月、5 月和 11 月以及 2018 年 5 月和 8 月的 pH 值数据来自于哥白尼海事局网站(<https://marine.copernicus.eu>), 该数据为月平均数据, 空间分辨率为 $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ 。调查站位的叶绿素数据来源于美国国家海洋和大气管理局官方网站(<https://www.noaa.gov>), 该数据为月平均数据, 空间分辨率为 $0.05^{\circ} \times 0.05^{\circ}$ 。受新冠疫情影响, 2020 年 2 月(冬季)未能出海调查, 该季节环境数据均来自于上述网站。由于相关网站的环境数据与鱼类资源数据尺度不一致, 因此, 通过克里金插值法将获取的水文环境数据分辨率统一转化为 $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ 。

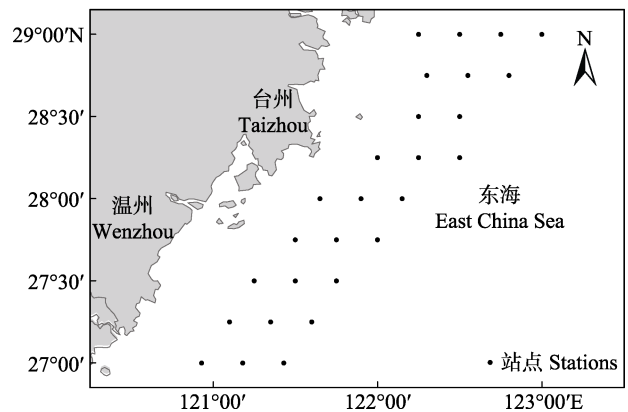


图 1 浙江南部近海鱼类资源采样站点分布
Fig.1 Distribution of sampling stations in offshore waters south of Zhejiang

1.2 研究方法

1.2.1 数据分析 单位捕捞努力量渔获量(catch per unit effort, CPUE)可以较好地反映渔业资源量或资源密度的相对大小, 因此, 本研究选用 CPUE 作为渔业资源丰度的相对指标(Maunders *et al.*, 2004)。CPUE 定义为某站点单位时间内获得鱼类渔获总量, 具体表达式为:

$$CPUE_k = \frac{W_k}{T_k} \quad (1)$$

式中, $CPUE_k$ 为第 k 个站点的鱼类资源密度指数(g/h); W_k 为第 k 个站点的鱼类渔获总量(g); T_k 为第 k 个站点的作业时间(h)。

1.2.2 模型的建立 GAM 能拟合响应变量和解释变量之间的非线性关系, 其表达式为:

$$Y = \alpha + \sum_{j=1}^P f_j(X_j) + \varepsilon \quad (2)$$

式中, α 为拟合模型中的截距, f_j 为平滑函数(样条平滑或 loess 平滑), X_j 为自变量, 残差 $\varepsilon = \sigma^2$ 且 $E(\varepsilon) = 0$ 。

参考东海中南部鱼类在空间结构上可分为不同的生物群落类型的研究结果(李圣法等, 2005), 选用经度和纬度作为鱼类资源空间分布的影响因子。鉴于鱼类以及其他水生生物对水温和盐度的适应性不同(李圣法等, 2007), 从而影响鱼类的分布和生物量, 同时, 叶绿素和 pH 在各季节驱动了鱼类群落的时空变异(张迎秋, 2012), 因此, 选择水温、盐度、叶绿素和 pH 作为影响鱼类分布的环境影响因子。因变量(鱼类资源密度)经自然对数变换后, 建立其与解释变量(各环境因子)之间的模型关系, 且误差假定为高斯分布, 同时, 本研究未考虑解释变量之间的交互作用。因变量与解释变量的 GAM 具体表达式为:

$$\ln(\text{CPUE}) = s(\text{Lat}) + s(\text{Lon}) + s(T) + s(\text{Chl-}a) + s(S) + s(\text{pH}) + \varepsilon, \text{family} = \text{gaussian} \quad (3)$$

式中, s 为自然样条平滑, Lat 为纬度, Lon 为经度, T 为水温, Chl- a 为叶绿素, S 为盐度, pH 为水体的酸碱度, ε 为相对误差, family 为分布模式并选择高斯分布。

1.2.3 最佳拟合模型的选择及其预测能力检验 通过方差膨胀因子(variance inflation factor, VIF)判断预测变量间是否存在共线性。当 $\text{VIF} > 3$ 时, 认为该预测变量与其余预测变量存在共线性(Sagarese *et al.*, 2014); 当只有 1 个预测变量的 $\text{VIF} > 3$ 时, 移除该预测变量, 对其余的预测变量进行共线性检验; 当 VIF 均 < 3 , 则认为预测变量间不存在共线性; 当多个预测变量的 $\text{VIF} > 3$ 时, 选取其中一个预测变量与 $\text{VIF} < 3$ 的预测变量再次进行共线性检验, 如 VIF 均 < 3 , 则认为预测变量间不存在共线性。对经过筛选的变量因子进行排列组合, 分别建立与 CPUE 之间的 GAM。

赤池信息准则(akaike information criterion, AIC)可以用来衡量多组模型的拟合优度(Benjamin *et al.*, 2007), AIC 值越小, 模型的拟合程度越好。本研究依照赤池信息准则, 对各季节建立的 GAM 进行逐一检验, 选取不同季节下 AIC 值最小的模型为该季节的最佳拟合模型。此外, 本研究通过 F 检验评估预测变量对解释变量的影响显著程度。

利用 2016—2019 年的数据建立 GAM, 并对每个季节最优模型的预测能力进行交叉验证。参照 Diego 等(2010)的方法进行 5 折交叉验证, 并重复 100 次,

通过构建模型预测值和实际观测值之间的线性关系来描述二者之间的关系, 表达式如下:

$$\ln Y = a + b \times \ln y \quad (4)$$

式中, y 为模型的预测值, Y 为模型的实际观测值, a 、 b 反映预测值和实际观测值之间的偏差, 当 $a=0$ 、 $b=1$ 时, 意味着预测的资源密度和实际观察到的资源密度(即测试数据)具有相似的空间模式, 并且该模型具有良好的预测性能(Li *et al.*, 2015)。

1.3 鱼类资源密度的分布预测

利用 2020 年浙江南部近海 4 个季节每个站点环境调查数据, 将调查区域按照 $0.05^\circ \times 0.05^\circ$ 大小的栅格进行划分, 通过计算获得每个栅格中心点的坐标, 并使用克里金插值法提取每个栅格中心点的水文环境数据。以环境数据为解释变量, 使用各季节最佳模型对 2020 年 4 个季度浙江南部近海鱼类资源密度进行预测。

本研究所有统计分析均在 R 语言软件(V3.6.0)中进行, GAM 通过“mgcv”包实现, 鱼类资源分布图在 Arcmap 10.2 软件中进行绘制。

2 结果

2.1 影响因子共线性检验

本研究选取的 6 个影响因子中, 4 个季节经度和纬度的 VIF 值均 > 3 , 水温、盐度等其他 4 个影响因子的 VIF 值均 < 3 。分别移除经度和纬度, 对预测环境因子进行共线性检验后 VIF 均 < 3 (表 1)。

表 1 预测变量共线性检验结果
Tab.1 Collinearity test for predictor variables

季节 Season	方差膨胀因子 VIF					
	经度 Lon	纬度 Lat	水温 T	盐度 S	叶绿素 Chl- a	酸碱度 pH
春季 Spring	9.95	11.09	1.38	1.65	1.78	1.43
	—	1.22	1.38	1.36	1.51	1.42
	1.09	—	1.37	1.31	1.37	1.43
夏季 Summer	7.88	9.35	1.15	1.70	1.12	1.18
	—	1.34	1.15	1.46	1.06	1.18
	1.13	—	1.15	1.23	1.08	1.00
秋天 Autumn	12.84	10.92	1.89	2.24	1.53	1.46
	—	1.29	1.80	1.94	1.34	1.94
	1.52	—	1.82	2.13	1.25	1.46
冬季 Winter	18.38	17.47	3.12	1.04	1.82	1.04
	—	1.02	2.31	1.23	1.23	2.43
	1.07	—	2.29	2.30	1.24	1.04

注: “—”表示移除该因子

Note: the “—” denotes the removed factor

2.2 各季节最佳模型

通过对不存在共线性关系的环境因子进行排列组合,分别建立 GAM。结果如表 2 所示,春季最佳模型的变量组合为 Lon+T+S+Chl-*a*,模型 AIC 值为 171.59,解释率为 47.9%,叶绿素为显著影响因子,且达到极显著水平($P<0.01$)。夏季最佳模型的变量组合为 Lat+T+S+Chl-*a*+pH,模型 AIC 值为 182.97,解释率为 68.0%,叶绿素、水温、纬度和 pH 为显著影响因子($P<0.05$),且水温和纬度的影响达到极显著水平($P<0.01$)。秋季最佳模型的变量组合为 T+S+Chl-*a*

+Lon,模型 AIC 值为 179.24,解释率为 56.6%,水温、盐度和叶绿素为显著影响因子($P<0.05$),且水温和盐度的影响达到极显著水平($P<0.01$)。冬季的最佳模型的变量组合为 Lat+S+T,模型 AIC 值为 132.59,解释率为 45.6%,纬度和盐度为显著影响因子,且达到极显著水平($P<0.01$)。此外,通过对比发现,在不同模型中贡献率最大的因子也存在差异,盐度、水温、盐度和纬度分别在春季、夏季、秋季和冬季的模型中的相对贡献率最大,分别为 64.23%、46.87%、44.63%和 53.25%。

表 2 各季节最佳拟合模型参数

Tab.2 Parameters of the optimal model in each season

季节 Season	最佳模型 Optimal model	P 值 P value	赤池信息准则 AIC	偏差解释 Deviance explained /%	相对贡献率 Relative contribution rate /%
春季 Spring	盐度 S	0.110	171.59	47.9	64.23
	水温 T	0.079			18.32
	叶绿素 Chl- <i>a</i>	0.003			17.00
	经度 Lon	0.270			0.45
夏季 Summer	水温 T	0.001	181.97	68.0	46.87
	叶绿素 Chl- <i>a</i>	0.038			26.94
	酸碱度 pH	0.024			14.08
	纬度 Lat	0.007			9.68
秋季 Autumn	盐度 S	0.320	179.24	56.6	2.43
	盐度 S	1.43×10^{-5}			44.63
	水温 T	3.66×10^{-7}			41.85
	叶绿素 Chl- <i>a</i>	0.018			8.09
冬季 Winter	经度 Lon	0.222	132.59	45.6	5.43
	纬度 Lat	4.80×10^{-3}			53.25
	水温 T	0.076			27.59
	盐度 S	4.40×10^{-4}			19.16

2.3 鱼类资源密度与环境因子之间的关系

春季,叶绿素与鱼类资源密度呈负相关关系,随着叶绿素浓度增加,鱼类资源密度呈下降的趋势(图 2a)。夏季,鱼类资源密度在调查范围内随纬度呈增加的趋势(图 2b);在水温 26.0℃~30.3℃范围内,鱼类资源密度随水温的增加呈下降趋势,水温高于 30.3℃后,鱼类资源密度随水温的升高而升高(图 2c);pH 在 7.9~8.4 范围内变化时,鱼类资源密度呈先减小后增大的变化趋势,当 pH 为 8.1 时,鱼类资源密度达到最低值(图 2d);叶绿素和 pH 的变化趋势类似,在叶绿素为 2.5 mg/m³时,鱼类资源密度达到最低值(图 2e)。秋季,水温在 19℃~24℃时,鱼类资源密度与水温呈线性负相关(图 2f);盐度和鱼类资源密度为

多波峰状非线性关系,但整体上资源密度随盐度的增加而升高(图 2g);鱼类资源密度与叶绿素呈先降后升的趋势(图 2h)。冬季,随纬度升高,鱼类资源密度随之升高(图 2i);在盐度超过 31.5 时,鱼类资源密度呈下降趋势(图 2j)。

2.4 模型性能检验

交叉验证结果显示(图 3),春季的交叉验证回归线斜率均值在 4 个季节中最大,为 1.02,其次为秋季,为 0.94,而冬季回归线斜率均值在 4 个季节中最低,仅为 0.74。春季的交叉验证回归线截距均值在 4 个季节中最小,为-0.25,其次为秋季,为 0.57,而冬季回归线截距均值在 4 个季节最高,为 2.45。秋季的模型交叉验证回归线决定系数均值在 4 个季节中最大,

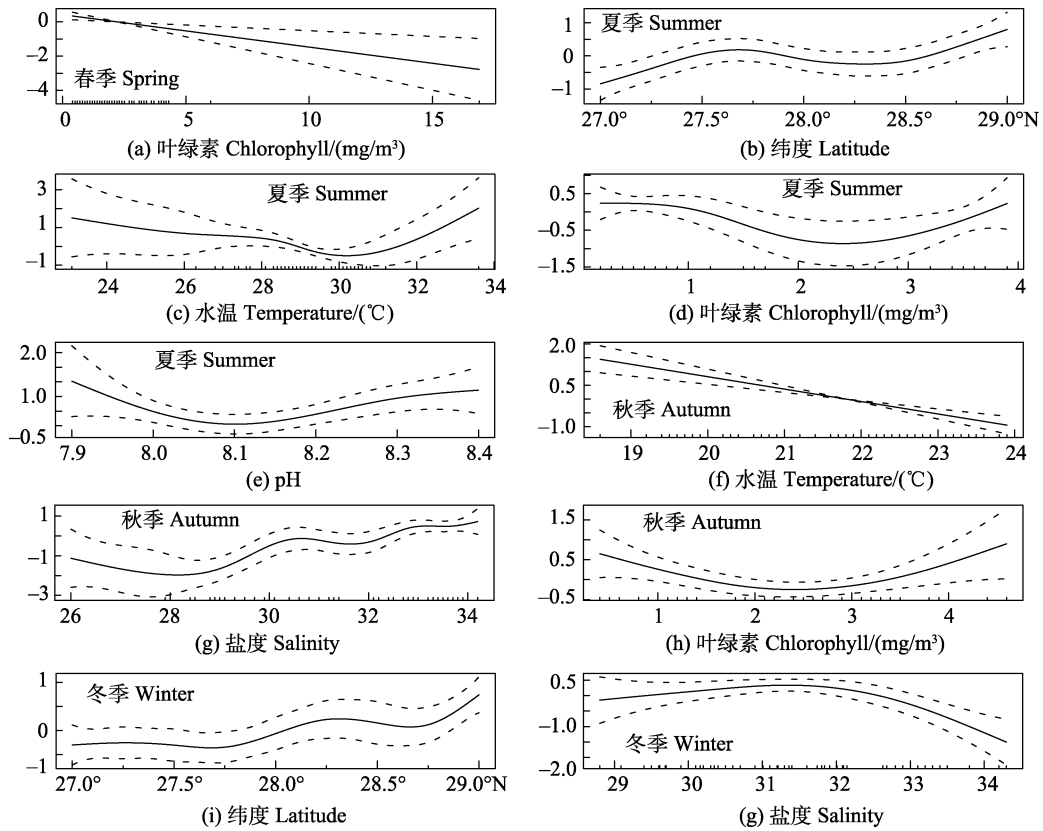


图 2 不同季节最佳 GAM 的显著性环境因子与资源密度关系

Fig.2 Relationship between significant environmental factors and resource density of optimal GAM in different seasons

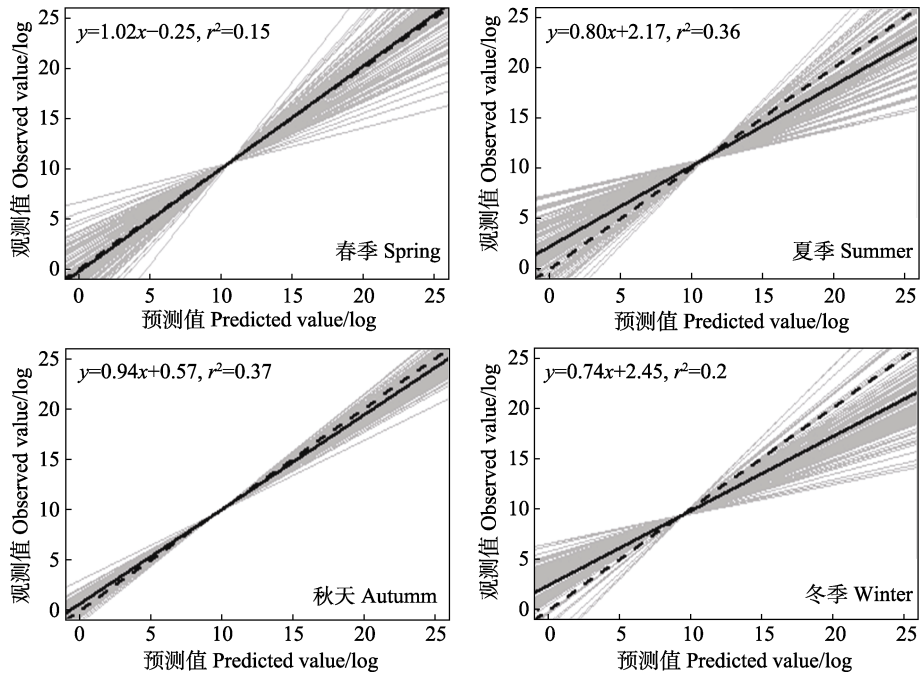


图 3 不同季节 GAM 预测值与实际观测值交叉验证线性回归

Fig.3 Cross validation linear regression of GAM predicted value and observation value in different seasons

灰色实线为每次 5 折交叉验证的回归线, 黑色实线为交叉验证的平均效应, 黑色虚线为 1 : 1 线
 The gray solid line was the regression line of 100 times of 5 fold cross validation, the black solid line was the average effect of cross validation, and the black dotted line was the 1 : 1 line

为 0.37; 其次为夏季, 回归决定系平均值为 0.36, 相对于其他季节而言, 春季回归决定系数平均值最低, 仅为 0.15。

2.5 浙江南部近海鱼类资源时空分布

在时间尺度上, 2020 年, 浙江南部近海鱼类资源密度各季节间存在明显的差异, 鱼类资源密度在夏

季最高, 在秋季和冬季相对偏低(图 4)。空间分布上, 除夏季外, 鱼类资源密度皆呈现外侧水域大于内侧水域的分布格局, 秋季和冬季这一现象尤为明显(图 4)。此外, 春季, 温台渔场的鱼类资源密度明显高于鱼山渔场; 夏季, 温台渔场和鱼山渔场鱼类资源均较为集中, 主要分布在 27.8°~28.4°N、121.7°~122.9°E 以及 28.9°N、122°E 海域附近(图 4)。

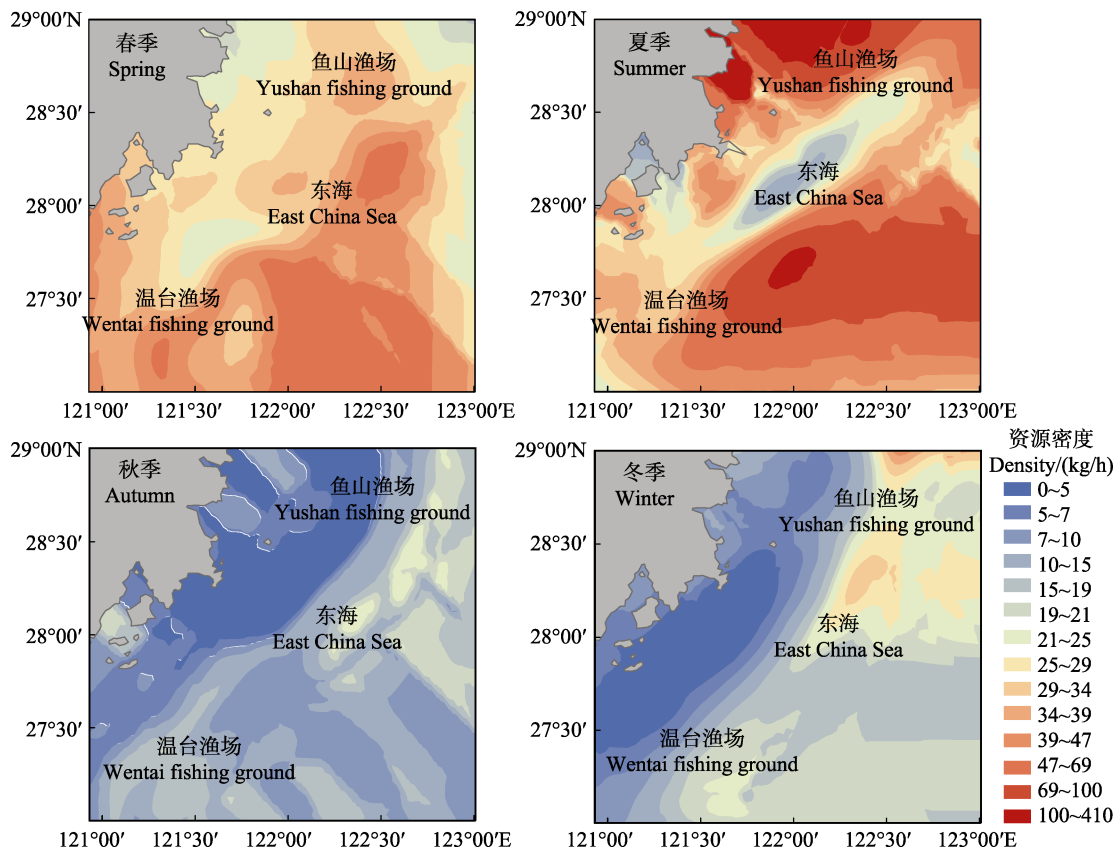


图 4 2020 年不同季节鱼类资源预测空间分布

Fig.4 Predicted spatial distribution of fish resources in different seasons in 2020

3 讨论

3.1 浙江南部近海环境因子对鱼类资源密度的影响

本研究发现, 各季节最佳预测模型因子组合存在较大不同, 但水温和盐度在 4 个季节的最佳模型中均出现且具有较高的解释率; 叶绿素出现在春季、夏季和秋季 3 个季节的预测模型中, 且与鱼类资源密度显著相关。因此, 本研究认为, 水温、盐度和叶绿素是影响浙江南部近海海域鱼类资源密度以及分布的关键影响因子。

水温对鱼类的生活习性有着重要影响, 不仅对鱼类的新陈代谢、生长发育以及繁殖产生影响, 同时, 对鱼类的洄游分布、集群行为、渔期的早晚和长短以

及中心渔场的位置有着不可忽视的影响(殷名称, 1995)。本研究发现, 水温在夏季预测模型中贡献率最大, 而在春季和秋季, 盐度贡献率最大, 这与 Gibson 等(1994)发现水温是控制鱼类生长和资源密度最重要的水文要素存在差异, 其原因可能是本研究分季节分别建立模型, 减小了季节间水温变化对鱼类资源的影响(马金等, 2020)。夏季, 水温与资源密度呈负相关性, 这可能是由于夏季水温较高, 而浙江南部近海鱼类为暖水种和暖温种鱼类(杜晓雪等, 2018), 过高的水温不利于其栖息(陈新军, 2014)。冬季, 越冬期的鱼类已从索饵场和产卵场过渡到东侧水域的越冬场, 外侧水域的水温较沿岸高(陈伟峰等, 2017), 因此, 冬季水温越高的水域, 鱼类资源密度越高, 从而表现

出水温与资源密度间存在正相关性, 这与 Hajisamae 等(2010)的研究结果相一致。

盐度对鱼类生活史的各个阶段都有重要的影响(王云峰等, 2002), 盐度在垂直或水平方向上的变化可以反映出鱼类洄游、集群的变化(胡杰, 1995)。本研究中, 秋季该海域外侧站点受到黑潮表层水的影响, 盐度自西向东(张秋华等, 2007), 而外侧水域鱼类资源密度大于内侧(陈伟峰等, 2017), 因此, 呈现出鱼类资源密度随盐度的增加而增加的趋势, 这与 GAM 结果相一致。

叶绿素对于鱼类资源分布有着重要影响。研究表明, 叶绿素 *a* 浓度是反映浮游植物生物量的重要指标(张迎秋, 2012), 可以根据叶绿素 *a* 的含量估算初级生产力(周伟华等, 2004)。一般来讲, 叶绿素浓度越高, 水域初级生产力越高, 更有利于洄游鱼类群体的摄食和育肥。但本研究发现, 春季浙江南部近海叶绿素与鱼类资源密度呈负相关关系, 夏季和秋季鱼类资源密度随叶绿素浓度升高呈先下降后上升的趋势。汪振华等(2011)、赵静等(2013)研究发现, 在浙江舟山马鞍列岛海域, 鱼类资源密度与叶绿素浓度呈负相关关系, 可能是由于同期鱼类资源密度受其他影响因子的作用更大, 导致鱼类资源密度分布与叶绿素浓度大小不相符。

3.2 鱼类资源密度时空分布特征

浙江南部近海鱼类资源密度有着明显的季节变化特征。春季的鱼类资源密度相对秋冬季较高, 但相对夏季偏低。于南京等(2020)研究认为, 这与大多数鱼类在春季产卵, 鱼类多为幼鱼, 其体型、体长和体重相对于其他季节相对较小有关。夏季的鱼类资源密度在 4 个季节中最高, 龙华(2005)研究表明, 在一定范围内, 鱼类的生长速度会随着水温的升高而加快, 且 5—9 月为该海域禁渔期, 因此, 鱼类群体在没有捕捞压力、饵料相对充足的条件下(陈新军, 2014), 快速生长, 成鱼数量逐渐增加, 资源密度在夏季达到最大值。秋季的鱼类资源密度相对于夏季明显下降, 这与禁渔期结束后, 捕捞努力量陡然增加, 大量鱼类资源被捕获有密不可分的关系。冬季的鱼类资源密度在 4 个季度中为最小值, 主要原因是冬季近岸水温过低, 较多鱼类向东侧深海水域进行越冬洄游, 造成该海域冬季鱼类资源密度下降(陈伟峰等, 2017)。总体来说, 基于渔业资源独立调查的浙江南部近海鱼类资源的季节变化大致规律为春季鱼类产卵行为使得鱼类资源密度相对偏低, 伏季休渔使得鱼类资源得以休养生息, 使得鱼类资源密度在夏季最高, 休渔期的结

束伴随捕捞力量的陡然出现, 使得鱼类资源密度在秋季明显降低, 冬季鱼类向海的越冬洄游使得浙江南部近海鱼类资源密度进一步降低。鱼类自身生长发育、水文环境变化以及人为捕捞等多种因素的共同作用下, 浙江南部近海鱼类资源呈现上述明显的季节变化。

各季节鱼类资源空间分布特征也存在明显的差异, 这与该海域常年受到黑潮、台湾暖流以及东海沿岸流等多种海流、水团的共同影响(张秋华等, 2007; 俞存根等, 2009)使该海域水文环境彼此间存在较大差异有关, 从而影响了鱼类的分布与洄游。在内侧水域, 黑潮暖流与闽浙沿岸水交汇成混合水, 其水温和盐度季节变化明显, 具有广温和广盐等特点, 且存在较强的变异性(李圣法等, 2005), 这使得该海域鱼类对水温和盐度适应性较强(李圣法, 2005), 分布范围较广, 具有明显的洄游习性。而大陆架外缘海域受到黑潮以及台湾暖流的影响, 常年保持着高温和高盐的特性, 使分布于该海域的鱼类大多数为暖水种鱼类(李圣法, 2005), 与内侧水域鱼类群落存在明显的差异。相关研究表明, 水文环境也可以通过对饵料生物发生、数量变动的作用(李建生等, 2009; 胡翠林等, 2018), 间接影响鱼群的资源分布, 如鱼类资源密度会随着浮游植物丰度的增大而增大(李敏等, 2017)。因此, 在生物、非生物环境因子的共同影响下, 该海域在空间分布上呈现出明显的差异。

3.3 GAM 影响因素分析

本研究在建立 GAM 前, 对资源密度进行对数化处理, 其主要原因包括: (1)将资源密度数据呈正态分布, 便于数据的观测和统计, 使数据更具有代表性; (2)缩小各个站点资源密度之间的差异, 降低极端值的影响, 可以最大可能地减少误差, 更好地利用 GAM 分析鱼类资源密度与影响因子之间的关系。随后建立鱼类资源密度与影响因子的 GAM, 主要步骤包括: 影响因子共线性检验、GAM 筛选、最佳模型预测性能检验和预测。通过 VIF 检验发现, 4 个季节纬度和经度的 VIF 值均>3(表 1), 因此, 经、纬度分别与环境因子建立 GAM。本研究通过对每个季节最佳预测模型进行 5 折交叉验证来判断模型的预测能力, 显示 100 次交叉验证的平均斜率为 0.74~1.02, 与 1:1 的回归正交线存在偏离, 但预测值和观测值存在明显的正相关关系, 因此, GAM 预测的鱼类资源的时间和空间分布仍具有一定的准确性。

本研究建立的 GAM 拟合程度虽然较好, 但仍然存在部分原因限制模型拟合程度的进一步提高, 可能的原因包括: (1)调查的空间尺度较小, 较短的时间序

列限制模型更好的拟合;(2)渔场的形成与环境要素的时空分布格局存在一定的关联(苏奋振, 2002)(例如, 前期温度偏低, 鱼类提前洄游, 即使后期环境因素有所恢复, 捕捞效果也很差, 难以获取准确的渔业资源密度), 时空分布结构较难参数化并应用于 GAM 分析(朱国平等, 2012); (3)渔业生态系统和渔业统计涉及大量的空间问题, 并存在较多的非线性、非加性的过程(Ciannelli *et al.*, 2008), 对基于模型方法解析鱼类时空分布与环境因子的关系产生一定的影响;(4)由于鱼类的聚集和分布是由环境和生物因素的复杂交互作用决定的(Zhao *et al.*, 2014), 且不同鱼种对环境因子的响应机制存在差异。本研究以整个鱼类群落为研究对象, 虽可以从整体上看环境对鱼类群聚的影响, 但由于不同鱼类受环境因素影响不同, 当研究对象为总体时, 可能会造成单种鱼种结果的相互抵消。本研究发现, 春季主要鱼类种类为黄鲫(*Setipinna taty*)、日本鯷(*Engraulis japonicus*)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)和日本竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)等, 夏季主要种类与春季较为接近, 为黄鲫和蓝圆鲹等鱼种。秋季主要鱼类为黄鲫、刀鲚(*Coilia nasus*)和日本鲭(*Scomber japonicas*)等, 冬季为黄鲫、斑鲹(*Konosirus punctatus*)和七星底灯鱼(*Benthoosema pterotum*)等种类。从种类组成上看, 4 个季度主要鱼类均为小型鱼类, 下一步研究中, 将聚焦以群落为研究对象和以种群为研究对象对探究鱼类与环境之间关系的影响。同时, 后续研究可将多物种的空间模型应用进来, 并考虑摄食关系等生物因子, 进一步揭示各因子与鱼类资源密度的关系, 以期更加准确地掌握鱼类资源的时空分布规律。

参 考 文 献

- BENJAMIN P, EDWIGE B, PASCAL L, *et al.* Modelling potential spawning habitat of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay. *Fisheries Oceanography*, 2007, 16(1): 16–30
- CHEN W F, PENG X, WANG Z H, *et al.* Community structure characteristics of fishes in the coastal area of south Zhejiang during autumn and winter. *Ocean Development and Management*, 2017, 34(11): 111–119 [陈伟峰, 彭欣, 汪振华, 等. 浙南近海秋冬季鱼类群落结构研究. *海洋开发与管理*, 2017, 34(11): 111–119]
- CHEN X J. *Fishery resources and fisheries*. 2nd ed. Beijing: Ocean Press, 2014, 152–167 [陈新军. *渔业资源与渔场学*. 第二版. 北京: 海洋出版社, 2014, 152–167]
- CHEN X J, TIAN S Q. Effects of SST and temp-spatial factors on abundance of nylon flying squid *Ommastrephes bartrami* in the northwestern Pacific using generalized additive models. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(2): 104–113 [陈新军, 田思泉. 利用 GAM 模型分析表温和时空因子对西北太平洋海域柔鱼资源状况的影响. *海洋湖沼通报*, 2007 (2): 104–113]
- CIANNELLI L, FAUCHALD P, CHAN K S, *et al.* Spatial fisheries ecology: Recent progress and future prospects. *Journal of Marine Systems*, 2007, 71(3): 223–236
- CONG T T, TONG C F, ZHAO C J, *et al.* Community composition and distribution characteristics of the fish assemblages in the rivers of Chongming Island in summer. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(5): 2067–2076 [从婷婷, 童春富, 赵成建, 等. 崇明岛内河夏季鱼类群落组成及分布特征. *生态学报*, 2021, 41(5): 2067–2076]
- DAI L B, TIAN S Q, PENG X, *et al.* Distribution of *Larimichthys polyactis* and its relationship with environmental factors in offshore water of southern Zhejiang. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(4): 1352–1358 [戴黎斌, 田思泉, 彭欣, 等. 浙江南部近海小黄鱼资源分布及其与环境因子的关系. *应用生态学报*, 2018, 29(4): 1352–1358]
- DIEGO R J, ARITZ P, ANTONIO L J. Sensitivity analysis of kappa-fold cross-validation in prediction error estimation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2010, 32(3): 569–575
- DU X X, TIAN S Q, WANG J Q, *et al.* Spatial and temporal variations in fish community off shore southern Zhejiang Province, East China Sea. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(4): 522–531 [杜晓雪, 田思泉, 王家启, 等. 浙江南部近海鱼类群落结构的时空特征. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(4): 522–531]
- DU X X. Biological characteristics and spatial distribution patten of *Harpadon nehereus* in offshore water of southern Zhejiang. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [杜晓雪. 浙江南部近海龙头鱼的生物学特征及其空间分布格局. 上海: 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- GIBSON R N. Impact of habitat quality and quantity on the recruitment of juvenile flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1994, 32(2): 191–206
- GUO P J, JIANG X Q, YU C G, *et al.* Analysis of the fish community structure in the spring and autumn of the Zhoushan coastal fishing grounds. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 1–11 [郭朋军, 江新琴, 俞存根, 等. 舟山沿岸渔场春秋鱼类群落结构特征分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 1–11]
- HAJISAMAE S, YEESIN P. Patterns in community structure of trawl catches along coastal area of the South China Sea. *Raffles Bulletin of Zoology*, 2010, 58(2): 357–368
- HU C L, ZHANG Y Z, LI D W, *et al.* Study on fish resources and community diversity during spring and summer in the coastal spawning ground of Zhejiang Province, China. *Acta*

- Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 984–995 [胡翠林, 张亚洲, 李德伟, 等. 浙江沿岸产卵场春、夏季鱼类资源密度和群落多样性研究. 水生生物学报, 2018, 42(5): 984–995]
- HU J. Fisheries. Beijing: China Agriculture Press, 1995 [胡杰. 渔场学. 北京: 中国农业出版社, 1995]
- LI B, CAO J, CHANG J H, *et al.* Evaluation of effectiveness of fixed-station sampling for monitoring American lobster settlement. North American Journal of Fisheries Management, 2015, 35(5): 942–957
- LI M, XU B D, MA Q Y, *et al.* Generalized additive model reveals effects of spatiotemporal and environmental factors on the relative abundance distribution of *Konosirus punctatus* in the Yellow River estuary and its adjacent waters. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 963–969 [李敏, 徐宾铎, 麻秋云, 等. 时空及环境因子对黄河口及邻近水域斑鰻资源丰度的影响. 中国水产科学, 2017, 24(5): 963–969]
- LI S F, CHENG J H, YAN L P. The spatial pattern of the fish assemblage structure in the mid-southern East China Sea. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(3): 110–118 [李圣法, 程家骅, 严利平. 东海中南部鱼类群聚结构的时空特征. 海洋学报, 2005, 27(3): 110–118]
- LI S F. Ecology of fish community in the East China Sea continental shelf-spatial pattern and its diversity. Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2005 [李圣法. 东海大陆架鱼类群落生态学研究——空间格局及其多样性. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2005]
- LI S F, CHENG J H, YAN L P. Spatial structures of fish communities on the continental shelf of the East China Sea. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(11): 4377–4386 [李圣法, 程家骅, 严利平. 东海大陆架鱼类群落的空间结构. 生态学报, 2007, 27(11): 4377–4386]
- LI J S, LIN L S, CHENG J H. Distribution characteristic of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis* Bleeker) and its relationship with bottom water temperature and salinity in the northern East China Sea in autumn. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 348–356 [李建生, 林龙山, 程家骅. 东海北部秋季小黄鱼分布特征及其与底层温度和盐度的关系. 中国水产科学, 2009, 16(3): 348–356]
- LIU Y S, GU X K, TANG S K, *et al.* Fish community structure and its relationship with main environmental variables in the East Taihu Lake. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(2): 769–780 [刘燕山, 谷先坤, 唐晟凯, 等. 东太湖鱼类群落结构特征及其与环境因子的关系. 生态学报, 2021, 41(2): 769–780]
- LONG H. The effect of temperature on fish survival. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science), 2005, 51(S1): 254–257 [龙华. 温度对鱼类生存的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 51(S1): 254–257]
- MA J, HUANG J L, CHEN J H, *et al.* Analysis of spatiotemporal fish density distribution and its influential factors. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(6): 936–946 [马金, 黄金玲, 陈锦辉, 等. 基于 GAM 的长江口鱼类资源时空分布及影响因素. 水产学报, 2020, 44(6): 936–946]
- MAUNDER M N, PUNT A E. Standardizing catch and effort data: A review of recent approaches. Fisheries Research, 2004, 70(2/3): 141–159
- NIU M X, WANG J, WU Q, *et al.* The relationship of stock density distribution of wintering anchovy (*Engraulis japonicus*) and environmental factors based on remote sensing in central and southern Yellow Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 11–20 [牛明香, 王俊, 吴强, 等. 基于遥感的黄海中部越冬鳀资源密度分布与环境因子的关系研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 11–20]
- PIET G J. Using external information and GAMs to improve catch-at-age indices for North Sea plaice and sole. ICES Journal of Marine Science, 2002, 59(3): 624–632
- SAGARESE S R, FRISK M G, CERRATO R M, *et al.* Application of generalized additive models to examine ontogenetic and seasonal distributions of spiny dogfish (*Squalus acanthias*) in the Northeast (US) shelf large marine ecosystem. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2014, 71(6): 847–877
- SU F Z. Spatio-temporal analysis for marine fishery resources. Doctoral Dissertation of Institute of Geographic Sciences and Natural Resources Research, CAS, 2001 [苏奋振. 海洋渔业资源时空动态研究. 中国科学院地理与资源研究所博士研究生学位论文, 2001]
- WAN R, ZHANG T Z, LI Z G, *et al.* Spatial distribution and inter-annual variability of spawning grounds of *Cynoglossus joyneri* in the Yellow Sea coastal waters in summer. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(3): 1023–1032 [万荣, 张同征, 李增光, 等. 黄海近岸海域短吻红舌鳎夏季产卵场的空间分布及其年际变化. 应用生态学报, 2020, 31(3): 1023–1032]
- WANG Y F, ZHU X H. A review on impact of salinity on patterns of fish ecophysiology. Studia Marina Sinica, 2002, 44(5): 151–158 [王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响. 海洋科学集刊, 2002, 44(5): 151–158]
- WANG Y Y, GUO Z, LI G C, *et al.* Precipitation estimation and analysis of the Three Gorges Dam region (1979–2014) by combining gauge measurements and MSWEP with generalized additive model. Acta Geographica Sinica, 2017, 72(7): 1207–1220 [王圆圆, 郭微, 李贵才, 等. 基于广义加性模型估算 1979–2014 年三峡库区降水及其特征分析. 地理学报, 2017, 72(7): 1207–1220]
- WANG Y H, JIANG G C, DONG H L. Distribution characteristics and relationship of dissolved oxygen, pH value and nutrients in the southern sea of Zhejiang in spring. Acta Oceanologica Sinica, 1990, 12(5): 654–660 [王玉衡, 蒋国昌, 董恒霖. 春季浙江南部海区溶解氧、pH 值和营养盐分布特征及相互关系研究. 海洋学报, 1990, 12(5):

- 654–660]
- WANG Z H, WANG K, ZHAO J, *et al.* Fish community structure and its seasonal change in subtidal sandy beach habitat off southern Gouqi Island. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(5): 1332–1342 [汪振华, 王凯, 赵静, 等. 枸杞岛潮下带沙地生境鱼类群落结构和季节变化. *应用生态学报*, 2011, 22(5): 1332–1342]
- WU J H, DAI L B, DAI X J, *et al.* Comparison of generalized additive model and boosted regression tree in predicting fish community diversity in the Yangtze River estuary, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(2): 644–652 [吴建辉, 戴黎斌, 戴小杰, 等. GAM 模型和 BRT 模型在长江口鱼类群落多样性预测中的比较. *应用生态学报*, 2019, 30(2): 644–652]
- YIN M C. *Fish ecology*. Beijing: China Agriculture Press, 1995 [殷名称. *鱼类生态学*. 北京: 中国农业出版社, 1995]
- YU C G, YU C D, ZHANG F J, *et al.* Fish species and quantity off southern Zhejiang, East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(3): 353–360 [俞存根, 虞聪达, 章飞军, 等. 浙江南部外海鱼类种类组成和数量分布. *海洋与湖沼*, 2009, 40(3): 353–360]
- YU N J, YU C G, XU Y J, *et al.* The relationship between distribution of fish abundance and environmental factors in the outer waters of the Zhoushan Islands. *Acta Oceanologica Sinica*, 2020, 42(10): 80–91 [于南京, 俞存根, 许永久, 等. 舟山群岛外海域鱼类数量分布与环境因子的关系. *海洋学报*, 2020, 42(10): 80–91]
- ZHANG Q H, CHENG J H, XU H X, *et al.* *Fishery resources and their sustainable utilization in the East China Sea*. Shanghai: Fudan University Press, 2007 [张秋华, 程家骅, 徐汉祥, 等. *东海渔业资源及其可持续利用*. 上海: 复旦大学出版社, 2007]
- ZHANG Y Q. Environmental impact on the fish assemblage structure in adjacent sea area of the Yangtze River estuary. Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012 [张迎秋. 长江口近海鱼类群落环境影响分析. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2012]
- ZHAO J, CAO J, TIAN S Q, *et al.* A comparison between two GAM models in quantifying relationships of environmental variables with fish richness and diversity indices. *Aquatic Ecology*, 2014, 48(3): 297–312
- ZHAO J, ZHANG S Y, WANG Z H, *et al.* Fish community diversity distribution and its affecting factors based on GAM model. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(12): 3226–3235 [赵静, 章守宇, 汪振华, 等. 基于 GAM 模型的鱼类群落多样性分布及影响因素. *生态学杂志*, 2013, 32(12): 3226–3235]
- ZHENG B, CHEN X J, LI G. Relationship between the resource and fishing ground of mackerel and environmental factors based on GAM and GLM models in the East China Sea and Yellow Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 379–386 [郑波, 陈新军, 李纲. GLM 和 GAM 模型研究东黄海鲈资源渔场与环境因子的关系. *水产学报*, 2008, 32(3): 379–386]
- ZHOU W H, YUAN X C, HUO W Y, *et al.* Distribution of chlorophyll *a* and primary productivity in the adjacent sea area of Changjiang River estuary. *Acta Oceanologica Sinica*, 2004, 26(3): 143–150 [周伟华, 袁翔城, 霍文毅, 等. 长江口邻域叶绿素 *a* 和初级生产力分布. *海洋学报*, 2004, 26(3): 143–150]
- ZHU G P, ZHU X Y, XU Y Y, *et al.* The spatiotemporal distribution of fishing grounds for antarctic krill (*Euphausia superba*) around the South Orkney Islands in Austral summer-autumn and its relation to environmental factors based on a generalized additive model. *Chinese Journal of Polar Research*, 2012, 24(3): 266–273 [朱国平, 朱小艳, 徐怡琰, 等. 基于 GAM 模型分析夏秋季南奥克尼群岛南极磷虾渔场时空分布及与环境因子之间的关系. *极地研究*, 2012, 24(3): 266–273]

(编辑 冯小花)

Distribution Characteristics and Influencing Factors of Fish Resources in the Offshore Waters South of Zhejiang

MA Wen¹, QIN Song², ZHAO Jing^{1,3,4}①

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

2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, Zhejiang 325005, China;

3. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306, China;

4. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract Based on fishery-independent survey data from 2016 to 2020 in the offshore waters south of Zhejiang, the relationship between fish resource density and environmental factors was explored using a generalized additive model, and the spatial and temporal distribution of fish resource density was predicted using the optimal models and environmental data of 2020. The results showed that the optimal models had deviances of 47.9%, 68.0%, 56.6% and 45.6% in spring, summer, autumn, and winter, respectively. The average slope of the cross-validation regression line was 0.74–1.02, and the model had good fitting and prediction abilities. Water temperature, salinity, and chlorophyll were significant factors that affected fish resource density in the offshore waters south of Zhejiang, and they had different influencing mechanisms in different seasons. In general, in summer and autumn, water temperature had a significant impact on fish resource density ($P<0.01$). And there is a negative correlation between water temperature and fish resource density in autumn ($r=-0.225$, $P<0.05$). In autumn, fish density increased with an increase in salinity, and in winter, fish density first increased and then decreased, reaching the maximum value at a salinity of 31.5. In spring, summer and autumn, chlorophyll was significantly correlated with fish resource density ($P<0.05$). Overall, the results showed that the fish resource density in autumn and winter was relatively lower than that in spring and summer in 2020. In spring, the fish resources in Wentai fishing ground were significantly greater than those in Yushan fishing ground. In summer, fish resources in Wentai and Yushan fishing grounds were relatively concentrated, primarily distributed at 27.8°~28.4°N, 121.7°~122.9°E and at 28.9°N, 122°E, respectively.

Key words Generalized additive models; Fishery resources; Resource distribution; Environmental factor; Offshore south of Zhejiang

① Corresponding author: ZHAO Jing, E-mail: jzhao@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210303001

http://www.yykyxjz.cn/

张志华, 冯博, 朱腾飞, 郝先才, 王倩, 邵长伟, 王洪岩. 半滑舌鲷白细胞介素 12 的 *p35a* 和 *p40c* 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 12–23

ZHANG Z H, FENG B, ZHU T F, HAO X C, WANG Q, SHAO C W, WANG H Y. Expression and regulation analysis of the *p35a* and *p40c* subunits of interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis* infected by *Vibrio harveyi*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 12–23

半滑舌鲷白细胞介素 12 的 *p35a* 和 *p40c* 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析*

张志华^{1,2} 冯博^{1,2} 朱腾飞² 郝先才²
王倩² 邵长伟² 王洪岩^{2①}

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

摘要 本研究以海水养殖鱼类半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为研究对象, 克隆了白细胞介素 12 (IL-12)的 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基的基因编码区序列, 编码区长度分别为 651 bp 和 984 bp。系统进化树分析显示, 半滑舌鲷的 *p35a* 和 *p40c* 分别与其他鱼类对应的基因聚为一支。氨基酸同源性分析显示, *p35a* 与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)相似性最高, *p40c* 与三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)相似性最高, 分别为 52.04%和 48.67%。组织表达分析显示, *p35a* 在鳃、脑、心和卵巢中表达量较高, *p40c* 在肝、脾、鳃和心中表达量较高。通过哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染实验, 分析了半滑舌鲷 *p35a*、*p40c* 及其相关基因(*ifn-γ* 和 *il-10*)在哈维氏弧菌感染过程中的表达模式, *p35a* 在脾中, 48 h 表达显著上升($P<0.05$), 之后表达逐渐下降; 在肝和肠中, 72 h 表达显著上升。*p40c* 在脾、肝中, 6 h 表达显著上升; 在肾中, 48 h 产生上调; 在肠中, 6 h 开始上调, 并在 48 h 上升至最高点。*ifn-γ* 在肝和肠中, 均在 *p35a* 表达上调之前显著升高, 在脾中晚于 *p35a* 上调表达; *il-10* 在肝、脾、肾、肠中表达趋势中均与 *p40c* 的表达趋势相反。将半滑舌鲷淋巴细胞过表达 *p35a* 和 *p40c* 基因后, 检测了受不同浓度脂多糖(LPS)刺激后干扰素(*ifn-γ*)、肿瘤坏死因子(*tnf-α* 和 *tnf-β*)等免疫相关细胞因子的表达变化。结果显示, *p35a*、*p40c* 能够显著提高 *tnf-α* 在 LPS 刺激下的表达水平。上述结果表明, IL-12 的 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基能够响应哈维氏弧菌对半滑舌鲷的刺激, 过表达 *p35a*、*p40c* 能够通过诱导 *tnf-α* 基因的表达来参与机体的免疫应答。研究结果可为 IL-12 作为半滑舌鲷抗哈维氏弧菌疫苗佐剂的开发提供理论基础。

关键词 半滑舌鲷; 免疫应答; 白细胞介素 12; 哈维氏弧菌

中图分类号 S941.42+4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0012-12

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900301)、中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD19)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 the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900301), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD19), and China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 张志华, E-mail: zhangzh0115@163.com

① 通讯作者: 王洪岩, E-mail: wanghongyan@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-03, 收修改稿日期: 2021-03-22

白细胞介素 12 (interleukin 12, IL-12) 是一种在先天性和适应性免疫应答中具有多效效应的细胞因子 (Watford *et al*, 2003)。IL-12 蛋白是由 P35 亚基和 P40 亚基通过二硫键共价连接形成的异源二聚体 (Jones *et al*, 2011), 主要由抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APC) 和吞噬细胞产生 (Vignali *et al*, 2012)。Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 识别病原相关分子模式介导 IL-12 的产生和释放。在树突状细胞中, 病原体通过结合 TLR 刺激树突状细胞产生初始的 IL-12。而在巨噬细胞中, IL-12 的产生必须有干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等辅助细胞因子的参与 (Gee *et al*, 2009)。研究表明, P35 亚基和 P40 亚基在同一细胞中表达, 才能产生具有生物学活性的 IL-12 异源二聚体 (Schoenhaut *et al*, 1992)。在缺乏 P35 亚基时, P40 亚基以单体或同二聚体的形式分泌, 并与 IL-12 受体结合, 从而抑制 IL-12 的活性。P35 亚基不能单独分泌到胞外, 只能在与 P40 亚基结合后才能共同分泌, 由于 P35 亚基的 mRNA 表达量较低, 被认为是 IL-12 异源二聚体形成的限制因素 (Gillessen *et al*, 1995)。前期研究表明, CD4⁺ T 细胞与 APCs 结合后, IL-12 作为主要细胞因子, 诱导 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化 (Manetti *et al*, 1993), 而 IL-10 能够抑制 Th1 细胞分化 (Hsieh *et al*, 1993)。综上所述, IL-12 协调先天性免疫和适应性免疫, 参与了宿主和病原体之间的相互作用, 在清除细胞内病原体中具有重要作用 (Prochazkova *et al*, 2012)。

当脊椎动物受到病原体感染时, 吞噬细胞分泌的 IL-12 作用于 T 细胞等免疫细胞, 促使其产生 IFN- γ 、TNF- α 和 TNF- β 等细胞因子, 增强免疫能力 (Kobayashi *et al*, 1989)。鱼类作为原始的脊椎动物, 有着和哺乳动物相似的免疫系统, Yoshiura 等 (2003) 在对红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 基因组的分析中, 首次发现了组成 IL-12 的 *p35* 和 *p40*。之后, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中成功克隆出 *p35a* 和 *p35b* 两种 *p35* 基因亚型, *p40a*、*p40b* 和 *p40c* 三种 *p40* 基因亚型 (Huisling *et al*, 2006; Nascimento *et al*, 2007)。前期研究发现, 病毒感染, 细菌注射、脂多糖 (LPS) 或刀豆蛋白 A 刺激后 (Huisling *et al*, 2006; Nascimento *et al*, 2007; Arts *et al*, 2010), 硬骨鱼的 *p35* 和 *p40* 的 mRNA 表达模式与哺乳动物类似, 这表明 IL-12 在硬骨鱼免疫应答中作为哺乳动物的直系同源基因发挥相似的作用 (Øvergård *et al*, 2012), 但不同亚型间的表

达有明显差异。在鱼类疫苗研究中发现, 石斑鱼重组 IL-12 作为靶向疫苗的佐剂可以激活免疫应答, 如: 刺激外周血白细胞增殖、诱导 *tnf- α* 基因表达 (Tsai *et al*, 2014); 高体鲷 (*Seriola dumerili*) 重组 IL-12 与诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 福尔马林灭活疫苗共同注射, 与单独注射诺卡氏菌福尔马林灭活疫苗相比, Th1 型免疫应答增加, 提高了高体鲷对诺卡氏菌的免疫率 (Matsumoto *et al*, 2017)。因此, 重组 IL-12 能够作为疫苗佐剂延长疫苗对鱼类感染病原体的保护作用。

半滑舌鳎是我国重要的海水养殖鱼类 (Song, 2016), 工厂化高密度养殖程度较高, 以哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 为主的细菌病在其养殖过程中造成了较高的死亡率, 迫切需要开展免疫防控技术研究, 提高半滑舌鳎对哈维氏弧菌病的抗病力。本课题组已完成半滑舌鳎全基因组测序 (Chen *et al*, 2014), 前期利用全基因组选择技术筛选出对哈维氏弧菌病抗病力高的亲鱼 (Liu *et al*, 2018); 克隆与分析了 *dctm5*、*sta5bl*、*rspo2l*、*pkca*、*plgR* 等多个与哈维氏弧菌病相关的免疫基因 (Li *et al*, 2020; Wang *et al*, 2019; Wei *et al*, 2018a、2018b、2019)。本研究克隆半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 的编码序列, 并分析 *p35a*、*p40c* 及相关免疫基因 (*ifn- γ* 和 *il-10*) 在半滑舌鳎哈维氏弧菌感染过程中的表达模式。同时, 利用半滑舌鳎淋巴细胞过表达 *p35a* 和 *p40c*, 并进行 LPS 刺激, 探究半滑舌鳎 IL-12 参与免疫应答的可能调控途径, 以期为研制半滑舌鳎哈维氏弧菌病的疫苗佐剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

本实验所用半滑舌鳎均来自明波水产养殖公司 (山东莱州)。随机取 3 条健康的半滑舌鳎成鱼, 麻醉后分别取胃、肠、脾脏、肝脏、心脏、肾脏、性腺、鳃、脑和肌肉, 分装至冻存管后迅速在液氮中冷冻, 取出后, 保存于-80℃超低温冰箱。哈维氏弧菌感染实验使用 40 条健康半滑舌鳎, 体长为 (41.0±2.7) cm, 体重为 (438.4±53.0) g, 具体实验方案参照之前操作步骤 (Wei *et al*, 2018b), 腹腔注射的哈维氏弧菌浓度为 1×10⁴ CFU/mL, 注射剂量为 4 μ L/g。分别在注射后的 6、16、48、72 和 96 h 进行样品采集, 每个时间点分别随机选取 5 条鱼, 将鱼麻醉, 采集肝脏、肾脏、脾脏、肠 4 个免疫相关组织, 采集的样品用锡纸包裹后迅速放入液氮中, 之后保存于-80℃超低温冰箱。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取半滑舌鳎各组织中的 RNA, 采

用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,之后使用微量分光光度计检测 RNA 的浓度与纯度,从而获得符合实验要求的 RNA。使用 cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa),按照说明书进行 cDNA 的合成。

1.3 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区全长 cDNA 的克隆

根据已发表的半滑舌鳎全基因组序列获得 *p35a* 和 *p40c* 的预测序列,根据序列使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),以免疫组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证编码区序列,PCR 反应体系: LaTaq 酶(TaKaRa) 0.5 μ L, dNTP 8 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 灭菌去离子水 33.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环(98 $^{\circ}$ C 12 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。之后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分离,切下单一一条带的 PCR 产物,使用胶回收试剂盒(Vazyme)进行回收纯化,将纯化后的 PCR 产物连接到 pEASY-T1 (TIANGEN)载体,按照说明书进行后续基因克隆实验,最后挑取阳性克隆交由华大基因科技有限公司进行测序。

1.4 生物学分析及进化树构建

测序后的结果使用 DNAMAN 和 SnapGene 进行比对和分析,得到所克隆的半滑舌鳎的 *p35a* 和 *p40c* 的编码序列,根据编码区序列使用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白分子量及等电点;

利用 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)预测蛋白质结构域;使用 PyMOL 预测 IL-12 的蛋白质三维结构模型;多序列比对和进化树构建所需的氨基酸序列均来源于 Ensemble 和 NCBI 数据库;通过 MEGA 7.0,使用邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统进化树(bootstrap = 1000)。

1.5 *p35a* 和 *p40c* 及相关基因表达模式检测

选取各组织中 1 μ g 的 RNA,利用 Prime Script RT reagent 试剂盒(TaKaRa, 日本)反转录生成 cDNA。通过 *p35a*-qF/R 和 *p40c*-qF/R 引物(表 1),利用 Quantinova SYBR Green PCR 试剂盒(QiaQen)进行 RT-qPCR,反应体系为 20 μ L, 分别包含 1 μ L cDNA、10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (2 \times)、2 μ L ROX Reference Dye、0.7 μ mol/L 的上游和下游引物以及 5.6 μ L 无菌水。反应在 ABI StepOnePlus_Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 美国)上进行,反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, +1 $^{\circ}$ C/min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。使用 β -actin 作为内参(β -actin-qF/R) (表 1)。每个反应体系重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 *p35a*、*p40c* 及其相关基因在半滑舌鳎各组织、哈维氏弧菌感染的免疫组织及细胞样品中的表达水平。使用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 设定 $P < 0.05$ 为差异显著。

表 1 实验所用的引物

Tab.1 Primers used in the experiments

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Utilization
<i>p35a</i> -F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGAACACACTTCGATTGTACCCG	CDS fragment PCR
<i>p35a</i> -R	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGCGGCTTCCTGTGCTCTCCTGAGG	CDS fragment PCR
<i>p40c</i> -F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGACTGCGACTCAGTGGATGG	CDS fragment PCR
<i>p40c</i> -R	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGCGGGATCCTCTTTTCTTCTGT TTC	CDS fragment PCR
<i>p35a</i> -qF	ACACTTCGATTGTACCCGTC A	qRT-PCR
<i>p35a</i> -qR	CTCCGTCTGACTCTTACCAC	qRT-PCR
<i>p40c</i> -qF	TGGGCCCTGAATGCACTAAA	qRT-PCR
<i>p40c</i> -qR	AGACGATCGTGGGGATACCA	qRT-PCR
β -actin-qF	GCTGTGCTGTCCCTGTA	qRT-PCR
β -actin-qR	GAGTAGCCACGCTCTGTC	qRT-PCR
<i>il-10</i> -qF	GTCCGGCTGAAGAAGCTC	qRT-PCR
<i>il-10</i> -qR	GAAAGAGTCCTCGATGCTG	qRT-PCR
<i>ifn-γ</i> -qF	CTTGTCAGGTCTTGACCCTG	qRT-PCR
<i>ifn-γ</i> -qR	GTAACAGCAGGTTTTGGATGG	qRT-PCR
<i>tnf-α</i> -qF	GCTCACCTCAAGAAGAAGAC	qRT-PCR
<i>tnf-α</i> -qR	CCATTCCACCGAGTTGGTC	qRT-PCR
<i>tnf-β</i> -qF	GAAATGCAGCCCAGCCAC	qRT-PCR
<i>tnf-β</i> -qR	CAAATGGATGGCCGCTTG	qRT-PCR

1.6 半滑舌鲷 *p35a* 和 *p40c* 过表达载体的构建

使用 ClonExpress II One Step cloning kit-C112 (Vazyme) 对 pHAGE 载体和 *p35a*、*p40c* 的编码区序列分别进行重组, 得到 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 重组载体。将重组后的产物转入感受态细胞中, 挑选单克隆进行 PCR 鉴定。对鉴定出的阳性菌落进行测序, 以确保载体构建的准确性。筛选准确的单细胞克隆菌株进行培养, 使用 EndoFree mini plasmid kit II (TIANGEN), 获得半滑舌鲷的 *p35a* 和 *p40c* 过表达载体。

1.7 半滑舌鲷原代细胞培养、转染与 LPS 处理

将健康的半滑舌鲷放于 18℃~20℃ 高双抗消毒海水(1000 μg/mL 链霉素, 1000 IU/mL 青霉素)中暂养 12~24 h 后, 在实验前将鱼放入 75% 酒精中浸泡 1~2 min, 于超净工作台中, 用注射器抽取半滑舌鲷血液, 使用含有抗凝剂的 PBS 重悬细胞, 过 40 μm 细胞筛, 再用 PBS 漂洗 3 遍, 收集沉淀。之后, 用 5% FBS-DMEM/F12 培养液充分悬浮并均匀接种于 T25 培养瓶中, 进行细胞计数, 调整细胞密度至约 2×10^6 个/mL, 在 24℃ 培养箱中启动原代培养。24 h 后, 将细胞所用培养液更换为 DMEM/F12, 分别添加 10% 胎牛血清(FBS)、100 μg/mL 链霉素、100 IU/mL 青霉素、40 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 和 40 ng/mL IGF-I。使用 Lipo2000 (Invitrogen) 进行细胞转染, 每孔添加 2.5 μg 质粒(对照组添加空质粒), 按说明书进行后续操作。分别用不同浓度的 LPS (0、1、10 mg/L) 进行处理, 在 24 h 收集细胞置于 -80℃ 冰箱中, 留待后续检测。

2 结果与分析

2.1 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区克隆、序列分析和蛋白质三维结构模型预测

完成了半滑舌鲷 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区序列的克隆, 其中, *p35a* 的 ORF 为 651 bp, 编码 216 个氨基酸, 预测蛋白质的分子量为 24.11 kDa, 理论等电点 (pI) 为 7.49 (图 1); *p40c* 的 ORF 为 984 bp, 编码 327 个氨基酸, 预测蛋白质的分子量为 37.78 kDa, pI 为 6.57 (图 2)。将 *p35a* 和 *p40c* 的 cDNA 比对基因组 DNA, 显示 *p35a* 和 *p40c* 都包含 7 个外显子。

通过 SMART 进行保守结构分析。结果显示, P35a 蛋白中存在 1 个 IL-12 蛋白结构域; P40c 存在 3 个蛋白结构域, 分别为免疫球蛋白结构域(IG)、IL-12p40_c 结构域和 I 类细胞因子受体结构域(d1f42a3)。其中,

P40c 还具有 1 个信号肽(图 3)。使用 PyMOL 同源建模半滑舌鲷 P35a 和 P40c 的蛋白质三级结构, 结果显示, 半滑舌鲷的 P35a 蛋白含有较多的 α -螺旋, 为 P35 典型四螺旋拓扑结构; 半滑舌鲷 P40c 蛋白则含有较多的 β 折叠; P35a 蛋白和 P40c 蛋白以类似于配体和受体结合的方式, 共价结合形成异源二聚体(图 4)。

```

1 M N T L R L Y P S S S A L L P L L L P L
1 ATCAACACACTCGATTGTACCCGTCAGCAGTGTCTGCTCCGCTGCTGGCCGCTG
21 L L Q L Q L L T L C P S A T S A L P L R
61 CTGTTGCAGTCCAACTCCTGACCCCTGTGCCAGTGTACCTCGGCGTGCCTAGAGA
41 A G D S G C A Q C S L L F R N L L L N V
121 GCAGGGACAGCGGCTGTGCTCAGTGTCTGCTCAGGAATCTGCTGCTCAACGTC
61 T D L L Q S D N L C F G I T S D K A V V
181 ACCGATCTCTCCAAAGTGACAACCTGTGTTTGAATCACATCTGATAAAGCAGTGGT
81 K S Q T E T L L T C T P P L T Q N P S C
241 AAGATCAGACGGAGACTACTGACCTGTACCCCCACTGACACAGAACCAAGCTGC
101 N L Q R N V S F S E R D C L R N I M K D
301 AATCTGCAGAGAAATGTATCTTTTCAGTGAGAGGACTGTGAGGAACATCATGAAGAC
121 L L Y Y E A A I K S Y I H S P L R S P E
361 CTGCTACTATGAAGTGCCTAAATCTACATCCACTCCCTCTCAGAACCCCTGAA
141 E E V A L L S P T L G V I E S L K N C S
421 GAGGAGTGGCTTCTCAGCCGACTCTGGGGTAATGAGAGCCTGAAAGAACTGCTCC
161 L L K S E D I K Y S E D V A Q M W G S D
481 CTGTTGAAGTGGAGATCAAAATTCAGAGGACGTGCTCAAATGTGGGGTACCGAC
181 T Y T N R Q E M C K M M R G F Y V R A I
541 ACCTACCAACAGACAGGAGATGTCAAGATGATGAGGGCTTCTACGTACGAGCCAT
201 T I N R A M G Y I S S G E H R K *
601 ACCATCAACCGAGCCATGGGCTACATCTCCTCAGGAGACACAGGAAGTGA

```

图 1 半滑舌鲷 *p35a* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *p35a* gene in *C. semilaevis*

方框内为起始密码子、终止密码子。图 2 同

The box contains start codon and stop codon. The same as in Fig.2

```

1 M T A T Q W M V G F L L M A L Y E A H A
1 ATCACTGCGACTCAGTGGATGGTGGGTCTCGTCTATGAAGCACATGCT
21 L N H F P E N F V V V N R N N K N P T V
61 CTAAACCCTTCCAGAAAATTTGTTGGTCAATAGAAAATAACAAGAACCCACCTG
41 L T C S T E P V N G S I T W T H D S A E
121 CTGACCTGCAGCAGGAGCCGTTAATGATCGATCAGTGCACATGACAGTGCAGAG
61 I E I D H V D Y Q N G N L T L S Y V
181 ATAGAAATCGATCATGTTGATATCAGCAGAACGGTGAATAAATCTGTCATATGTT
81 E T P E V G K Y T C W S G N H E L S T R
241 GAAACACCTGAAGTGGGAAATACACCTGCTGGAGCGGAAACATGAGTGTGATCCACC
101 Y L L L E V Q R E K D S D S F L S C W A
301 TACCTGCTGGAGGTCCAGAGGAGAAAGATTGAGCTCATTCTCAGCTGTTGGGCA
121 E S Y H C R F S C K W N N N E Y T A V R
361 GAGTGTACTGATGATGATGTTGTAATGGAACAACAACGAATACACGGTGTGCGT
141 V G L G P E C T K G E K S C H W D G S
421 GTCGACTGGGCCCTGAATGCACTAAAGGTGAAAGTCTGCGACTGGTTCGACGGCAGC
161 R P T S N G E F H F E L H H T L S P F A
481 CGTCAAACCTCAAATGGGAAATTCACCTTTGAGCTGCATCACACACTGTCGCCCTTGGCA
181 E E T N R L E I T A E A I N E Q F M L R
541 GAGAAACCAACAGCCTTGAATCACTGCTGAGCCATCAATGAGCAGTTCATGCTCAGA
201 L T K K F Y L R D I V Q P G I P T I V S
601 CTCACCAAGAAATTTATCTCCGAGACATAGTCAACCTGGTATCCCCAGCATGCTCC
221 C N K V K Q N L S V T I A P P A N W S T
661 TGTAACAAGGTGAAACAGAACCTGAGTGTGACCATCGCACCACCAGCCAACCTGTCCT
241 P H S F F C L E H Q I E Y I L Q D D G T
721 CCCACAGTTCTCTGCTGAGGACATGAGTGAATACATCTGCAAGATGATGGCAGC
261 S R F S L S H V I P Q G I D Q L R V R S
781 AGCCGATTCCTGTTCTCAGTGATACCGCAGGGCATCGATCAGCTAAGAGTCCGCTCC
281 R D S L L M S N W S Q W S H W K N V M T
841 AGAGATTCGCTGTGATGTCACCTGGAGCCAGTGGTCTCATTGAAAAATGTGATGACA
301 R R K K H S F Q E L P A N V L N C Y K K
901 AGGAGAAAGAAACACAGCTTTCCAGGAGTTACCCGCCAAGCTTGAATGCTACAAGAAG
321 K Q K E K R I *
961 AAACAGAAAGAAAAGAGGATCTGA

```

图 2 半滑舌鲷 *p40c* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *p40c* gene in *C. semilaevis*

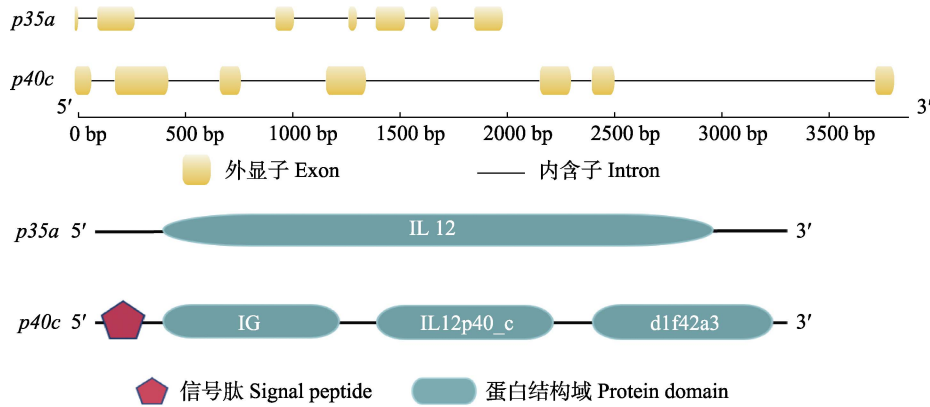


图3 半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 的基因结构示意图及蛋白质结构域预测
Fig.3 Gene structure and protein prediction of *p35a* and *p40c* in *C. semilaewis*

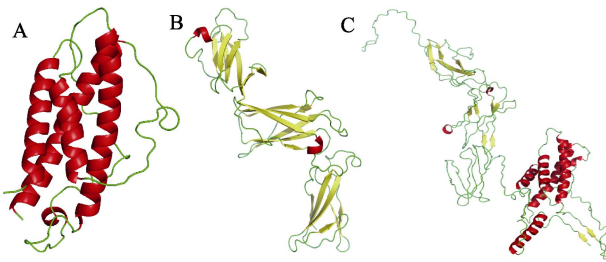


图4 P35a、P40c 和 IL-12 蛋白质的三维结构预测
Fig.4 Three dimensional structure prediction of P35a, P40c and IL-12 protein

A: P35a; B: P40c; C: IL-12

2.2 系统进化树和多序列比对分析

系统进化树结果显示, P35 与 P40 均聚为 4 支, 其中, P35 分为鱼的 P35a、P35b, 鸟类的 P35 和哺乳动物的 P35 (图 5A), P40 分别为鱼类的 P40a、P40b, P40c 以及鸟类和哺乳动物的 P40 (图 5B)。半滑舌鳎的 P35 和 P40 分别与鱼类的 P35a 和 P40c 聚为一支, 说明它们在进化关系上更为接近。

半滑舌鳎 P35a 和 P40c 蛋白序列与其他物种蛋白序列的比对分析结果见表 2 (所用物种氨基酸序列同系统进化树所用氨基酸序列一致)。P35a 蛋白与红鳍东方鲀的 P35a 蛋白相似性最高, 为 52.04%。P40c 蛋白与三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)的 P40c 蛋白的序列相似性最高, 为 48.67%。

2.3 组织表达模式

p35a 和 *p40c* 在半滑舌鳎不同组织的表达显示, *p35a* 基因在鳃、心、脑和卵巢等组织表达水平较高, 在其他组织中也有一定程度表达; *p40c* 基因在肝中表达水平最高, 在脾和鳃中有较高表达, 在心脏、精巢和胃中也有一定程度的表达, 而在肾和肌肉中几乎不表达(图 6)。

2.4 *p35a* 和 *p40c* 在哈维氏弧菌感染实验中的表达分析

哈维氏弧菌感染后, *p35a* 和 *p40c* 在脾、肝、肾和肠中均有显著性表达差异。在脾脏和肝脏中的表达模式相似。在脾中, *p40c* 在 6 h 显著升高, 之后表达逐渐降低; *p35a* 在 48 h 显著升高, 之后表达逐渐降低。在肝中, *p40c* 同样在 6 h 显著升高; 但 *p35a* 在 72 h 才显著升高。在肾和肠中, *p35a* 和 *p40c* 则呈现出与之不同的表达模式。在肠中, *p40c* 率先在 6 h 上调, 之后持续上调到 48 h 表达最高, 维持高表达达到 72 h, 之后在 96 h 与 *p35a* 一起下调。 *p35a* 在 6 h 升高, 中间表达量降低, 于 48 h 表达最高, 之后表达量逐渐下降; *p40c* 在 48 h 显著升高, 之后逐渐降低(图 7)。

2.5 *IL-12* 相关基因(*ifn-γ*、*il-10*) 在哈维氏弧菌感染实验中的表达分析

哈维氏弧菌注射后, *ifn-γ* 在脾脏和肠道中的表达模式相似, *ifn-γ* 表达在 6 h 开始升高, 在 16 h 达到最高, 之后表达逐渐下降。 *il-10* 在脾中, 16 h 表达开始上调, 在 *ifn-γ* 开始下降后的第 48 小时达到最高, 之后表达逐渐下降; 在肠中差异情况较小。 *ifn-γ* 和 *il-10* 在肾脏和肝脏中的表达模式相似, *ifn-γ* 和 *il-10* 均在 6 h 显著上调, 之后在脾中表达逐渐降低; *il-10* 会在肝中的 16 h 维持一定的高表达, 直到 48 h 才和 *ifn-γ* 一起逐渐下降(图 8)。

2.6 半滑舌鳎相关基因在淋巴细胞中过表达 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 后的表达模式

转染空载体的对照组 *p35a* 和 *p40c* 基因表达量较低, 且在不同浓度的 LPS 刺激后, 表达量没有显著差异。转染 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 载体的实验组, *p35a* 和 *p40c* 基因表达量显著高于对照组(图 9)。

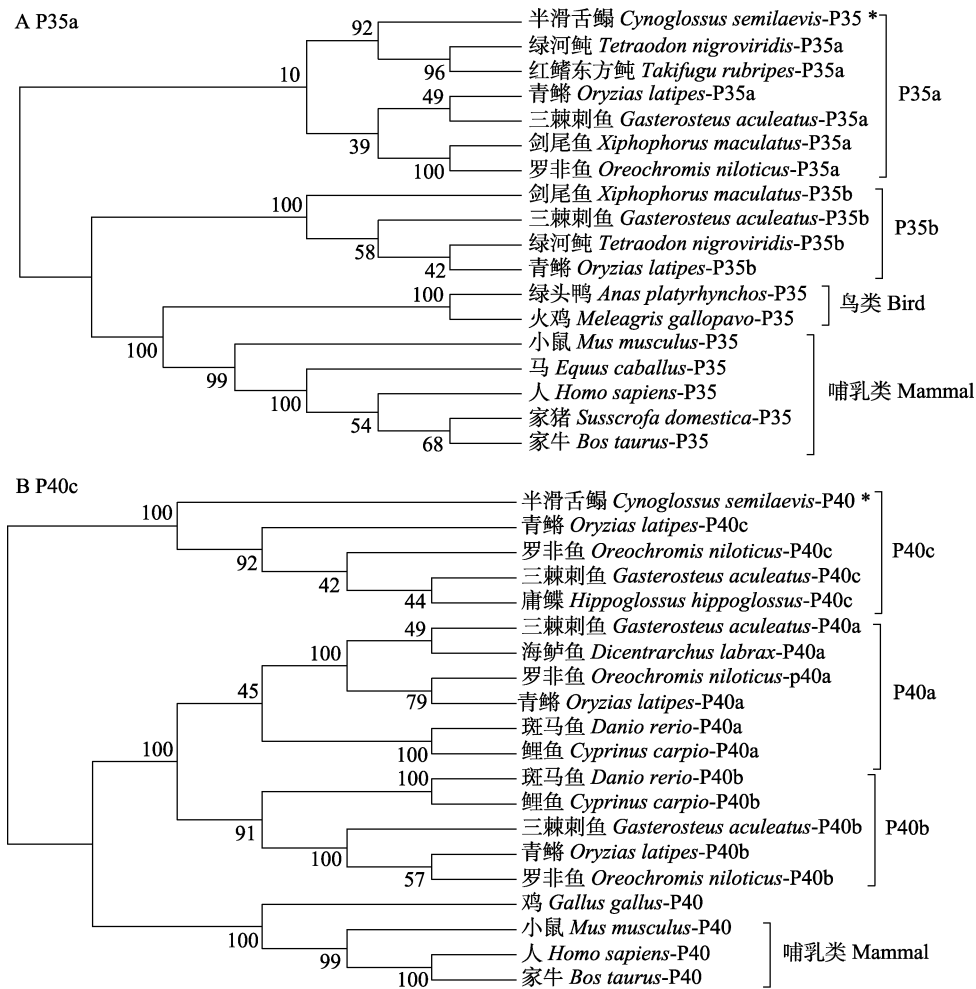


图 5 P35a (A)和 P40c (B)系统发育树

Fig.5 Phylogenetic analysis of P35a (A) and P40c (B) proteins

氨基酸序列号:

P35a: 绿河鲀(H3C7F9); 红鳍东方鲀(H2SI85); 青鲈(XP_004075675.1); 三棘刺鱼(G3P753); 剑尾鱼(XP_023207637.1); 罗非鱼(I3J6P0)

P35b: 绿河鲀(Q6UAL9); 青鲈(XP_004079386.2); 三棘刺鱼(G3PKZ2); 剑尾鱼(XP_023190996.1)。

P35: 鸭(U3IER1); 火鸡(G1NDR2); 小鼠(P43431); 马(Q9XSQ6); 人(P29459); 猪(Q29053); 牛(P54349)。

P40c: 青鲈(H2L9T4); 罗非鱼(I3KA75); 三棘刺鱼(G3NJZ0); 庸鲽(D0QTF8)。

P40b: 斑马鱼(A8WH95); 鲤鱼(Q2PCT1); 三棘刺鱼(G3QAY2); 青鲈(H2LA74); 罗非鱼(I3JPN9)。

P40a: 斑马鱼(Q6F3Q9); 鲤鱼(Q2PD23); 青鲈(H2LTF6); 罗非鱼(I3KMB3); 海鲈鱼(Q1KX13); 三棘刺鱼(G3Q3E4)。

P40: 鸡(Q6X0K9); 鼠(P43432); 人(P29460); 牛(P46282)

Amino acid sequence number:

P35a: *Tetraodon nigroviridis* (H3C7F9); *Takifugu rubripes* (H2SI85); *Oryzias latipes* (XP_004075675.1); *Gasterosteus aculeatus* (G3P753); *Xiphophorus maculatus* (XP_023207637.1); *Oreochromis niloticus* (I3J6P0).

P35b: *Tetraodon nigroviridis* (Q6UAL9); *Oryzias latipes* (XP_004079386.2); *Gasterosteus aculeatus* (G3PKZ2); *Xiphophorus maculatus* (XP_023190996.1).

P35: *Anas platyrhynchos* (U3IER1); *Meleagris gallopavo* (G1NDR2); *Mus musculus* (P43431); *Equus caballus* (Q9XSQ6); *Homo sapiens* (P29459); *Suscrofa domestica* (Q29053); *Bos taurus* (P54349).

P40c: *Oryzias latipes* (H2L9T4); *Oreochromis niloticus* (I3KA75); *Gasterosteus aculeatus* (G3NJZ0); *Hippoglossus hippoglossus* (D0QTF8).

P40b: *Danio rerio* (A8WH95); *Cyprinus carpio* (Q2PCT1); *Gasterosteus aculeatus* (G3QAY2); *Oryzias latipes* (H2LA74); *Oreochromis niloticus* (I3JPN9).

P40a: *Danio rerio* (Q6F3Q9); *Cyprinus carpio* (Q2PD23); *Oryzias latipes* (H2LTF6); *Oreochromis niloticus* (I3KMB3); *Dicentrarchus labrax* (Q1KX13); *Gasterosteus aculeatus* (G3Q3E4).

P40: *Gallus gallus* (Q6X0K9); *Mus musculus* (P43432); *Homo sapiens* (P29460); *Bos taurus* (P46282)

表2 半滑舌鲷 P35a 和 P40c 蛋白序列与其他物种蛋白序列的相似性

Tab.2 Similarity of P35a and P40C protein sequences between *C. semilaevis* and other species

基因 Gene	物种 Species	蛋白质序列的相似性 Alignment of protein sequence similarity/%
<i>p35a</i>	红鳍东方鲷 <i>T. rubripes</i>	52.04
	绿河鲷 <i>T. nigroviridis</i>	48.11
	青鲈 <i>O. latipes</i>	43.41
	三棘刺鱼 <i>G. aculeatus</i>	42.51
	剑尾鱼 <i>X. maculatus</i>	45.68
	罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	48.81
<i>p40c</i>	青鲈 <i>O. latipes</i>	41.90
	罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	48.66
	三棘刺鱼 <i>G. aculeatus</i>	48.67
	庸鲈 <i>H. hippoglossus</i>	46.84

对照组 *tnf-α* 表达量在不同浓度的 LPS 刺激下,随着 LPS 浓度的增加,表达量呈上升趋势。实验组在转染 *p35a* 和 *p40c* 的过表达载体后,*tnf-α* 的表达量上升幅度显著高于对照组。*tnf-β*、*ifn-γ* 和 *il-10* 基因的表达量在对照组和实验组中均没有显著变化(图 10)。

3 讨论

本研究获得了半滑舌鲷 *p35* 亚基和 *p40* 亚基基因的编码序列,进化树分析表明它们分别属于鱼类 *p35a* 和 *p40c* 亚型。结构域预测显示, *p35a* 和 *p40c* 基因都

含有典型的 IL-12 家族结构域,且都不含跨膜结构域。*p40c* 还含有 *p40* 亚基都具有的免疫球蛋白结构域(IG)和 I 类细胞因子受体结构域(d1f42a3)。前期研究报道,与 *p40c* 具有相似结构域的造血细胞因子受体家族成员 IL-6 受体(*IL-6Ra*),可以通过蛋白质水解或选择性剪接的方式以可溶性形式(缺乏跨膜结构域)从细胞中释放,然后可溶性 IL-6R 和 IL-6 在溶液中结合成复合物,介导下游信号通路的调控(Collison *et al*, 2012; Vignali *et al*, 2012)。因此,可以把 IL-12 理解成 *p35* 细胞因子与 *p40* 可溶性细胞因子受体共价结合形成的复合物。组织表达结果显示, *p35a* 主要在鳃、脑、心和卵巢中具有较高表达, *p40c* 主要在肝、鳃、心脏和精巢中具有较高表达。 *p35a* 和 *p40c* 均在鳃中高表达,可能是因为鳃是病原体首先侵入鱼体的器官。

本研究分析了半滑舌鲷 *p35a* 和 *p40c* 在哈维氏弧菌感染后的时空表达特征。免疫器官中的 *p35a* 和 *p40c* 及相关基因(*ifn-γ* 和 *il-10*)存在时空表达差异性。在脾和肝中, *p35a* 和 *p40c* 不在同一时间高表达,但 *p35* 亚基也不会以单体形式存在于细胞中(D'Andrea *et al*, 1992)。目前,已在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼中发现了 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基的多个亚型(Pandit *et al*, 2015; Wang *et al*, 2014b),表明半滑舌鲷中可能还具有 *p40* 亚基的其他亚型。*p40* 亚基的同源二聚体可以通过结合 IL-12 受体来抑制 IL-12 的产生(Heinzel *et al*, 1997),但结合 *ifn-γ* 在脾和肝中的表达模式, *p40c* 亚基更可能是与 *p35* 亚基的其他亚型形成 IL-12 在免疫器官中发挥调控作用。因此,推测在半滑舌鲷中存在

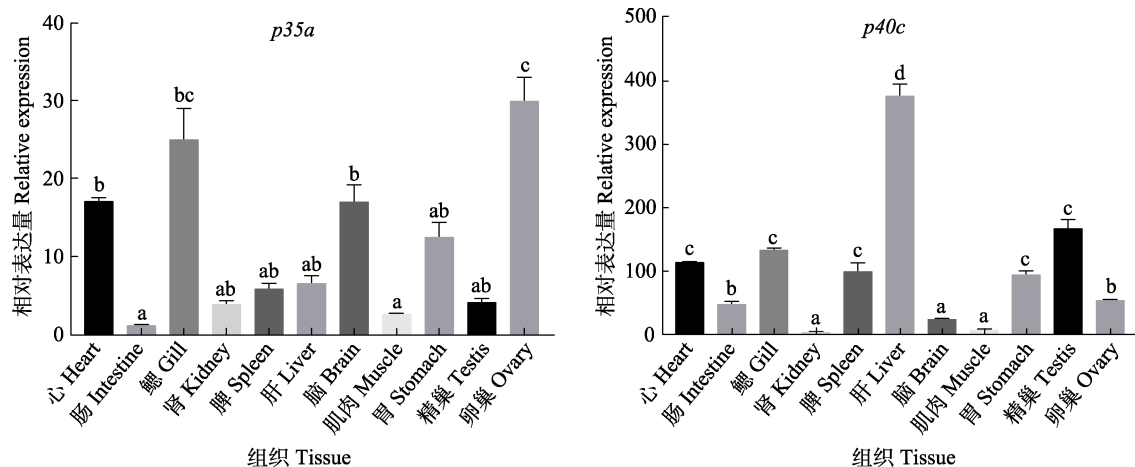


图6 *p35a*(A)和 *p40c*(B)基因在半滑舌鲷中的组织表达模式

Fig.6 Tissue expression analysis of *p35a* and *p40c* in *C. semilaevis*

数据用 3 个独立个体的平均值±标准误表示($n=3$)。不同字母间表示差异显著($P<0.05$)

Data were the Mean±SE of three independent individuals ($n=3$). Different letters represent significant difference ($P<0.05$)

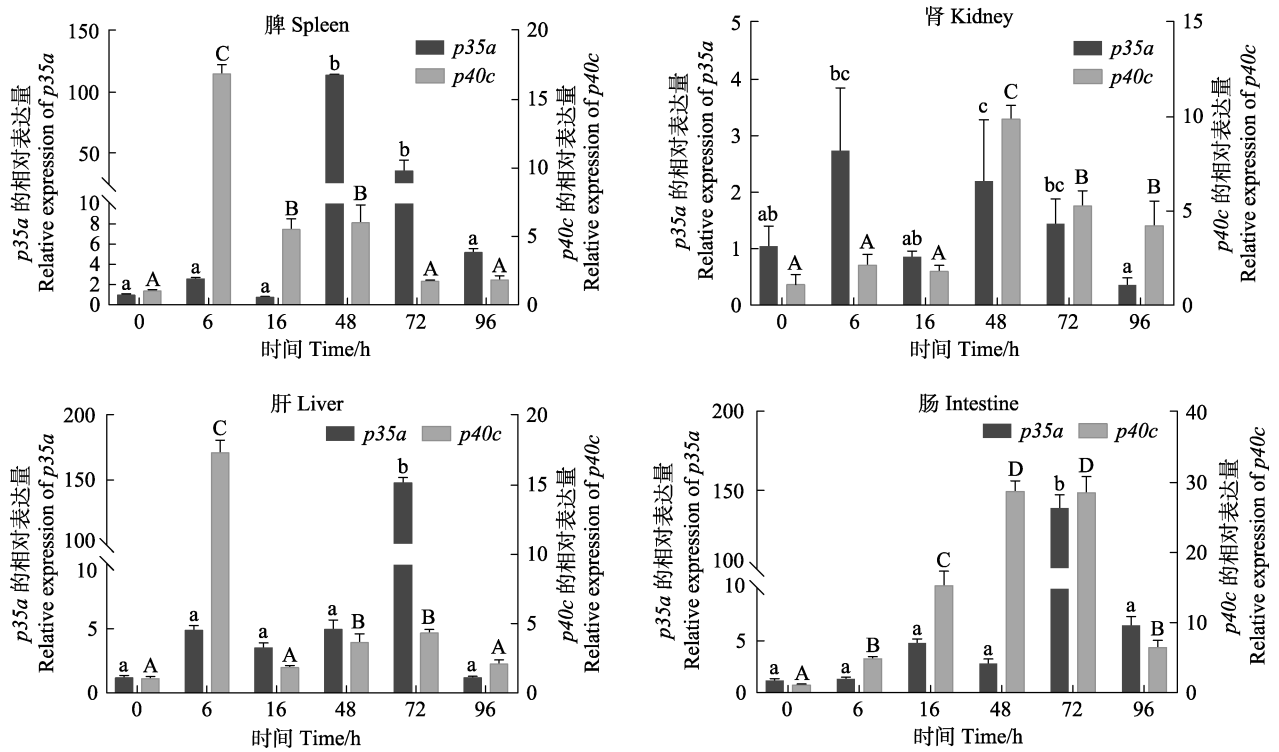


图 7 *p35a* 和 *p40c* mRNA 在哈维氏弧菌感染后的半滑舌鳎免疫组织中的表达模式

Fig.7 Expression patterns of *p35a* and *p40c* mRNA in *C. semilaevis* immune tissues after *V. harveyi* infection

字母的大小写标注仅用来区分不同基因间的显著性, 不同字母间表示差异显著($P < 0.05$)。下同
The case labeling of letters is only used to distinguish the significance between different genes, and the difference with different letters was significant ($P < 0.05$). The same as below

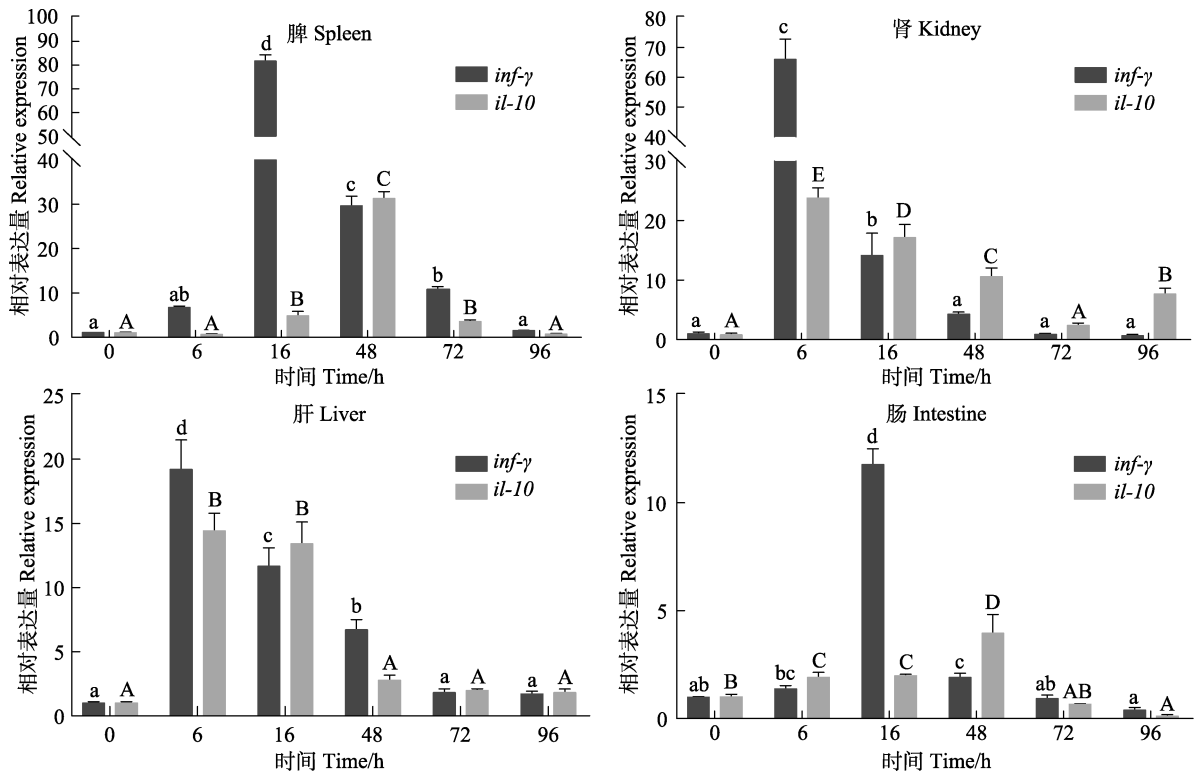


图 8 *inf-γ* 和 *il-10* 在哈维氏弧菌感染后的半滑舌鳎免疫组织中的表达模式

Fig.8 Expression patterns of *inf-γ* and *il-10* mRNA in *C. semilaevis* immune tissues after *V. harveyi* infection

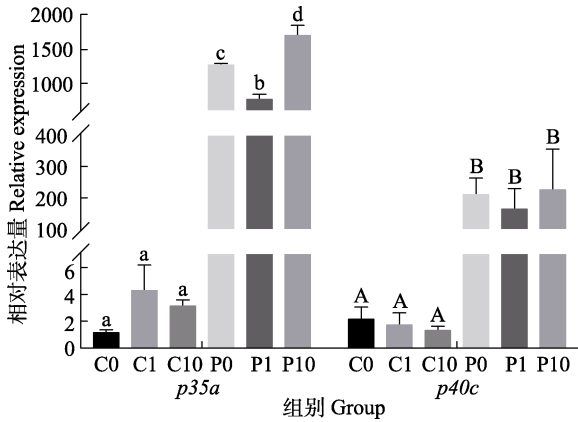


图9 细胞过表达实验中 *p35a* 和 *p40c* 基因的表达模式
Fig.9 Expression patterns of *p35a* and *p40c* genes in cell overexpression assay

对照组(C): 转染空载体; 实验组(P): *p35a* 和 *p40c* 共转, 均用 0、1、10 ng/L 的 LPS 进行刺激。

组别命名为 C0、C1、C10、P0、P1 和 P10。下同

Control group (C): Transfected with empty vector;
Experimental group (P): Co-transfected with *p35a* and *p40c*.
Stimulated with 0, 1, 10 ng/L LPS. The groups were named as C0, C1, C10, P0, P1, and P10. The same as below

多个 *p35* 亚基和 *p40* 亚基的亚型。在肠中, *p35a* 和 *p40c* 的表达趋势一致, 表明半滑舌鲷 IL-12 的 *p35a/p40c* 亚型在应对哈维氏弧菌感染时可能在肠中发挥相应作用。而在肾中, 由于表达量变化不明显以及其组织表达量低, 还需要进一步探究 *p35a* 和 *p40c* 在肾脏中是否响应哈维氏弧菌感染。上述结果表明, IL-12 的不同亚型可能在不同的免疫器官中发挥不同的免疫功能。

在哈维氏弧菌感染实验中, 还检测了 *ifn-γ* 和 *il-10* 在半滑舌鲷不同免疫组织中的表达模式。在脾中, 呈现出典型的 IL-12 调控模式(Wang *et al.*, 2014a), *p40c*

在 6 h 升高后, 与其他亚型的 *p35* 亚基产生 IL-12, 从而诱导 *ifn-γ* 在 16 h 显著升高; *il-10* 在 48 h 急剧升高, 抑制 IL-12 的产生, 从而使 *p35a* 和 *p40c* 在 48 h 之后的表达逐渐降低。在肠中, *ifn-γ* 在 IL-12 表达升高前高表达, 之后下降, 并没有因 *p35a* 表达量升高而维持在一个较高水平, 这暗示 *ifn-γ* 在肠中可能主要发挥激活 IL-12 细胞因子产生的功能(Zhang *et al.*, 2008)。而 *il-10* 作为 Th2 免疫应答的主要细胞因子, 其表达均在 IL-12 高表达后被抑制, 表达模式和发挥的功能较为单一, 这可能是由于 Th0 细胞向 Th1 细胞或 Th2 细胞的分化途径相对较为保守(Collison *et al.*, 2012)。作为与 IL-12 相关的细胞因子, *ifn-γ* 发挥功能呈现出时空多样性, 侧面佐证了 IL-12 可能在不同器官中对相关的免疫应答具有差异调控作用, 这表明 IL-12 的调控方式可能较为复杂。到目前为止, IL-12 受体在鱼类中还未确定, 哺乳动物的 IL-12 受体由亚基 1 和亚基 2 构成。由于鱼类基因组复制事件, 免疫基因(细胞因子和细胞因子受体)通常以 2 个拷贝的形式存在(Husain *et al.*, 2012)。IL-12 配体和受体亚单位的多样性组合, 进一步证明鱼类 IL-12 调控系统的复杂性。因此, IL-12 细胞因子在鱼类中通过多种同源基因的扩增, 共享配体和受体中的亚基, 可能组成了一个极其复杂的内部调节网络来微调它们的免疫反应。

在 LPS 刺激半滑舌鲷淋巴细胞实验中, *tnf-α* 的表达量响应了 LPS 刺激, *p35a* 和 *p40c* 表达量变化对 LPS 刺激响应不显著。可能因为 *p35a/p40c* 亚型不是体外培养的淋巴细胞中主要响应 LPS 的免疫蛋白。在之前的研究中, 虹鳟不同亚型的 IL-12 分别针对不同的刺激源(病毒、细菌和寄生虫)展现出不同的表达模式。其中, *p35/p40c* 亚型针对病毒和寄生虫感染,

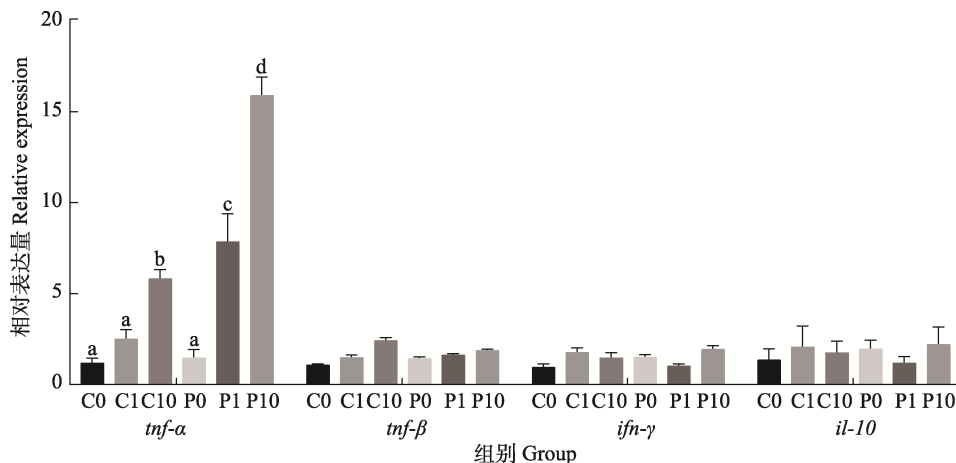


图10 LPS 刺激半滑舌鲷过表达 *p35a* 和 *p40c* 淋巴细胞的相关基因表达模式
Fig.10 Gene expression patterns of over-expressed *p35a* and *p40c* lymphocytes stimulated by LPS in *C. semilaewis*

表达明显上调, 而针对细菌感染, 表达上调不显著 (Wang *et al.*, 2014b)。在过表达 *p35a* 和 *p40c* 后, 实验组 *tnf- α* 的表达量响应 LPS 刺激的上升幅度明显高于对照组, 表明 IL-12 的 *p35a/p40c* 亚型能够通过诱导 *tnf- α* 基因的表达, 参与半滑舌鳎淋巴细胞响应 LPS 刺激, 提升机体的免疫应答水平。

综上所述, IL-12 是半滑舌鳎响应哈维氏弧菌病, 参与免疫调控并提升免疫应答水平的重要细胞因子。因此, 可以使用重组的 IL-12 作为半滑舌鳎的哈维氏弧菌疫苗的佐剂之一, 但由于半滑舌鳎 IL-12 参与的免疫应答非常复杂, 需进一步研究半滑舌鳎 IL-12 的所有组成亚基, 探究不同组成的 IL-12 的结构特征和免疫调控模式, 从而提高半滑舌鳎的 IL-12 作为疫苗佐剂所增强的免疫效果。

参 考 文 献

- ARTS J, TIJHAAR E, CHADZINSKA M, *et al.* Functional analysis of carp interferon- γ : Evolutionary conservation of classical phagocyte activation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 793–802
- CHEN S, ZHANG G, SHAO C, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- COLLISON L W, DELGOFFE G M, GUY C S, *et al.* The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology*, 2012, 13(3): 290–299
- D'ANDREA A, RENGARAJU M, VALIANTE N M, *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(5): 1387–1398
- GEE K, GUZZO C, CHE MAT N F, *et al.* The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(1): 40–52
- GILLESSEN S, CARVAJAL D, LING P, *et al.* Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: A potent IL-12 antagonist. *European Journal of Immunology*, 1995, 25(1): 200–206
- HEINZEL F P, HUJER A M, AHMED F N, *et al.* In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *Journal of Immunology*, 1997, 158(9): 4381–4388
- HSIEH C S, MACATONIA S E, TRIPP C S, *et al.* Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*, 1993, 260(5107): 547–549
- HUISING M O, VAN SCHIJNDEL J E, KRUISWIJK C P, *et al.* The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10): 1519–1533
- HUSAIN M, BIRD S, VAN ZWIETEN R, *et al.* Cloning of the IL-1b3 gene and IL-1b4 pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1b gene in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(3): 431–446
- JONES L L, VIGNALI D A. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic Research*, 2011, 51(1): 5–14
- KOBAYASHI M, FITZ L, RYAN M, *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(3): 827–845
- LI K M, XU W T, FU X Q, *et al.* Gene cloning and immune response analysis of protein kinase C- α (PKC α) in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 69–77 [李坤明, 徐文腾, 扶晓琴, 等. 半滑舌鳎蛋白激酶 C- α (PKC α)的基因克隆和免疫应答分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 69–77]
- LIU Y, XU W, ZHANG B, *et al.* QTL Detection for albinism-related loci in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17: 1404–1410
- MANETTI R, PARRONCHI P, GIUDIZI M G, *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177(4): 1199–1204
- MATSUMOTO M, ARAKI K, HAYASHI K, *et al.* Adjuvant effect of recombinant interleukin-12 in the Nocardiosis formalin-killed vaccine of the amberjack *Seriola dumerili*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 67: 263–269
- NASCIMENTO D S, DO VALE A, TOMÁS A M, *et al.* Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Molecular Immunology*, 2007, 44(9): 2277–2291
- ØVERGÅRD A C, NEPSTAD I, NERLAND A H, *et al.* Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1b, IL-6, IL-11, IL-12b and IFN γ . *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 2201–2213
- PANDIT N P, SHEN Y B, XU X Y, *et al.* Differential expression of interleukin-12 p35 and p40 subunits in response to *Aeromonas hydrophila* and Aquareovirus infection in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1169–1183
- PROCHAZKOVA J, POKORNA K, HOLAN V. IL-12 inhibits the TGF- β -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- β -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*, 2012, 217(1): 74–82
- SCHOENHAUT D S, CHUA A, WOLITZKY A, *et al.* Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology*,

- 1992, 148(11): 3433–3440
- SONG W T. Breeding and research progress of *Cynoglossus semilaevis* in China. *Journal of Science, Technology and Economics*, 2016(20): 95 [宋文涛. 我国半滑舌鳎养殖及研究进展. *科技经济导刊*, 2016(20): 95]
- TSAI J L, JOSE PRIYA T A, HU K Y, *et al.* Grouper interleukin-12, linked by an ancient disulfide-bond architecture, exhibits cytokine and chemokine activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 27–37
- VIGNALI D A, KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nature Immunology*, 2012, 13(8): 722–728
- WANG S Y, WANG L, CHEN Z F, *et al.* Cloning and expression analysis of polyglobulin receptor (pIgR) gene in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 51–57]
- WANG T, HUSAIN M, HONG S, *et al.* Differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: Implication towards the evolution of Th1-like immune responses. *European Journal of Immunology*, 2014b, 44(5): 1541–1551
- WANG T, HUSAIN M. The expanding repertoire of the IL-12 cytokine family in teleost fish: Identification of three paralogues each of the p35 and p40 genes in salmonids, and comparative analysis of their expression and modulation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014a, 46(2): 194–207
- WATFORD W T, MORIGUCHI M, MORINOBU A, *et al.* The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2003, 14(5): 361–368
- WEI M, XU W T, GAN T, *et al.* Cloning, expression profile, and immune characterization of a novel stat family member (stat5bl) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 962–969
- WEI M, XU W T, LI H L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a novel r-spondin member (rspo2l) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018b, 72: 436–442
- WEI M, XU W T, LI K M, *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of dctn5 in immune response of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018a, 77: 392–401
- YOSHIURA Y, KIRYU I, FUJIWARA A, *et al.* Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 2003, 55(5): 296–306
- ZHANG S, WANG Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(4): 509–512

(编辑 冯小花)

Expression and Regulation Analysis of the *p35a* and *p40c* Subunits of Interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis* Infected by *Vibrio harveyi*

ZHANG Zhihua^{1,2}, FENG Bo^{1,2}, ZHU Tengfei², HAO Xiancai²,
WANG Qian², SHAO Changwei², WANG Hongyan²^①

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

Abstract Interleukin 12 (IL-12), a key molecular switch in the immune response, is a pleiotropic cytokine composed of the *p35a* and *p40c* subunits. It has been proven that IL-12 can be used as a vaccine adjuvant to enhance the immune response level of fish, and is used in the development of vaccines against pathogen infection. In this study, we cloned the coding regions of the *p35a* subunit and *p40c* subunit of IL-12 in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), with a length of 651 bp and 984 bp, respectively. The phylogenetic analysis showed that the *p35a* and *p40c* of *C. semilaevis* were clustered with the corresponding genes in other fishes. The sequence of amino acid homology analysis showed that *p35a* and *p40c* of *C. semilaevis* had the highest similarity with *Takifugu rubripes* (52.04%) and *Gasterosteus aculeatus* (48.67%), respectively. The tissue expression analysis showed that *p35a* was highly expressed in the gill, brain, heart, and ovary, and *p40c* was highly expressed in the liver, spleen, gill, and heart. We further analyzed the expression patterns of *p35a*, *p40c*, and their related genes (*ifn-γ* and *il-10*) after infection with *Vibrio harveyi*. The expression of *p35a* increased significantly at 48 h ($P < 0.05$), and then gradually decreased in the spleen, and its expression increased significantly at 72 h in the liver and intestine. The expression of *p40c* increased significantly at 6 h in spleen and liver, and at 48 h in kidney. Its expression also began to increase at 6 h and peaked at 48 h in the intestine. The expression of *ifn-γ* increased significantly before the upregulated expression of *p35a* in the liver and intestine, and later than *p35a* in the spleen. The expression of *il-10* was opposite to that of *p40c* in the liver, spleen, kidney, and intestine. The expression of the immune related cytokines (*tnf-α*, *tnf-β*, *ifn-γ*, and *il-10*) in the lymphocytes of *C. semilaevis* was detected after the overexpression of the *p35a* and *p40c* genes. The results showed that *p35a* and *p40c* could significantly increase the expression of *tnf-α* under lipopolysaccharide stimulation. The results indicate that the *p35a* and *p40c* subunits of IL-12 respond to stimulation by *V. harveyi* in *C. semilaevis*, and then participate in the immune response by inducing the expression of the *tnf-α* gene, which provides a theoretical basis for the development of IL-12 as an adjuvant for the *C. semilaevis* vaccine against *V. harveyi*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Immune response; Interleukin 12; *Vibrio harveyi*

① Corresponding author: WANG Hongyan, E-mail: wanghongyan@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210127001

http://www.yykxjz.cn/

朱优秀, 江炎亮, 张芹, 冯建新, 张瀚元, 吴碧银, 许建. 鲤 *trim25* 多拷贝基因进化和表达调控初探. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 24-32

ZHU Y X, JIANG Y L, ZHANG Q, FENG J X, ZHANG H Y, WU B Y, XU J. Gene evolution and expression regulation of multiple copies of *trim25* in common carp, *Cyprinus carpio*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 24-32

鲤 *trim25* 多拷贝基因进化和表达调控初探*

朱优秀^{1,2} 江炎亮² 张 芹³ 冯建新³
张瀚元² 吴碧银^{1,2} 许 建^{2①}

- (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. 河南省水产科学研究院 河南 郑州 450044)

摘要 天然免疫系统是硬骨鱼类抵抗病毒感染的主要防御系统, 三重基序(tripartite motif, TRIM)蛋白家族作为天然免疫系统的重要组成部分, 参与病毒感染的免疫网络调控, 其中, TRIM25 已被证实在多种鱼类的免疫反应中发挥重要作用。本研究对鲤(*Cyprinus carpio*) *trim25* 基因的 16 个拷贝进行了序列进化分析、共线性分析和功能域结构分析, 并比较了各拷贝在组织中的表达和顺式调控位点的差异。序列比对和系统进化分析结果均显示, 位于鲤 11 和 12 号染色体上、结构完整的 TRIM25 的 2 个拷贝与金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的 TRIM25 蛋白结构高度相似, 与鲤科鱼类以外的其他物种的结构差异较大。基因共线性结果显示, *trim25* 基因上下游基因在不同物种的进化过程中相对保守。鲤 TRIM25 蛋白的结构分析显示, 在鲤 TRIM25 的 16 个拷贝中, 有 6 个拷贝具有完整功能结构域, 其中, 各有 5 个拷贝在鲤的肝与脑组织中高表达。在构建的表达数量性状基因座(eQTL)调控网络中, 在肝和脑组织中分别筛选到 5 个和 17 个顺式调控 *trim25* 基因表达的单核苷酸多态性(SNP)位点。本研究对鲤 *trim25* 基因多个拷贝的序列差异进行了比较, 并对鲤与其他物种 TRIM25 的序列、进化关系和共线性相似度进行了比较, 揭示了鲤 *trim25* 各拷贝间的结构多样性和在组织中的表达情况, 筛选出了可能调控 *trim25* 基因表达的 SNP 位点, 为今后研究鲤 TRIM25 相关的调控和抗病研究提供了理论依据。

关键词 鲤; TRIM25; 蛋白结构; 系统进化树; eQTL

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0024-09

天然免疫系统是宿主抵抗病原体感染的第一道防线, 其对病原体的直接杀伤和清除作用是通过天然免疫分子和吞噬细胞实现的, 其中, 三重基序(tripartite motif, TRIM)家族蛋白作为具有抗病毒作用和天然免疫调节功能的代表性蛋白, 成为近年来天然

免疫领域的研究热点。TRIM 蛋白是一个结构相对保守的蛋白家族, 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物的细胞中, 其结构包括 1 个 RING 锌指结构域、1~2 个 B-box 结构域、卷曲螺旋结构域(Coiled-coil, CC)以及 C 端可变结构域, 因此, TRIM 蛋白又被称为 RBCC

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020B003; 2020TD24)和国家重点研发计划(2018YFD0900102)共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020B003; 2020TD24), and National Key Research and Development Program (2018YFD0900102)]. 朱优秀, E-mail: zhuyx0508@163.com

① 通讯作者: 许 建, 副研究员, E-mail: xuj@cafs.ac.cn

收稿日期: 2021-01-27, 收修改稿日期: 2021-03-01

蛋白(Micale *et al*, 2016)。TRIM 蛋白家族作为一类重要的 E3 泛素连接酶, 参与信号转导、细胞凋亡、蛋白质加工和运输以及机体对病毒的应答等重要的生命过程。在人类医学研究中发现, 它们的改变与多种疾病的发生密切相关, 如发育障碍、神经退行性疾病、病毒感染和肿瘤(Tocchini *et al*, 2015)。

在硬骨鱼类中, TRIM 蛋白在天然免疫系统中同样发挥重要的作用。目前, 已在斑马鱼(*Danio rerio*)基因组中鉴定出 208 个 *trim* 基因, 在河豚(*Tetraodontidae*)基因组中发现了 66 个 *trim* 基因(Boudinot *et al*, 2011), 而人类基因组中包含了 75 个 *trim* 基因(Versteeg *et al*, 2013)。与人类相比硬骨鱼类的 *trim* 基因家族进化速度更快, 具有更高的多样性。在 *trim* 基因家族中, *trim25* 是非常重要的成员之一。近几年, 在鱼类的天然免疫系统研究中发现, TRIM25 蛋白在多个重要养殖鱼类, 如罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、鲤、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、石斑鱼(*Epinephelinae*)等的抗病毒过程中发挥了重要作用(Manokaran *et al*, 2015)。周真真等(2019)通过实时荧光定量 PCR 发现, TRIM25 在大黄鱼的心脏、脑、外周血、脾脏、皮肤、肌肉、头肾、肠和肝脏组织中均有表达, 其中, 在肝脏的表达水平最高; 当对大黄鱼注射 Poly (I:C)后, 在外周血、头肾、肝脏和脾脏中均检测到 *trim25* 基因表达量显著上调, 且均表现为先上升后下降的趋势, 提示 *trim25* 基因在大黄鱼抗病毒免疫反应中起着重要作用。Jin 等(2019)研究发现, 斑马鱼 TRIM25 通过靶向调控 RIG-I 蛋白的 2CARD 和 RD 结构域的 K63 泛素化, 促进斑马鱼对红点石斑鱼(*Epinephelus guttatus*)神经坏死病毒感染的先天免疫应答。Yang 等(2016)研究发现, 在石斑鱼脾脏细胞中过表达 TRIM25 可抑制病毒复制, 提高干扰素信号通路相关基因的表达水平。这些研究表明, TRIM25 在硬骨鱼对病毒感染的先天免疫应答中发挥了关键作用。在 Ross 团队开展的鲤抗疱疹病毒 QTL 研究中, 定位了 44 号染色体上的关联 SNP, 而 *trim25* 基因位于该 SNP 下游 6.5 kb, 提示 TRIM25 在鲤抗病毒免疫应答中的作用(Palaiokostas *et al*, 2018)。鲤是研究基因组进化和开展性状解析的重要模式物种, 由于鲤经历了第 4 轮全基因组复制, 多倍化的基因组具有较高的环境适应性, 基因组中多套拷贝的基因为性状的调控提供了丰富的变异来源和增加了调控的灵活性。以 *trim25* 为例, 鲤基因组中 *trim25* 的拷贝数高达 16 个。如何精确定位在抗病和免疫应答过程中具体发挥调控作用的基因拷贝, 阐述基因调控的遗传位点和作用机制, 需要进一步的精细分析。考虑到 SNP 对基因

表达的调控作用, 将 SNP 信息与基因表达结果整合分析成为性状解析的重要手段。表达数量性状基因座(expression quantitative trait loci, eQTL)分析将每个基因的表达量作为数量性状, 研究遗传突变与基因表达之间的相关性, 来寻找调控基因表达的位点及协同作用的基因, 以此来构建基因的调控网络(彭启迪, 2020)。eQTL 分析方法广泛应用于人类医学研究和动植物的性状解析, 通过分析目的基因相关的基因组区域的表达水平(Guo *et al*, 2020; Kordas *et al*, 2019; Lowe *et al*, 2015; Nicolae *et al*, 2010; Walker *et al*, 2020), 阐明由基因变异引起表型改变的分子机制。然而, 在鱼类的性状解析中, eQTL 仍处于起步阶段, 仅在大西洋鲑(*Salmo salar*)(Aslam *et al*, 2020)、极地鱼(Jacobs *et al*, 2020)等几个物种中有少量报道。

本研究对鲤 *trim25* 基因的多个拷贝与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、原鸡(*Gallus gallus*)以及多种鱼类进行进化分析, 分析鲤 *trim25* 与几个主要模式物种的共线性。同时, 为比较鲤 *trim25* 基因各拷贝之间的差异, 对鲤 *trim25* 的 16 个拷贝进行结构分析及在多个组织中的表达研究。通过 *trim25* 的 eQTL 网络分析, 提取可能调控 *trim25* 基因表达的 SNP 位点, 旨在为今后研究鲤 *trim25* 基因的相关调控和抗病研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 TRIM25 蛋白序列的提取和比对

鲤 TRIM25 蛋白 16 个拷贝的氨基酸序列取自本课题组鲤全基因组序列和注释文件(Xu *et al*, 2019), 人、小鼠、原鸡、爪蟾、象鼻鲨(*Callorhynchus milii*)、腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripe*)、大黄鱼、石斑鱼、斑马鱼、金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)的 TRIM25 蛋白序列通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 数据库查询获得。利用 NCBI 数据库中的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 对 12 个物种的 TRIM25 氨基酸序列进行比对, 计算各物种与鲤 TRIM25 蛋白的一致性。

1.2 进化树的绘制、共线性分析和蛋白结构域预测

利用 ClustalW 对鲤、人、小鼠、鸡、爪蟾、象鼻鲨、腔棘鱼、红鳍东方鲀、斑马鱼、大黄鱼、金线鲃、石斑鱼的 TRIM25 氨基酸序列进行比对, 利用 RAxML 软件(V 7.2.8)构建进化树, 将 Bootstrap 设为 1000, 其他参数设为默认值。各物种 *trim25* 基因的共

线性数据,通过 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询各物种 *trim25* 上下游基因获得。以鲤 TRIM25 的 16 个拷贝的蛋白序列为输入文件,用在线软件 SMART(<http://smart.emblheidelberg.de/>)(高进等,2016),预测鲤 TRIM25 的 16 个拷贝的蛋白结构域构成。

1.3 *trim25* 在组织中的表达和 eQTL 调控网络分析

采集 40 尾黄河鲤和 40 尾镜鲤的肝脏及脑组织,使用 RNeasy 试剂盒(Qiagen, 上海)提取 RNA,并委托测序公司利用 HiSeq2000 测序平台进行 150PE 的转录组测序。使用 Bowtie2 v2.3.4.2 和 Cufflinks 2.2.1 软件对转录组数据进行基因表达(FPKM 值)的计算,并提取每个样本中 *trim25* 的基因表达数据,采用 R 软件包 ggplot2 绘制箱式图来展示 *trim25* 的基因表达情况。从已有的鲤 SNP 变异数据集中提取对应样本的 SNP 分型数据和位置信息,结合基因表达数据和基因位置信息,利用 MatrixEqt1 软件进行顺式 eQTL 的分析,筛选标准为 $P < 10^{-5}$ 。

2 结果

2.1 鲤 TRIM25 蛋白的结构分析

蛋白结构预测显示,完整的鲤 TRIM25 蛋白包括 4 个结构域:RING、B-box、Coiled-coil 和 PRY/SPRY 结构域。其中, HHLG38G0859、HHLG11g0652、

HHLG12g0509、HHLG29g0701、HHLG3g0722 和 HHLG4g0919 这 6 个拷贝有完整的 4 个结构域;HHLG10g1061 缺少 PRY/SPRY 结构域,HHLG37g0859 缺少 Coiled-coil 结构域,HHLG13g0878、HHLG14g0181、HHLG6g0789 和 HHLG9g1073 只包含 RING 和 B-box 结构域。HHLG16g0672 只包含 RING 和 Coiled-coil 结构域,HHLG13g0902 只包含 B-box 和 Coiled-coil 结构域,HHLG46g0068 和 HHLG5g0226 只包含 RING 结构域。

2.2 *trim25* 共线性分析

为了更好地理解 *trim25* 基因在进化上的保守性,对鲤、人、小鼠、鸡、斑马鱼 5 个物种的 *trim25* 基因及其上下游基因进行了共线性分析(图 2)。由于鲤的染色体与斑马鱼存在 1:2 的映射关系,优先选择对应斑马鱼 *trim25* 基因所在染色体的鲤 11 12 号染色体上的 HHLG11g0652 和 HHLG12g05092 这 2 个拷贝来分析。从共线性图上可以看出,*trim25* 基因在进化上高度保守。*gdke* 是与 *trim25* 基因关联性最强的基因,存在于人、小鼠、鸡、斑马鱼及鲤 5 个物种。*coil* 是与人、小鼠、鸡 *trim25* 基因关联性较强的另一个基因;而 *dgke*、*rab11fp4b* 和 *utp6* 这 3 个基因均存在于斑马鱼与鲤 *trim25* 基因上下游。其中,位于鲤 12 号染色体上的 *trim25* 基因上下游的基因分布与斑马鱼完全一致;位于鲤 11 和 12 号染色体上的 *trim25* 基因的上

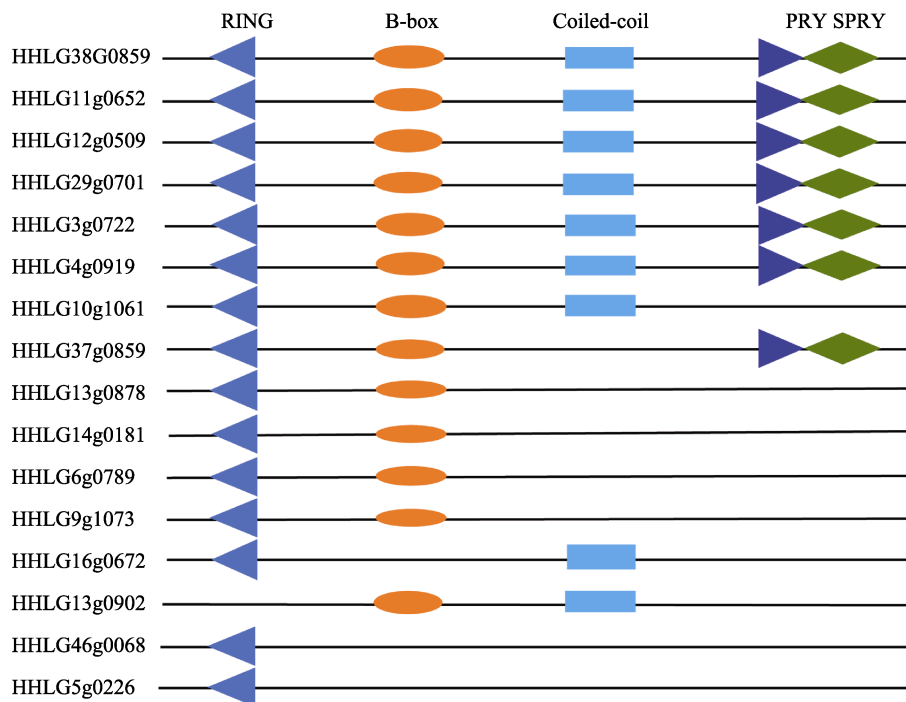


图 1 鲤 TRIM25 蛋白结构域

Fig.1 Protein domain prediction of TRIM25 in *Cyprinus carpio*

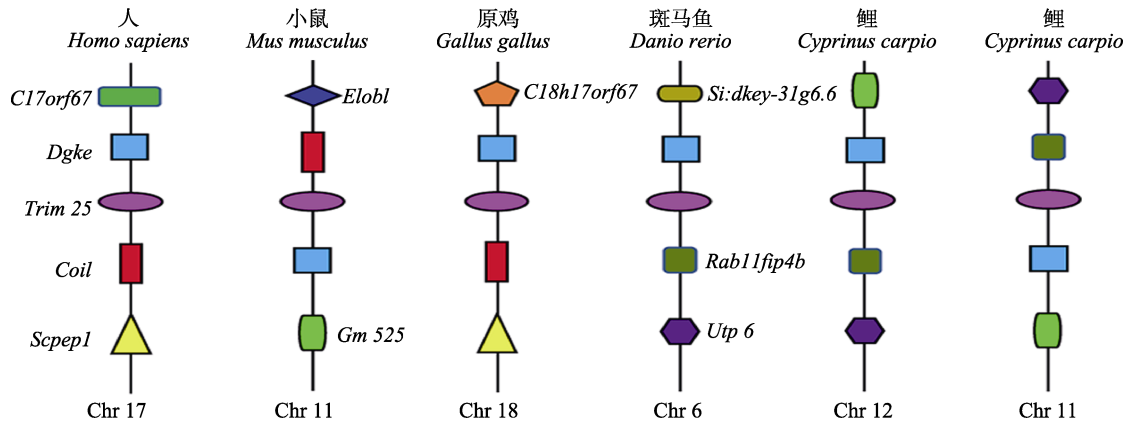


图 2 基因共线性分析

Fig.2 Synteny of genes neighboring *trim25*

下游基因构成一致，只是上下游位置完全颠倒，这可能是鲤 11 号染色体的该区域在进化过程中发生了倒位。

2.3 TRIM25 蛋白序列比对

从 NCBI 数据库中收集代表性物种(哺乳动物、两栖动物、鸟类、软骨鱼类和硬骨鱼类)的 TRIM25 蛋白氨基酸序列。由于鲤的染色体与斑马鱼存在 1:2 的映射关系，优先选择对应斑马鱼 TRIM25 所在染色体的鲤的 2 个拷贝中结构完整、氨基酸序列最长的 HHLG12g0509 蛋白与其他 11 个物种 TRIM25 蛋白进行序列比对(图 3)。鲤 16 个 TRIM25 拷贝的位置信息见表 1。12 个物种中，TRIM25 蛋白长度从 528 个氨基酸(爪蟾)到 734 个氨基酸(石斑鱼)，与鲤 TRIM25 蛋白一致性最高的是金线鲃，一致性最低的是爪蟾。

从序列比对的结果可以看出，哺乳动物中，人与小鼠 TRIM25 蛋白在 RING、B-box、Coiled-coil 和 PRY/SPRY 这 4 个结构域均高度相似，二者的主要差异在第 420~470 氨基酸之间。哺乳动物与鸡 TRIM25

蛋白在 Coiled-coil 和 PRY/SPRY 结构域高度相似，差异存在于 RING 和 B-box 结构域。腔棘鱼与象鼻鲨在 B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似，爪蟾 TRIM25 蛋白与其他物种相似性最低。海水鱼类中，大黄鱼与石斑鱼在 RING 结构域高度相近，红鳍东方鲀与前二者在 RING 结构域存在差异；三者的 B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似，但三者的 PRY/SPRY 结构域存在较大差异。鲤科鱼类中，斑马鱼、金线鲃和鲤在 RING、B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似；鲤与金线鲃的 PRY/SPRY 结构域高度相似，但斑马鱼的 PRY/SPRY 结构域与前二者存在差异。

2.4 TRIM25 系统进化分析

为了解析 TRIM25 在物种进化过程中的差异，构建了系统进化树(图 4)。可以看出，人与小鼠的 TRIM25 最为相近，其次是鸡。腔棘鱼作为一种原始的硬骨鱼类，其 TRIM25 也与上面 3 个物种相近。海水鱼类(大黄鱼、石斑鱼、红鳍东方鲀)单独聚为一支；鲤科鱼类中，位于鲤 11 和 12 号染色体上结构完整的

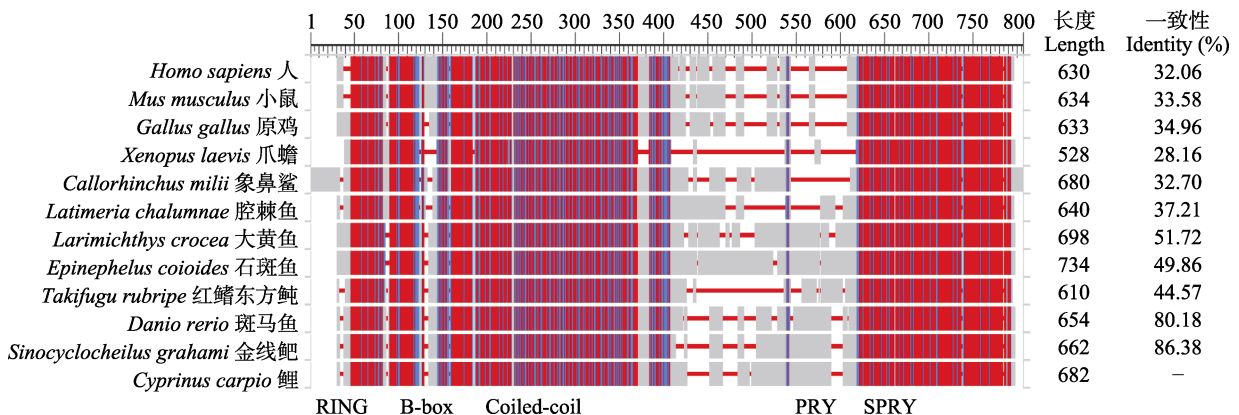


图 3 鲤 TRIM25 蛋白与其他物种的序列比对

Fig.3 Alignment of TRIM25 among *C. carpio* and other species

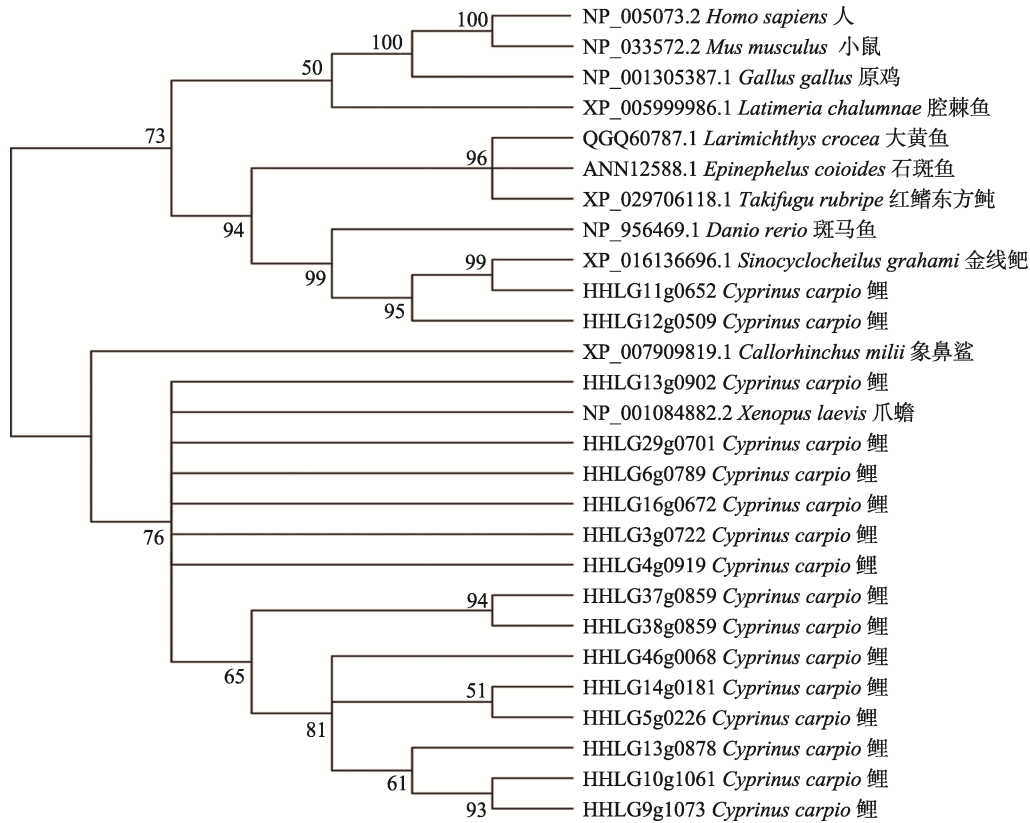


图 4 TRIM25 蛋白的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of TRIM25 proteins

表 1 鲤 *trim25* 基因位置信息Tab.1 Location information of *trim25* gene in *C. carpio*

基因序列 ID Gene ID	染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End
HHLG10g1061	LG10	28 463 278	28 464 093
HHLG11g0652	LG11	19 734 938	19 745 074
HHLG12g0509	LG12	12 763 606	12 773 301
HHLG13g0878	LG13	29 994 196	30 002 309
HHLG13g0902	LG13	30 318 614	30 323 840
HHLG14g0181	LG14	5 309 992	5 315 952
HHLG16g0672	LG16	16 800 988	16 805 042
HHLG29g0701	LG29	21 206 550	21 212 314
HHLG37g0859	LG37	24 227 230	24 240 878
HHLG38g0859	LG38	24 205 967	24 218 593
HHLG3g0722	LG3	20 144 774	20 154 144
HHLG46g0068	LG46	1 324 110	1 324 622
HHLG4g0919	LG4	24 390 833	24 398 746
HHLG5g0226	LG5	6 475 495	6 476 125
HHLG6g0789	LG6	19 687 942	19 688 835
HHLG9g1073	LG9	30 777 527	30 780 651

HHLG11g0652、HHLG12g0509 拷贝与金线鲃和斑马鱼聚为一支；鲤其余的 TRIM25 拷贝与象鼻鲨和爪蟾更为相近。鲤异源四倍化过程中产生了大量的多拷贝基

因，基因的多个拷贝随着进化的压力出现了序列和结构的变化，最终导致亚功能化和去功能化。这些发生较大变异的基因拷贝，可能和其他物种聚到一起。

2.5 *trim25* 在黄河鲤及镜鲤肝脏和脑组织中的表达

在黄河鲤和镜鲤的肝脏中，表达量较高的 5 个拷贝是一致的，包括 HHLG10g1061、HHLG11g0652、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG16g0672。其他的 11 个拷贝在黄河鲤和镜鲤的肝脏组织中表达量极低或者几乎不表达。在黄河鲤和镜鲤的脑组织中，表达较高的 5 个拷贝相同，分别是 HHLG10g1061、HHLG11g0652、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG3g0722，脑组织和肝脏组织的 TRIM25 表达情况非常相似(图 5 和图 6)。

2.6 鲤 *trim25* 的调控网络分析

从课题组已构建的 eQTL 调控网络中提取出肝脏和脑组织中与 *trim25* 基因表达相关的顺式 SNP 位点。肝脏中筛选到的阳性 SNP 位点有 5 个，位于鲤第 4、6、12、13 和 37 号染色体上，分别调控 HHLG4g0919、HHLG6g0789、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG37g0859 这 5 个基因。脑组织中筛选到 17 个阳性位点，位于鲤第 6、11 和 13 号染色体上，其中，

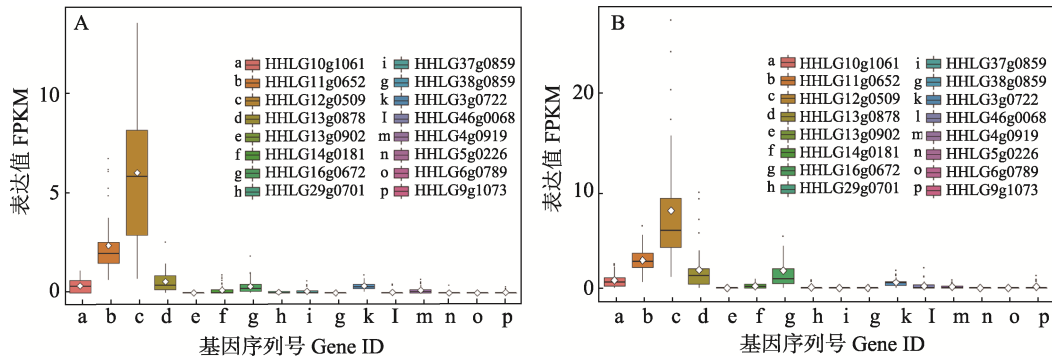


图 5 *trim25* 基因在黄河鲤(A)和镜鲤(B)肝脏组织中的表达

Fig.5 Expression of *trim25* genes of Yellow River carp (A) and Mirror carp (B) in liver tissue

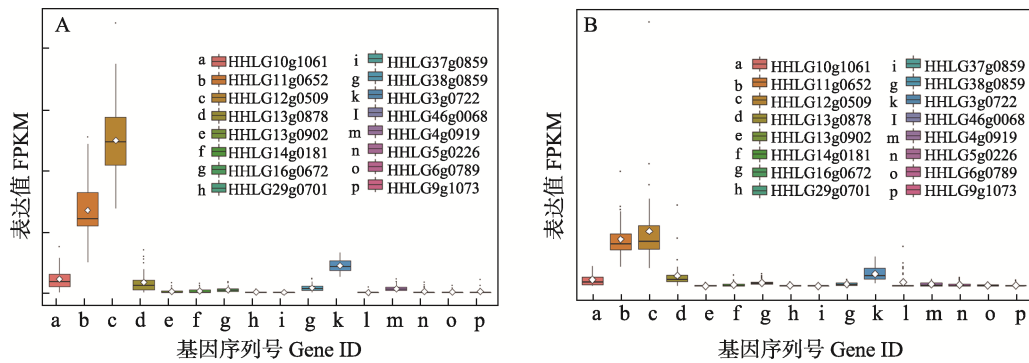


图 6 *trim25* 基因在黄河鲤(A)和镜鲤(B)脑组织中的表达

Fig.6 Expression of *trim25* genes of Yellow River carp (A) and Mirror carp (B) in brain tissue

表 2 鲤肝脏组织顺式调控 *trim25* 基因表达的 SNP

Tab.2 SNP loci in cis-regulation of *trim25* genes in liver of *C. carpio*

基因序列 ID Gene ID	SNP 标记 SNP ID	相关系数 beta	P 值 P-value	FDR 校正值 FDR
HHLG12g0509	LG12:12157279	4.68	9.14×10^{-6}	5.68×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:30607588	1.16	7.52×10^{-6}	5.06×10^{-3}
HHLG37g0859	LG37:24669903	0.05	1.08×10^{-6}	1.51×10^{-3}
HHLG4g0919	LG4:23513641	0.18	9.75×10^{-6}	5.91×10^{-3}
HHLG6g0789	LG6:20084751	0.03	3.13×10^{-6}	2.96×10^{-3}

调控 HHLG6g0789 基因的有 1 个 SNP 位点, 调控 HHLG11g0652 基因的有 9 个 SNP 位点, 调控 HHLG13g0878 基因的有 6 个 SNP 位点, 调控 HHLG13g0902 的有 1 个 SNP 位点(表 2 和表 3)。

3 讨论

在进化过程中, 脊椎动物出现了 *trim* 基因数目的显著增加, 同时伴随着 SPRY 结构域的增加 (Sardiello *et al*, 2008)。目前, 已在人类基因组中鉴定出 75 个 *trim* 基因 (Versteeg *et al*, 2013), 在河豚基因组中发现了 66 个 *trim* 基因, 在斑马鱼基因组中鉴定出 208 个 *trim* 基因 (Boudinot *et al*, 2011), 说明 *trim*

家族数量在不同物种中的差异很大, 且与人类相比, 硬骨鱼类的 *trim* 基因家族进化速度更快。硬骨鱼类基因组中 *trim* 基因存在的多样性和丰富变异, 为 *trim* 基因家族的比较分析提供了理想的模型。鲤 TRIM25 蛋白属于 TRIM 家族第二类成员, 通过氨基酸多序列比对分析结果发现, 鲤与鲤科鱼类金线鲃、斑马鱼的 TRIM25 蛋白结构在 3 个保守结构域高度相似。鲤 12 号染色体上的 *trim25* 基因 HHLG12g0509 与斑马鱼上下游基因完全一致, *trim25* 基因下游的 2 个基因分别是 *rab11fip4b* 和 *utp6*; 上游距离 *trim25* 最近的基因是 *dgke*, *dgke* 也是哺乳动物人、小鼠、鸡、斑马鱼、鲤共有的基因; *coil* 基因是人、小鼠、鸡共有的基因。

表 3 鲤脑组织顺式调控 *trim25* 基因表达的 SNP
Tab.3 SNP loci in cis-regulation of *trim25* genes in brain of *Cyprinus carpio*

基因序列 ID Gene ID	SNP 标记 SNP ID	相关系数 beta	P 值 P-value	FDR 校正后 FDR
HHLG11g0652	LG11:19043364	-3.38	2.89×10^{-6}	1.60×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:19043382	-3.25	6.61×10^{-6}	2.75×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:19044277	-3.61	6.43×10^{-7}	5.82×10^{-4}
HHLG11g0652	LG11:19050242	-3.22	7.62×10^{-6}	3.01×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:19221844	2.74	8.09×10^{-7}	6.80×10^{-4}
HHLG11g0652	LG11:20221841	-3.25	6.67×10^{-6}	2.76×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:20262339	3.33	6.05×10^{-6}	2.59×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:20429556	-3.44	1.78×10^{-6}	1.16×10^{-3}
HHLG11g0652	LG11:20548776	-3.26	6.62×10^{-6}	2.75×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:29061261	2.01	9.81×10^{-6}	3.54×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:29111379	2.06	5.87×10^{-6}	2.54×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:29430220	2.04	3.28×10^{-6}	1.74×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:29906806	1.74	1.82×10^{-6}	1.18×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:30254648	2.62	3.35×10^{-6}	1.76×10^{-3}
HHLG13g0878	LG13:30810530	3.21	6.15×10^{-7}	5.64×10^{-4}
HHLG13g0902	LG13:29851998	0.18	5.11×10^{-6}	2.32×10^{-3}
HHLG6g0789	LG6:20260054	0.33	1.10×10^{-8}	3.32×10^{-5}

共线性的结果体现了硬骨鱼类与高等动物之间的进化差异,以及鲤在经历第 4 轮全基因组复制后,基因多样性有所增加。相对于鲤科其他二倍体鱼类,鲤经历了额外一轮全基因组复制,形成了四倍化的基因组,在基因组复制及之后的漫长进化过程中,基因组的许多区域产生大量的结构变异,如倒位、易位、插入、缺失等,类似鲤 11 号染色体的倒位现象大量存在。

本研究鉴定了鲤 TRIM25 蛋白有 16 个拷贝之多,这可能是进化过程中,由于环境压力导致的 *trim* 基因家族的扩张。此外,研究表明, *trim* 基因家族的扩展与先天免疫及适应性免疫的进化惊人得平行,这表明 TRIM 蛋白可能在日益复杂的免疫功能中发挥核心调节因子的作用(Malfavon-Borja *et al.*, 2013; Versteeg *et al.*, 2014)。在鲤 TRIM25 的 16 个拷贝中,有 6 个拷贝具有完整的结构域,而另外 10 个拷贝虽然具有 TRIM25 的部分结构域,但并不完整,这可能由于进化过程中发生了基因的亚功能化或去功能化。

为了精细定位鱼类抗病毒性状相关的基因和通路,高通量分子标记的采集和大样本的表型分析是非常必要的。对于鲤这样经历了第 4 轮全基因组复制的异源四倍物种,许多基因发生了扩增和结构变异,增加了性状精准定位的难度。在 Ross 团队发表的鲤抗疱疹病毒 QTL 研究中,初步定位到 *trim25* 基因

(Palaiokostas *et al.*, 2018),但由于其研究采用了旧版本参考基因组,装配和注释结果不够准确,因此,并未精确解析该基因的多拷贝的差异。本研究基于高质量的新版本基因组开展了鲤 *trim25* 基于多个拷贝的筛选和分析,为了解析 *trim25* 基因的调控机制,还开展了 eQTL 分析。eQTL 是 Jansen 等(2001)提出的将全基因组中每个基因的表达量作为数量性状,对其进行 QTL 定位分析的方法。eQTL 分析填补了基因型和表型之间的空白(Kim *et al.*, 2012),与全基因组关联研究(GWAS)和差异表达分析的整合研究已经广泛应用于人类疾病研究和动植物育种研究(Joehanes *et al.*, 2017; Nieuwenhuis *et al.*, 2016; Pavlides *et al.*, 2016), eQTL 分析新统计方法和软件的开发加速了该领域的进展(Zhu *et al.*, 2016)。本研究鉴定了肝脏组织中多个调控位点,表明了肝脏与免疫功能的密切相关(Huang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010)。根据鲤的 TRIM25 在脑和肝脏组织的表达分析及 eQTL 分析结果,初步筛选了候选的调控位点,对于目前处于起步阶段的鲤抗病毒 QTL 和 GWAS 研究有重要的提示作用。

本研究初步定位了鲤 *trim25* 基因的多个拷贝,比较了鲤与其他物种的 *trim25* 序列差异、进化关系和共线性相似度,揭示了鲤 *trim25* 各拷贝之间的结构多样性和在组织中表达的分化情况,筛选了可能调控 *trim25* 基因表达的顺时调控位点,为今后鲤 *trim25*

的基因功能精细研究奠定了基础, 也为鱼类抗病研究和育种提供了重要参考。

参 考 文 献

- ASLAM M L, ROBLEDO D, KRASNOV A, *et al.* Quantitative trait loci and genes associated with salmonid alphavirus load in Atlantic salmon: Implications for pancreas disease resistance and tolerance. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 10393
- BOUDINOT P, VAN DER AA LM, JOUNEAU L, *et al.* Origin and evolution of TRIM proteins: New insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22022
- GAO J, MA J L, LIU Y, *et al.* Bioinformatics analysis of sox gene family in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 41–48 [高进, 马佳璐, 刘洋, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) Sox 基因家族生物信息学分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 41–48]
- GUO J, CAO K, DENG C, *et al.* An integrated peach genome structural variation map uncovers genes associated with fruit traits. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 258
- HUANG L R, WOHLLEBER D, REISINGER F, *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nature Immunology*, 2013, 14(6): 574–583
- JACOBS A, CARRUTHERS M, YURCHENKO A, *et al.* Parallelism in eco-morphology and gene expression despite variable evolutionary and genomic backgrounds in a Holarctic fish. *PLoS Genetics*, 2020, 16(4): e1008658
- JANSEN R C, NAP J P. Genetical genomics: The added value from segregation. *Trends in Genetics*, 2001, 17(7): 388–391
- JIN Y, JIA K, ZHANG W, *et al.* Zebrafish TRIM25 promotes innate immune response to RGNNV infection by targeting 2CARD and RD regions of RIG-I for K63-linked ubiquitination. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2805
- JOEHANES R, ZHANG X, HUAN T, *et al.* Integrated genome-wide analysis of expression quantitative trait loci aids interpretation of genomic association studies. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 16
- KIM Y A, PRZYTYCKA T M. Bridging the gap between genotype and phenotype via network approaches. *Frontiers in Genetics*, 2012, 3: 227
- KORDAS G, RUDRA P, HENDRICKS A, *et al.* Insight into genetic regulation of miRNA in mouse brain. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 849
- LEE W Y, MORIARTY T J, WONG C H, *et al.* An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nature Immunology*, 2010, 11(4): 295–302
- LOWE W L Jr, REDDY T E. Genomic approaches for understanding the genetics of complex disease. *Genome Research*, 2015, 25(10): 1432–1441
- MALFAVON-BORJA R, SAWYER S L, WU L I, *et al.* An evolutionary screen highlights canonical and noncanonical candidate antiviral genes within the primate TRIM gene family. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(11): 2141–2154
- MANOKARAN G, FINOL E, WANG C, *et al.* Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 2015, 350(6257): 217–221
- MICALE L, CHAIGNAT E, FUSCO C, *et al.* The tripartite motif: Structure and function. 2016, 770: 11–25
- NICOLAE DL, GAMAZON E, ZHANG W, *et al.* Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: Annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genetics*, 2010, 6(4): e1000888
- NIEUWENHUIS M A, SIEDLINSKI M, VAN DEN BERGE M, *et al.* Combining genomewide association study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma. *Allergy*, 2016, 71(12): 1712–1720
- PALAIOKOSTAS C, ROBLEDO D, VESELY T, *et al.* Mapping and sequencing of a significant quantitative trait locus affecting resistance to koi herpesvirus in common carp. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(11): 3507–3513
- PAVLIDES J M, ZHU Z, GRATTEEN J, *et al.* Predicting gene targets from integrative analyses of summary data from GWAS and eQTL studies for 28 human complex traits. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 84
- PENG Q D. Method for constructing and analyzing biological network based on eQTL data. Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2020 [彭启迪. 基于 eQTL 数据的生物网络构建与分析方法. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2020]
- SARDIELLO M, CAIRO S, FONTANELLA B, *et al.* Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 225
- TOCCHINI C, CIOSK R. TRIM-NHL proteins in development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2015, 47–48: 52–59
- VERSTEEG G A, BENKE S, GARCÍA-SASTRE A, *et al.* InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2014, 25(5): 563–576
- VERSTEEG G A, RAJSBAUM R, SÁNCHEZ-APARICIO M T, *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity*, 2013, 38(2): 384–398
- WALKER R L, RAMASWAMI G, HARTL C, *et al.* Genetic control of expression and splicing in developing human brain informs disease mechanisms. *Cell*, 2020, 181(2): 484

- XU P, XU J, LIU G, *et al.* The allotetraploid origin and asymmetrical genome evolution of the common carp *Cyprinus carpio*. *Nature communications*, 2019, 10(1): 4625
- YANG Y, HUANG Y, YU Y, *et al.* RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 55: 304–314
- ZHOU Z Z, JING F, WEI K, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of TRIM25 gene in *Larimichthys crocea*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1189–1196 [周真真, 景斐, 魏可, 等. 大黄鱼 TRIM25 基因克隆和表达分析. *水生生物学报*, 2019, 43(6): 1189–1196]
- ZHU Z, ZHANG F, HU H, *et al.* Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nature Genetics*, 2016, 48(5): 481–487

(编辑 冯小花)

Gene Evolution and Expression Regulation of Multiple Copies of *trim25* in Common Carp, *Cyprinus carpio*

ZHU Youxiu^{1,2}, JIANG Yanliang², ZHANG Qin³, FENG Jianxin³,
ZHANG Hanyuan², WU Biyin^{1,2}, XU Jian^{2①}

(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, Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 3. Henan Academy of Fishery Sciences, Zhengzhou, Henan 450044, China)

Abstract The innate immune system is the main defense against viral infections in teleost fish. As an important part of the innate immune system, the TRIM protein family participates in the regulation of the immune network during virus infection. Among such proteins, TRIM25 has been reported to play an important role in the immune response of many types of fish. In this study, 16 copies of the *trim25* gene in common carp (*Cyprinus carpio*) were compared with those of other species by phylogenetic and synteny analyses. Functional domain structures for 16 copies of the TRIM25 protein were predicted, and the expression and cis-regulatory network in tissues for each gene copy were compared. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that the TRIM25 protein structure of *C. carpio* was highly similar to that of *Sinocyclocheilus grahami* and *Danio rerio*, but distinct from that of other species beyond Cyprinidae. The results of gene synteny indicated that the upstream and downstream genes of *trim25* were relatively conserved in the evolution of different species. Structural analysis of TRIM25 showed that six of the sixteen copies in *C. carpio* had complete functional domains; five of these copies were highly expressed in liver and brain tissue. In the expression quantitative trait loci (eQTL) regulatory network for *trim25*, 5 and 17 SNPs were determined to regulate *trim25* expression in liver and brain tissue, respectively. In this study, the sequence differences of multiple copies of *trim25* in common carp were compared, and the evolutionary relationship and synteny of *trim25* were identified. The diversity of the structure and tissue expression of *trim25* genes in the common carp were revealed, and the SNP sites that may regulate *trim25* gene expression were identified, providing a reference for future research on *trim25* related regulation and disease resistance in the *C. carpio*.

Key words *Cyprinus carpio*; TRIM25; Protein structure; Phylogenetic tree; eQTL

① Corresponding author: XU Jian, E-mail: xuj@cafs.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210114003

http://www.yykxjz.cn/

沈钰博, 王际英, 李宝山, 刘财礼, 王晓艳, 黄炳山, 王世信, 孙永智. 许氏平鲈幼鱼对饲料中精氨酸需求量的研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 33-44

SHEN Y B, WANG J Y, LI B S, LIU C L, WANG X Y, HUANG B S, WANG S X, SUN Y Z. Dietary arginine requirement of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 33-44

许氏平鲈幼鱼对饲料中精氨酸需求量的研究*

沈钰博^{1,2} 王际英^{2①} 李宝山² 刘财礼^{1,2}
王晓艳² 黄炳山² 王世信² 孙永智²

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院
山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006)

摘要 本实验旨在研究饲料中不同精氨酸含量对许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)幼鱼生长、体组成、血清生化指标及肝脏相关酶活力的影响,以确定其对精氨酸的最适需求量。在基础饲料中添加晶体L-精氨酸配制精氨酸含量分别为1.39%、1.83%、2.34%、2.80%、3.39%和4.08%的6组等氮等脂的实验饲料(D1、D2、D3、D4、D5和D6)。饲喂初始体重为(12.03±0.03)g的许氏平鲈幼鱼56d。结果显示,随着饲料中精氨酸含量的升高,实验鱼的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和蛋白质效率(PER)均先升高后降低,在D3组达到最高值,显著高于D1、D2、D5和D6组($P<0.05$);饲料系数(FCR)先降低后升高,在D3组达到最低值,显著低于D1、D2、D5和D6组($P<0.05$);D3组肌肉粗蛋白含量最高且显著高于其他组($P<0.05$),肌肉水分、粗脂肪、粗灰分和全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分无显著性差异;全鱼和肌肉总必需氨基酸(Σ EAA)和总氨基酸(Σ A)含量均先升高后降低;血清谷丙转氨酶(ALT)活力先降低后升高,D3组显著小于其他组($P<0.05$),一氧化氮(NO)含量先升高后降低,D3和D4组显著高于其他组($P<0.05$),尿素氮(BUN)含量先升高后趋于平缓;肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)、总一氧化氮合酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活力均先升高后降低,丙二醛(MDA)含量先降低后升高,D2~D4组显著低于D1、D5和D6组($P<0.05$)。在本研究条件下,以WGR为评价指标,经一元二次回归分析得出,许氏平鲈幼鱼[(12.03±0.03)g]饲料中精氨酸适宜需求量为2.78%(占5.56%饲料粗蛋白)。

关键词 许氏平鲈幼鱼;精氨酸;需求量;生长

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0033-12

蛋白质是水产动物所必需的重要营养物质,是生命的物质基础,蛋白质的营养主要体现为氨基酸的营养,氨基酸在蛋白质的养分代谢中占据重要地位(任和等,2006)。必需氨基酸指动物自身不能合成或

合成量不能满足动物的需要,必须由食物提供的氨基酸,其在鱼类生长、饲料利用、抗应激和免疫等方面有重要影响。精氨酸是鱼类生长发育所必需的氨基酸之一,不仅参与了细胞蛋白质的合成,且还是肌酸

* 山东省自然科学基金(ZR2020QC206)和烟台市科技计划(2018ZHGY066)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QC206), and Science and Technology Development Project of Yantai (2018ZHGY066)]. 沈钰博, E-mail: shenyubo0121@163.com

① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2021-01-14, 收修改稿日期: 2021-03-30

(creatine)、多胺类(polyamines)、一氧化氮(NO)等生物活性物质的合成前体,在细胞生长、组织再生及炎症修复中起重要作用(Luo, 2004)。研究表明,饲料中适量添加精氨酸能显著提高大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) (周恒永, 2011)、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) (Luzzana *et al*, 1998)的增重率、特定生长率和蛋白质沉积率,显著提高卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)血清和肝脏中总一氧化氮合酶(TNOS)和溶菌酶(LZM)活性,提高机体免疫力(Lin *et al*, 2015)。精氨酸的缺乏会导致鱼类生长缓慢、饲料利用率低和免疫力下降等(廖英杰等, 2014)。饲料中过量的精氨酸不影响大西洋鲑(*Salmo salar*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus Punetaus*)的生长,但会抑制遮目鱼(*Chanos chanos*)和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的生长,并提高其死亡率(万军利等, 2006)。

许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*), 隶属于鲈形目(Scorpaeniformes)、鲈科(Scorpaenidae)、平鲈属(*Sebastes*), 又称黑鲷、黑头、黑寨等, 属冷温性近海底层肉食性鱼类, 在我国北部沿海、日本、朝鲜及俄罗斯等区域均有分布(朱龙等, 1999)。因其适应性强、易饲养、肉质鲜美等优点和多栖息于礁岩海藻丛生区域, 喜集群觅食等生物学特性, 是网箱养殖和海洋牧场增殖的理想海水鱼种之一。目前, 对许氏平鲈必需氨基酸的研究仅限于赖氨酸(严全根等, 2006)和蛋氨酸(Yan *et al*, 2007)。本研究通过在饲料中添加不同含量的精氨酸, 研究其对许氏平鲈幼鱼生长、体成分、血清相关生化指标及肝脏相关酶活力影响, 确定许氏平鲈幼鱼对精氨酸的最适需求量, 为其配合饲料的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

本实验以鱼粉、玉米蛋白粉为主要蛋白源, 以鱼油为主要脂肪源, 设计粗蛋白约为 50%, 粗脂肪约为 10%的基础饲料配方(Kim *et al*, 2001; Lee *et al*, 2002)。添加混合晶体氨基酸使饲料的氨基酸组成比例与许氏平鲈幼鱼肌肉氨基酸组成比例一致(精氨酸除外)。在基础饲料中分别添加 0、0.6%、1.2%、1.8%、2.4%和 3.0%的 L-精氨酸(纯度为 98%, 购自上海麦克林生化科技有限公司), 配制 6 组精氨酸含量分别为 1.39%、1.83%、2.34%、2.80%、3.39%和 4.08%的实验饲料(表 1), 分别命名为 D1、D2、D3、D4、D5 和 D6 组。实验饲料氨基酸组成见表 2。

各固体原料经粉碎过 80 目标准筛, 按配比称重

后, 用逐级扩大法混合均匀, 添加鱼油和适宜的蒸馏水, 再次混合均匀, 用小型饲料挤压机制成粒径为 2 mm 和 4 mm 的颗粒饲料, 60℃烘干, 用塑料袋密封后于-20℃冰箱保存备用。

1.2 实验用鱼及饲养管理

实验所用许氏平鲈幼鱼购自山东荣成裕源祥水产有限公司。正式实验前, 挑选体质健壮的许氏平鲈幼鱼暂养于蓝色圆形养殖桶(桶高为 80 cm, 直径为 70 cm, 水深为 50 cm), 投喂 D1 组饲料驯化, 14 d 后挑选 540 尾规格均匀的许氏平鲈幼鱼[(12.03±0.03) g], 随机分配至 18 个桶, 每桶 30 尾。正式养殖实验于 2019 年 11 月 15 日—2020 年 1 月 11 日在山东省海洋资源与环境研究院室内循环水养殖系统进行。养殖期间每天定时(08:00 和 16:00)定量投喂 2 次, 初始投喂量为鱼体重的 1%, 并按摄食情况及时调整投喂量, 每日记录死鱼数量和重量。养殖期间确保水质符合以下条件: 水温为 16℃~18℃, 溶氧(DO)> 8.0 mg/L, pH 为 7.5~8.2, 盐度为 27~28, 氨氮和亚硝态氮<0.05 mg/L。

1.3 样品采集及分析

养殖实验结束后, 禁食 24 h, 记录每桶鱼的数量并称总重, 每桶随机取 6 尾用于鱼体常规成分测定, 另取 8 尾测量体重及体长后, 尾静脉取血, 解剖分离内脏, 分别称量内脏团和肝胰脏的重量。全鱼置于-20℃保存, 背肌、肝胰脏及血清样品置于-80℃保存, 待测。

实验饲料及样品中水分采用 105℃恒重法测定(GB/T 6435-2014), 粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-2018), 粗脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T 6433-2006), 粗灰分采用 550℃失重法测定(GB/T 6438-2007), 能量采用燃烧法测定(IKA, C6000, 德国), 氨基酸含量采用酸水解法(GB/T 18246-2019), 使用全自动氨基酸测定仪(HITACHI, L-8900, 日本)测定。

血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(Alb)、NO、尿素氮(BUN)、肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、溶菌酶(LZM)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总抗氧化物酶(T-AOC)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、一氧化氮合酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。血清和肝脏总蛋白(TP)含量采用考马斯亮蓝法测定。测定方法及酶活力单位参照试剂盒说明书。

表1 饲料配方及营养组成(%风干基础)

Tab.1 Formulation and nutritional composition of the experimental diets (% air-dry basis)

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
原料 Ingredients						
白鱼粉 White fish meal	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
酪蛋白 Casein	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
混合氨基酸 Amino acid mixture ^a	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
L-精氨酸 L-Arg	0.00	0.60	1.20	1.80	2.40	3.00
L-甘氨酸 L-Gly	3.00	2.40	1.80	1.20	0.60	0.00
鱼油 Fish oil	8.50	8.50	8.50	8.50	8.50	8.50
维生素混合物 Vitamins premix ^b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质混合物 Minerals premix ^c	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
抗氧化剂 Antioxidant	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
甜菜碱 Betaine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
α-淀粉 α-Starch	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00
羧甲基纤维素钠 CMC-Na	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养组成 Nutrient composition						
水分 Moisture	6.94	7.65	7.02	7.23	7.51	7.28
粗蛋白 Crude protein	50.67	50.99	50.67	50.82	50.63	50.78
粗脂肪 Crude lipid	10.45	10.24	10.06	10.43	10.41	10.13
粗灰分 Crude ash	12.23	12.21	12.22	12.17	12.16	12.19
总能 Gross energy/(kJ/g)	20.39	20.38	20.44	20.34	20.45	20.43

注: a: 混合氨基酸(g/kg 饲料): 天冬氨酸 21.48 g; 苏氨酸 8.09 g; 丝氨酸 5.18 g; 谷氨酸 19.08 g; 甘氨酸 17.48 g; 丙氨酸 8.37 g; 半胱氨酸 5.75 g; 缬氨酸 6.36 g; 蛋氨酸 3.82 g; 异亮氨酸 4.90 g; 亮氨酸 13.96 g; 酪氨酸 5.07 g; 苯丙氨酸 7.64 g; 赖氨酸 19.87 g; 组氨酸 2.95 g

b: 维生素预混料(g/kg 饲料): 维生素 A 乙酸酯 0.73 g; 维生素 B₁₂ 0.003 g; 维生素 C 121.2 g; 维生素 D₃ 0.003 g; DL 维生素 E 生育酚乙酸酯 18.8 g; 维生素 K 1.8 g; 盐酸硫胺素 2.7 g; 盐酸吡哆醇 1.8 g; 烟酸 27.8 g; 叶酸(98%)0.68 g; 核黄素 9.1 g; 泛酸钙 12.7 g; 肌醇 181.8 g; 生物素 0.27 g

c: 矿物质预混料(g/kg 饲料): 硫酸镁 80 g; 磷酸二氢钠 370 g; 氯化钾 130 g; 柠檬酸铁 40 g; 硫酸锌 20 g; 氯化亚铜 0.2 g; 氯化铝 0.15 g; 碘化钾 0.15 g; 亚硒酸钠 0.01 g; 蛋氨酸锰 2.0 g; 氯化钴 1.0 g

Note: a: Amino acid mixture (g/kg diet): Aspartic acid 21.48 g; threonine 8.09 g; serine 5.18 g; glutamic acid 19.08 g; glycine 17.48 g; alanine 8.37 g; cysteine 5.75 g; valine 6.36 g; methionine 3.82 g; isoleucine 4.90 g; leucine 13.96 g; tyrosine 5.07 g; phenylalanine 7.64 g; lysine 19.87 g; histidine 2.95 g

b: Vitamin premix (g/kg diet): Vitamin A acetate 0.73 g; vitamin B₁₂ 0.003 g; vitamin C 121.2 g; vitamin D₃ 0.003 g; DL vitamin E tocopherol 18.8 g; vitamin K 1.8 g; thiamine hydrochloride 2.7 g; pyridoxine hydrochloride 1.8 g; niacin acid 27.8 g; folic acid (98%) 0.68 g; riboflavin 9.1 g; calcium pantothenate 12.7 g; inositol 181.8 g; biotin 0.27 g

c: Mineral premix (g/kg diet): Magnesium sulfate 80 g; sodium dihydrogen phosphate 370 g; potassium chloride 130 g; ferric citrate 40 g; zinc sulfate 20 g; cuprous chloride 0.2 g; aluminum chloride 0.15 g; potassium iodide 0.15 g; sodium selenite 0.01 g; manganese methionine 2.0 g; cobalt chloride 1.0 g

1.4 指标计算

增重率(weight gain rate, WGR, %)=(鱼体末重-鱼体初重)/鱼体初重×100;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=(ln 鱼体末重-ln 鱼体初重)/养殖周期×100;

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)=摄食饲料量/(鱼体末重-鱼体初重);

蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER, %)=(鱼体末重-鱼体初重)/(摄食饲料量×饲料中粗蛋白的含量)×100;
摄食率(daily feed intake, DFI, %/d)=摄食饲料量/[(鱼体初重+鱼体末重)/2×养殖天数]×100;

脏体比(viscerosomatic index, VSI, %)=内脏团重/鱼体末重×100;

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)=肝胰脏重/鱼体末重×100;

表2 实验饲料氨基酸组成(%干饲料)
Tab.2 Amino acid profiles of the experimental diets (% dry diet)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups						肌肉氨基酸组成 Muscle amino acids profiles
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	
必需氨基酸 Essential amino acids							
精氨酸 Arg	1.39	1.83	2.34	2.80	3.39	4.08	2.44
苏氨酸 Thr	1.97	2.03	2.03	2.05	2.00	2.02	2.19
缬氨酸 Val	1.91	1.88	1.95	1.98	1.96	1.90	1.75
蛋氨酸 Met	0.68	0.66	0.65	0.65	0.61	0.61	1.03
异亮氨酸 Ile	1.50	1.53	1.50	1.51	1.50	1.53	1.52
亮氨酸 Leu	4.32	4.32	4.42	4.25	4.29	4.34	3.49
苯丙氨酸 Phe	3.24	3.2	3.13	3.16	3.26	3.25	1.73
赖氨酸 Lys	3.29	3.29	3.25	3.35	3.31	3.31	3.87
组氨酸 His	0.85	0.86	0.86	0.85	0.85	0.86	1.08
非必需氨基酸 Non-essential amino acids							
酪氨酸 Tyr	2.27	2.18	2.23	2.33	2.55	2.49	1.71
半胱氨酸 Cys	1.75	1.71	1.79	1.80	1.83	1.81	1.06
脯氨酸 Pro	1.88	1.84	1.85	1.83	1.85	1.92	0.99
天冬氨酸 Asp	4.23	4.43	4.48	4.44	4.33	4.30	4.72
谷氨酸 Glu	7.90	7.94	7.95	8.09	7.91	7.91	6.35
丝氨酸 Ser	2.00	2.09	2.12	2.12	2.08	2.10	1.92
甘氨酸 Gly	5.85	5.29	4.75	4.18	3.61	3.07	2.16
丙氨酸 Ala	2.89	2.79	2.85	2.82	2.83	2.83	2.67

肥满度(condition factor, CF)=鱼体末重/体长³×100;
存活率(survival rate, SR,%)=终末鱼尾数/初始鱼尾数×100。

(Mean±SD)表示,采用一元二次回归分析,确定许氏平鲷幼鱼对饲料中精氨酸的最适需求量。

1.5 数据统计与分析

使用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),差异显著($P<0.05$)时用 Duncan's 检验进行多重比较分析,数据用平均值±标准差

2 结果

2.1 精氨酸对许氏平鲷幼鱼生长、饲料利用和形体指标的影响

如表 3 所示,随着精氨酸含量的升高,实验鱼

表3 精氨酸对许氏平鲷幼鱼生长和形体指标的影响($n=3$,平均值±标准差)

Tab.3 Effects of dietary arginine on growth performance and body indices of juvenile *S. schlegelii* ($n=3$, Mean±SD)

生长性能 Growth performances	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初始体质量 Initial body weight/g	12.01±0.05	12.04±0.00	12.03±0.02	12.00±0.03	12.04±0.04	12.02±0.03
终末体质量 Final body weight/g	17.99±0.01 ^a	19.26±0.81 ^{bc}	20.43±0.16 ^d	19.91±0.50 ^{cd}	18.71±0.64 ^{ab}	18.67±0.46 ^{ab}
增重率 WGR/%	49.24±0.36 ^a	60.48±1.74 ^c	70.72±1.36 ^d	68.34±0.03 ^d	55.72±1.56 ^b	54.91±0.76 ^b
特定增长率 SGR/(%/d)	0.69±0.01 ^a	0.81±0.02 ^{abc}	0.92±0.02 ^c	0.90±0.00 ^{bc}	0.76±0.03 ^{ab}	0.75±0.03 ^{ab}
饲料系数 FCR	1.40±0.02 ^d	1.22±0.04 ^{bc}	1.08±0.03 ^a	1.17±0.04 ^{ab}	1.23±0.07 ^{bc}	1.29±0.02 ^c
摄食率 DFI/(%/d)	0.88±0.00	0.90±0.01	0.89±0.01	0.88±0.03	0.87±0.02	0.88±0.01
蛋白质效率 PER/%	1.35±0.06 ^a	1.64±0.11 ^b	1.86±0.10 ^d	1.78±0.00 ^c	1.75±0.04 ^{bc}	1.74±0.06 ^{bc}
脏体比 VSI/%	10.41±0.03	10.58±0.26	10.67±0.11	10.79±0.29	10.33±0.15	10.28±0.12
肝体比 HSI/%	3.34±0.03	3.42±0.03	3.44±0.13	3.39±0.18	3.23±0.12	3.21±0.16
肥满度 CF	2.61±0.02 ^a	2.66±0.07 ^{ab}	2.83±0.02 ^c	2.74±0.06 ^{bc}	2.65±0.07 ^{ab}	2.67±0.04 ^{ab}
存活率 SR/%	97.78±2.22	97.78±2.22	98.89±1.17	97.78±2.22	96.67±1.93	96.67±1.93

注:同行无字母或数据肩标相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

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

WGR、SGR 均先升高后降低, 在 D3 组出现最大值且显著高于其他组($P<0.05$)。FCR 先降低后升高, D3 组显著低于其他组($P<0.05$)。PER 先升高后平稳, D3~D6 组显著高于 D1 组($P<0.05$)。VSI 和 HSI 无显著性差异($P>0.05$), CF 先升高后降低, D3~D4 组显著高于 D1 组($P<0.05$), 各组成活率无显著差异($P>0.05$)。

以 WGR 为评价指标, 经一元二次回归性分析, 许氏平鲈幼鱼对饲料中精氨酸的最适需求量为 2.78%饲料(5.56%饲料蛋白质)(图 1)。

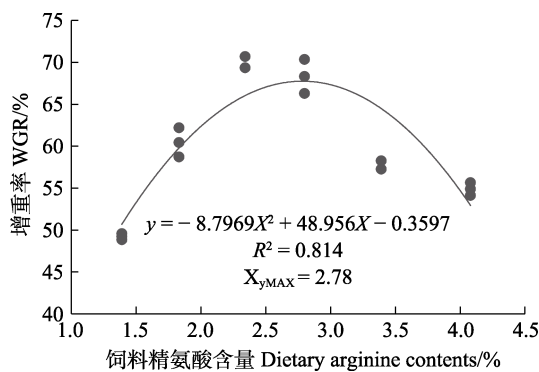


图 1 许氏平鲈幼鱼增重率与饲料精氨酸含量的相关性分析
Fig.1 Relationship between dietary arginine contents and weight gain rate of *S. schlegelii*

表 4 饲料中精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼常规成分的影响($n=3$, 平均值±标准差, %湿重)

Tab.4 Effect of dietary arginine on the conventional compositions of juvenile *S. schlegelii* ($n=3$, Mean±SD, % wet weight)

体组成 Body composition	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
全鱼 Whole body						
水分 Moisture/%	72.54±0.00	71.96±0.01	72.56±0.01	71.90±0.12	71.90±0.05	72.66±0.01
粗蛋白 Crude protein/%	15.17±0.08	15.05±0.15	15.33±0.27	15.29±0.35	15.58±0.50	15.50±0.62
粗脂肪 Crude lipid/%	6.26±0.31	6.49±0.38	6.41±0.15	6.57±0.29	6.64±0.23	5.90±0.26
粗灰分 Crude ash/%	4.63±0.05	4.62±0.03	4.65±0.02	4.78±0.03	4.51±0.07	4.88±0.03
肌肉 Muscle						
水分 Moisture/%	74.69±0.09	74.56±1.40	75.47±0.28	75.00±0.41	75.40±0.27	75.50±0.35
粗蛋白 Crude protein/%	20.26±0.01 ^b	20.33±0.12 ^b	21.19±0.03 ^c	20.09±0.08 ^b	20.03±0.19 ^{ab}	19.71±0.34 ^a
粗脂肪 Crude lipid/%	2.47±0.32	2.48±0.27	2.77±0.30	2.71±0.18	2.57±0.27	2.56±0.18
粗灰分 Crude ash/%	1.34±0.02	1.33±0.00	1.36±0.08	1.35±0.03	1.36±0.03	1.37±0.041

2.4 精氨酸对许氏平鲈幼鱼血清生化指标的影响

如表 7 所示, 随着饲料精氨酸含量的增加, 血清谷丙转氨酶(ALT)(图 2)活力先降低后升高, D3 组显著小于其他组($P<0.05$); 谷草转氨酶(AST)活力各组间无显著性差异; 白蛋白(Alb)(图 3)和 NO(图 4)含量先升高后降低; 尿素氮(BUN)(图 5)含量先升高后趋于平缓, D3~D6 组显著高于 D1 组($P<0.05$)。

2.2 精氨酸对许氏平鲈幼鱼常规成分的影响

如表 4 所示, 饲料中精氨酸含量的对全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量均无显著性影响($P>0.05$)。肌肉粗蛋白含量先升高后降低, D3 组显著高于其他组($P<0.05$)。肌肉水分、粗脂肪和粗灰分含量均无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 精氨酸对许氏平鲈幼鱼全鱼及肌肉氨基酸组成的影响

如表 5 所示, 随着饲料中精氨酸含量的增加, 全鱼缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、亮氨酸(Leu), 异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、总必需氨基酸(Σ EAA)和总氨基酸(Σ AA)均先升高后降低, 精氨酸(Arg)含量先升高后平稳, 其他氨基酸含量不受饲料精氨酸水平的影响。

如表 6 所示, 随着饲料精氨酸含量的增加, 肌肉蛋氨酸(Met)、精氨酸(Arg)、总必需氨基酸(Σ EAA)和总氨基酸(Σ AA)含量先升高后降低, 赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)含量先升高后平稳, 其他氨基酸含量不受饲料精氨酸含量的影响。

2.5 精氨酸对许氏平鲈幼鱼肝脏相关酶活力的影响

如表 8 所示, 随着饲料精氨酸含量的增加, 肝脏超氧化物歧化酶(SOD)(图 6)、溶菌酶(LZM)、谷草转氨酶(AST)、总抗氧化酶(T-AOC)、碱性磷酸酶(AKP)、总一氧化氮合酶(TNOS)(图 8)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)(图 9)活力均先升高后降低。丙二醛(MDA)(图 7)含量先降低后升高, D2~D4 组显著低于

表5 饲料中精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼全鱼氨基酸组成的影响($n=3$, 平均值 \pm 标准差)
Tab.5 Effect of dietary arginine on amino acid profiles of whole fish of juvenile *S. schlegelii* ($n=3$, Mean \pm SD)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
必需氨基酸 Essential amino acids						
缬氨酸 Val	2.27 \pm 0.05 ^a	2.35 \pm 0.05 ^{abc}	2.36 \pm 0.05 ^{bc}	2.41 \pm 0.02 ^c	2.34 \pm 0.02 ^{abc}	2.29 \pm 0.05 ^{ab}
蛋氨酸 Met	0.60 \pm 0.04 ^a	0.81 \pm 0.03 ^c	0.85 \pm 0.01 ^c	0.83 \pm 0.03 ^c	0.83 \pm 0.04 ^c	0.72 \pm 0.03 ^b
异亮氨酸 Ile	1.53 \pm 0.05 ^a	1.64 \pm 0.04 ^b	1.63 \pm 0.05 ^b	1.67 \pm 0.01 ^b	1.48 \pm 0.04 ^a	1.54 \pm 0.06 ^a
亮氨酸 Leu	3.50 \pm 0.07 ^a	3.73 \pm 0.04 ^b	3.67 \pm 0.06 ^b	3.76 \pm 0.07 ^b	3.54 \pm 0.06 ^a	3.51 \pm 0.04 ^a
赖氨酸 Lys	3.70 \pm 0.12 ^a	3.94 \pm 0.08 ^b	3.95 \pm 0.95 ^b	3.91 \pm 0.04 ^b	3.68 \pm 0.05 ^a	3.74 \pm 0.12 ^a
精氨酸 Arg	3.03 \pm 0.09 ^a	3.18 \pm 0.05 ^{ab}	3.18 \pm 0.02 ^{ab}	3.24 \pm 0.10 ^b	3.08 \pm 0.06 ^{ab}	3.11 \pm 0.10 ^{ab}
组氨酸 His	0.99 \pm 0.01	1.07 \pm 0.01	1.06 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03	0.98 \pm 0.06	1.05 \pm 0.04
苯丙氨酸 Phe	2.99 \pm 0.01	3.14 \pm 0.06	3.10 \pm 0.07	3.10 \pm 0.04	2.95 \pm 0.07	3.11 \pm 0.11
苏氨酸 Thr	2.26 \pm 0.10	2.40 \pm 0.02	2.41 \pm 0.03	2.38 \pm 0.06	2.29 \pm 0.14	2.26 \pm 0.13
总必需氨基酸 Σ EAA	20.86 \pm 0.33 ^a	22.27 \pm 0.27 ^b	22.35 \pm 0.21 ^b	22.38 \pm 0.27 ^b	21.37 \pm 0.31 ^a	21.34 \pm 0.67 ^a
非必需氨基酸 Non-essential amino acids						
天冬氨酸 Asp	4.81 \pm 0.20 ^a	5.14 \pm 0.06 ^b	5.13 \pm 0.08 ^b	5.12 \pm 0.12 ^b	4.99 \pm 0.12 ^a	4.97 \pm 0.11 ^a
丝氨酸 Ser	2.61 \pm 0.12	2.73 \pm 0.09	2.69 \pm 0.06	2.68 \pm 0.10	2.76 \pm 0.05	2.67 \pm 0.10
谷氨酸 Glu	6.73 \pm 0.11	7.00 \pm 0.04	6.98 \pm 0.17	6.99 \pm 0.02	6.81 \pm 0.14	6.97 \pm 0.14
脯氨酸 Pro	2.21 \pm 0.10	2.26 \pm 0.19	2.33 \pm 0.04	2.32 \pm 0.07	2.29 \pm 0.13	2.19 \pm 0.08
甘氨酸 Gly	4.18 \pm 0.15	4.33 \pm 0.18	4.21 \pm 0.07	4.32 \pm 0.09	4.43 \pm 0.13	4.18 \pm 0.14
丙氨酸 Ala	3.33 \pm 0.06	3.50 \pm 0.03	3.42 \pm 0.09	3.50 \pm 0.07	3.44 \pm 0.14	3.41 \pm 0.14
半胱氨酸 Cys	1.92 \pm 0.03	1.93 \pm 0.09	1.90 \pm 1.87	1.86 \pm 0.04	1.88 \pm 0.09	1.97 \pm 0.05
酪氨酸 Tyr	2.42 \pm 0.01	2.58 \pm 0.02	2.42 \pm 0.08	2.38 \pm 0.02	2.42 \pm 0.00	2.51 \pm 0.03
总非必需氨基酸 Σ NEAA	28.22 \pm 0.51	28.97 \pm 0.31	29.26 \pm 0.17	28.95 \pm 0.38	28.38 \pm 0.38	26.68 \pm 0.45
总氨基酸 Σ AA	49.08 \pm 0.83 ^a	51.23 \pm 0.09 ^{bc}	51.61 \pm 0.39 ^c	50.32 \pm 0.49 ^c	50.21 \pm 1.04 ^{abc}	48.02 \pm 0.14 ^{ab}

表6 饲料中精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼肌肉氨基酸组成的影响($n=3$, 平均值 \pm 标准差)
Tab.6 Effect of dietary arginine on amino acid profiles of dorsal muscle of juvenile *S. schlegelii* ($n=3$, Mean \pm SD)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
必需氨基酸 Essential amino acids						
缬氨酸 Val	3.70 \pm 0.08	3.67 \pm 0.10	3.63 \pm 0.03	3.67 \pm 0.09	3.71 \pm 0.05	3.60 \pm 0.00
蛋氨酸 Met	1.70 \pm 0.42 ^a	1.73 \pm 0.08 ^a	1.88 \pm 0.06 ^b	2.20 \pm 0.11 ^d	2.05 \pm 0.11 ^c	1.92 \pm 0.08 ^b
苯丙氨酸 Phe	4.63 \pm 0.02	4.58 \pm 0.10	4.67 \pm 0.16	4.66 \pm 0.05	4.55 \pm 0.07	4.52 \pm 0.00
赖氨酸 Lys	6.83 \pm 0.06 ^a	6.81 \pm 0.21 ^a	6.94 \pm 0.08 ^b	6.94 \pm 0.10 ^b	7.17 \pm 0.10 ^b	6.93 \pm 0.12 ^b
精氨酸 Arg	4.21 \pm 0.10 ^a	4.19 \pm 0.06 ^a	4.31 \pm 0.01 ^b	4.35 \pm 0.10 ^b	4.38 \pm 0.12 ^b	4.19 \pm 0.10 ^a
组氨酸 His	1.64 \pm 0.05	1.59 \pm 0.07	1.63 \pm 0.05	0.65 \pm 0.06	1.65 \pm 0.08	1.59 \pm 0.00
亮氨酸 leu	6.24 \pm 0.17 ^a	6.18 \pm 0.22 ^a	6.28 \pm 0.06 ^a	6.24 \pm 0.07 ^a	6.60 \pm 0.19 ^b	6.41 \pm 0.16 ^{ab}
异亮氨酸 Ile	2.88 \pm 0.01	2.80 \pm 0.09	2.77 \pm 0.05	2.88 \pm 0.10	2.82 \pm 0.21	2.79 \pm 0.10
苏氨酸 Thr	3.67 \pm 0.09	3.63 \pm 0.13	3.74 \pm 0.07	3.64 \pm 0.11	3.75 \pm 0.05	3.64 \pm 0.18
总必需氨基酸 Σ EAA	35.51 \pm 0.48 ^{ab}	35.18 \pm 0.66 ^a	35.85 \pm 0.29 ^{abc}	36.24 \pm 0.40 ^{bc}	36.69 \pm 0.82 ^c	35.50 \pm 0.44 ^a
非必需氨基酸 Non-essential amino acids						
脯氨酸 Pro	2.23 \pm 0.10	2.16 \pm 0.06	2.23 \pm 0.05	2.29 \pm 0.03	2.36 \pm 0.05	2.25 \pm 0.04
酪氨酸 Tyr	3.96 \pm 0.14	3.99 \pm 0.05	4.09 \pm 0.10	4.06 \pm 0.16	4.05 \pm 0.12	3.96 \pm 0.03
丝氨酸 Ser	3.67 \pm 0.13	3.63 \pm 0.07	3.76 \pm 0.15	3.61 \pm 0.12	3.82 \pm 0.05	3.64 \pm 0.10
谷氨酸 Glu	11.48 \pm 0.30 ^a	11.81 \pm 0.10 ^{ab}	11.55 \pm 0.22 ^a	12.00 \pm 0.84 ^{bc}	12.22 \pm 0.20 ^c	12.20 \pm 0.17 ^c
甘氨酸 Gly	3.93 \pm 0.10	3.96 \pm 0.07	4.00 \pm 0.08	3.88 \pm 0.02	3.86 \pm 0.03	4.02 \pm 0.02
丙氨酸 Ala	4.82 \pm 0.15	4.83 \pm 0.09	4.89 \pm 0.10	4.82 \pm 0.16	5.07 \pm 0.12	4.92 \pm 0.14
半胱氨酸 Cys	2.72 \pm 0.18	2.71 \pm 0.19	2.73 \pm 0.06	2.71 \pm 0.07	2.62 \pm 0.04	2.81 \pm 0.07
天冬氨酸 Asp	8.07 \pm 0.17 ^a	8.11 \pm 0.20 ^{ab}	8.26 \pm 0.19 ^{abc}	8.29 \pm 0.10 ^{abc}	8.44 \pm 0.06 ^c	8.40 \pm 0.16 ^{bc}
总非必需氨基酸 Σ NEAA	40.88 \pm 1.16 ^a	41.19 \pm 0.54 ^a	41.77 \pm 0.80 ^{ab}	41.67 \pm 0.31 ^{ab}	42.45 \pm 0.45 ^b	42.17 \pm 0.41 ^b
总氨基酸 Σ AA	76.39 \pm 1.57 ^a	76.37 \pm 1.14 ^a	77.63 \pm 1.04 ^{ab}	77.91 \pm 0.56 ^b	78.39 \pm 0.02 ^b	77.44 \pm 0.49 ^{ab}

表 7 饲料精氨酸对许氏平鲉幼鱼血清生化指标的影响(n=6, 平均值±标准差)

Tab.7 Effects of dietary arginine on serum biochemical parameters of juvenile *S. schlegelii* (n=6, Mean±SD)

血清生化指标 Serum biochemical parameters	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	16.42±0.30 ^d	15.13±0.60 ^{cd}	8.13±0.81 ^a	12.15±0.48 ^b	14.51±0.45 ^c	15.92±0.40 ^d
谷草转氨酶 AST/(U/L)	10.91±0.10	12.25±1.10	12.07±1.10	11.22±0.85	12.24±0.45	11.80±1.19
白蛋白 Alb/(g/L)	10.20±0.73 ^a	11.58±1.05 ^b	13.92±0.81 ^c	10.62±0.92 ^{ab}	10.43±0.88 ^{ab}	10.28±0.88 ^a
一氧化氮 NO/(μmol/L)	4.82±0.42 ^a	14.45±0.21 ^c	18.83±0.62 ^d	19.26±0.62 ^d	13.68±0.24 ^c	7.88±0.42 ^b
尿素氮 BUN/(mmol/L)	4.22±0.43 ^a	4.98±0.21 ^{ab}	5.29±0.26 ^{bc}	5.29±0.54 ^{bc}	5.53±0.13 ^{bc}	6.06±0.77 ^c

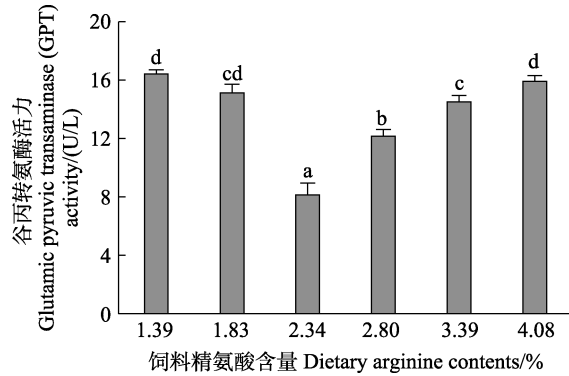


图 2 血清谷丙转氨酶活力

Fig.2 Activities of glutamic pyruvic transaminase (ALT) in serum

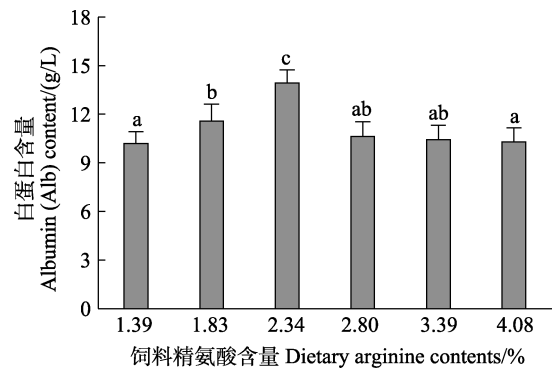


图 3 血清白蛋白含量

Fig.3 Contents of albumin (Alb) in serum

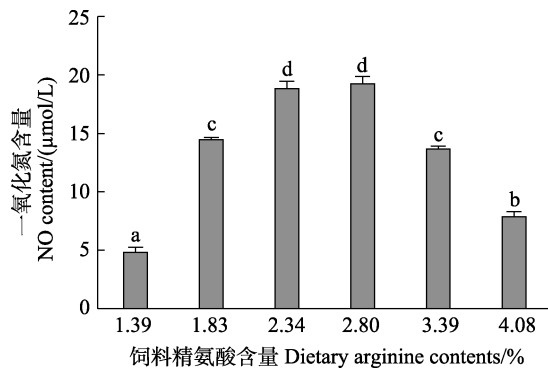


图 4 血清一氧化氮含量

Fig.4 Contents of NO in serum

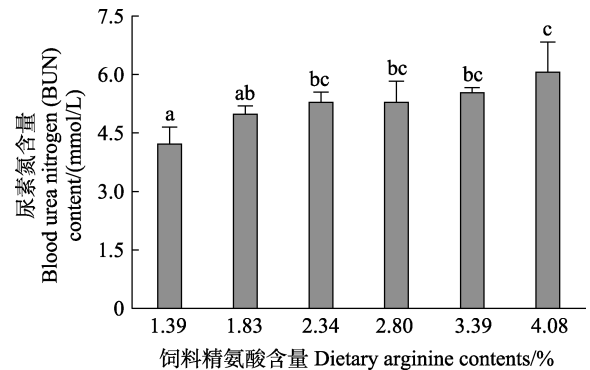


图 5 血清尿素氮含量

Fig.5 Contents of blood urea nitrogen (BUN) in serum

表 8 饲料精氨酸对许氏平鲉幼鱼肝脏相关酶活力的影响(n=6, 平均值±标准差)

Tab.8 Effects of dietary arginine on liver enzyme activities of juvenile *S. schlegelii* (n=6, Mean±SD)

肝脏酶活力 Liver enzyme activities	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	3756.61±61.38 ^a	4503.34±79.20 ^b	5602.27±64.45 ^d	5395.70±64.45 ^d	5034.56±84.57 ^c	4924.36±94.83 ^c
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.91±0.02 ^c	0.46±0.02 ^a	0.42±0.02 ^a	0.46±0.01 ^a	0.55±0.03 ^b	0.59±0.02 ^b
溶菌酶 LZM/(U/mg prot)	45.20±1.91 ^{ab}	48.58±3.84 ^b	78.75±2.39 ^d	62.22±0.63 ^c	60.35±0.63 ^c	40.50±0.07 ^a
谷丙转氨酶 ALT/(U/g prot)	68.63±2.04	67.68±3.21	67.11±2.16	67.01±2.34	69.06±2.13	69.80±2.47
谷草转氨酶 AST/(U/g prot)	144.96±5.69 ^b	144.80±5.62 ^b	156.20±7.28 ^c	110.31±2.31 ^a	110.09±3.90 ^a	113.09±5.27 ^a
总抗氧化酶 T-AOC (nmol/L/mg prot)	0.81±0.05 ^a	0.87±0.53 ^{abc}	1.02±0.05 ^d	0.98±0.03 ^{cd}	0.96±0.03 ^{bcd}	0.84±0.06 ^{ab}
碱性磷酸酶 AKP (U/g prot)	14.49±0.98 ^a	20.55±0.63 ^b	29.64±1.74 ^c	22.77±0.83 ^b	14.71±1.10 ^a	14.30±1.13 ^a
酸性磷酸酶 ACP (U/g prot)	200.01±10.15	196.41±8.33	203.65±9.68	209.89±13.49	209.37±9.70	195.08±6.02
总一氧化氮合酶 TNOS (U/mg prot)	1.39±0.03 ^{bc}	1.45±0.03 ^{bc}	1.48±0.08 ^c	1.38±0.03 ^{bc}	1.30±0.16 ^{ab}	1.19±0.02 ^a
诱导型一氧化氮合酶 iNOS (U/mg prot)	1.10±0.01 ^b	1.09±0.02 ^b	1.14±0.01 ^b	1.24±0.03 ^c	1.16±0.11 ^{bc}	0.74±0.03 ^a

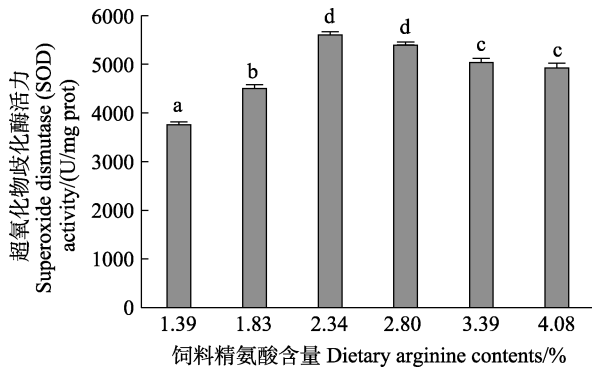


图6 肝脏超氧化物歧化酶活力

Fig.6 Activities of superoxide dismutase (SOD) in liver

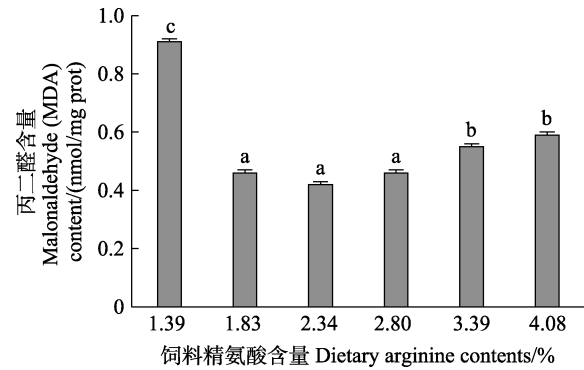


图7 肝脏丙二醛含量

Fig.7 Contents of malonaldehyde (MDA) in liver

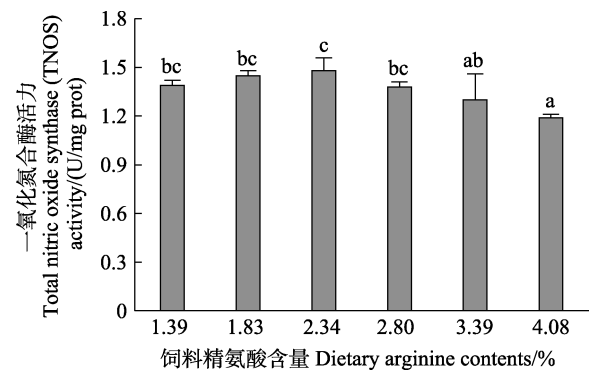


图8 肝脏一氧化氮合酶活力

Fig.8 Activities of total nitric oxide synthase (TNOS) in liver

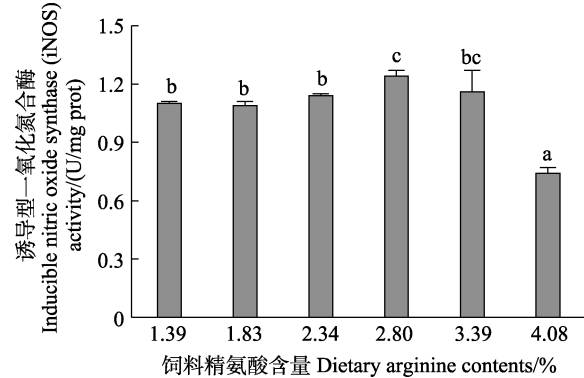


图9 肝脏诱导型一氧化氮合酶活力

Fig.9 Activities of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in liver

D1、D5 和 D6 组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼生长性能和饲料利用的影响

精氨酸作为鱼类生长所必需的一种氨基酸,直接参与了鱼体蛋白质合成和鸟氨酸循环,促进了机体生长及蛋白质沉积(Wilson, 1986)。本研究中,各组存活率无显著差异,低精氨酸组未出现因精氨酸缺乏而产生的病理症状。随着饲料中精氨酸含量增加至适宜水平,许氏平鲈幼鱼的增重率和蛋白沉积率显著提高,精氨酸含量继续增加又使其部分生长指标产生下降趋势。表明过低或过高含量的精氨酸均对许氏平鲈幼鱼生长性能、饲料利用和蛋白沉积产生不利影响。研究发现,饲料中精氨酸的缺乏会导致海鲈(*Dicentrarchus labrax*)和牙鲆的增重率和蛋白质保留率处于较低水平,随着精氨酸含量增加至适宜水平,增重率和蛋白保留率均显著增加(Tibaldi *et al.*, 1994; Alam *et al.*, 2002); 饲料精氨酸过量时,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、遮目鱼、斜带石斑鱼(*Epinephelu scoioides*)

增重率和饲料利用率均受到抑制(Borlongan, 1990; Fournier *et al.*, 2003; 韩凤禄等, 2016)。Walton 等(1986)研究认为,饲料中精氨酸过量引起鱼类生长减缓原因可能是鱼类需要消耗额外的能量用于脱氨基和排氨,从而导致毒害作用和增加鱼类生存压力。精氨酸和赖氨酸同为碱性氨基酸,目前,精氨酸-赖氨酸之间的拮抗作用也被部分学者认为是高精氨酸水平下鱼类生长缓慢的一个重要因素。精氨酸-赖氨酸的拮抗作用在哺乳动物和鸟类中普遍存在,但在鱼类研究中尚无定论(万军利等, 2006)。高精氨酸水平对牙鲆、斑点叉尾鲷和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)的增重率均无显著影响。精氨酸-赖氨酸拮抗现象可能出现在氨基酸的消化、吸收阶段,也可能出现在吸收后的代谢阶段。此外,过低或过高的精氨酸造成了氨基酸的不平衡,影响鱼类对蛋白源的有效利用,使蛋白质的合成受阻,冗余的氨基酸经脱氨基作用,含氮部分以尿素、氨等形式排出体外,不含氮的部分分解成水和 CO_2 ,释放能量。

本实验条件下,以增重率为评价指标,许氏平鲈幼鱼对精氨酸的最适需求量为 2.78%饲料(5.56%饲料蛋白)。这一结果与斜带石斑鱼(6.07%饲料蛋白)、卵

形鲳鲆(6.32%~6.35%饲料蛋白)和牙鲆(6.25%饲料蛋白)的研究结果相近(Lin *et al*, 2015; 韩凤禄等, 2016; Han *et al*, 2013), 高于真鲷(*Pagrus major*)(4.74%饲料蛋白)、遮目鱼(5.25%饲料蛋白)、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)(4.90%饲料蛋白)(Klein, 1970; Fournier *et al*, 2003; Rahimnejad *et al*, 2014), 低于黑鲷(*Sparus macrocephalus*)(7.74%饲料蛋白)、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)(6.5%饲料蛋白)(Zhou *et al*, 2010、2012)。不同鱼种对精氨酸的需求量存在差异可能与鱼种、饲料蛋白源、饲料蛋白水平、实验环境、饲养方式和评估标准等有关。

3.2 饲料精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼体成分的影响

本研究中, 饲料精氨酸水平对全鱼粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和水分无显著影响。与斜带石斑鱼, 大口黑鲈(周恒永, 2011)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(张庆功, 2019)的研究结果一致。随着饲料精氨酸含量的增加, 实验鱼肌肉粗蛋白含量先升高后降低, 与吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(武文一, 2016)的研究结果一致。精氨酸提高肌肉蛋白质含量的原因可能是由于精氨酸代谢产生的谷氨酰胺和 NO 可激活肌肉中雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号途径, mTOR 激活后会促进磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶(p70s6 激酶)和真核生物启动子 4E-结合蛋白 1(eIF4E-BP1)磷酸化, 形成用于多肽合成的激活启动复合物, 促进蛋白质合成(Pervin *et al*, 2007)。韩凤禄等(2016)研究发现, 随着饲料精氨酸含量的增加, 斜带石斑鱼幼鱼肌肉粗蛋白和粗灰分含量先升高后趋于平缓, 粗脂肪含量呈下降趋势。产生差异的原因可能与饲料原料组成和鱼种不同有关。研究证实, 随着饲料精氨酸含量的升高, 全鱼蛋白质的合成效率和沉积率也会显著提高, 在精氨酸添加量超过其最适需求量之后, 蛋白质合成效率和沉积率会显著下降, 这是因为过量的精氨酸导致其他氨基酸的降解加快, 而降低蛋白质合成和沉积, 但在军曹鱼(*Rachycentron canadum*)中发现, 当饲料精氨酸含量超过其最适需求量, 蛋白质合成和沉积未受到显著影响(赵红霞等, 2007), 这可能是鱼种及其规格不同导致的差异。

鱼体对于蛋白质的沉积是通过外源氨基酸的供给来合成的(张庆功等, 2019)。研究发现, 黑鲷和大口黑鲈肌肉必需氨基酸含量随着饲料精氨酸摄入的增多而上升(Zhou *et al*, 2010; 周恒永, 2011)。本研究中, 许氏平鲈幼鱼全鱼和肌肉的必需氨基酸含量随着饲料精氨酸含量的增加先升高后降低。当精氨酸达到其最适需求量时, 饲料中各氨基酸含量达到平衡, 此

时, 鱼体吸收的氨基酸以最大的效率进行机体蛋白的合成。摄入精氨酸过量后, 氨基酸平衡被打破, 多余的氨基酸被氧化分解, 同时耗能, 使得全鱼和肌肉的必需氨基酸含量下降。这种趋势与增重率和蛋白质效率一致。

3.3 饲料精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼血清生化指标的影响

鱼类的血清生化指标在一定程度上反映了鱼体的生理和健康状况(魏佳丽等, 2016)。在硬骨鱼类中, 尿素的产生主要来源于蛋白质或氨基酸的分解代谢。血清尿素氮是氨基酸代谢的重要产物, 可准确的反映鱼体内蛋白质代谢和氨基酸代谢的平衡状况。研究发现, 牙鲆血清尿素氮含量随饲料中精氨酸含量的上升而显著上升并趋于稳定(Alam *et al*, 2002), 虹鳟和大菱鲆血清尿素氮的浓度和机体摄入的精氨酸水平也存在正相关关系(Fournier *et al*, 2003)。本研究中, 低精氨酸水平下, 血清尿素氮含量偏低, 随着饲料精氨酸含量的增加, 血清尿素氮含量显著增加, 表明随着精氨酸水平上升至其最适需求量, 氨基酸达到平衡状态, 精氨酸在鸟氨酸循环中的作用增强, 蛋白质代谢最旺盛, 代谢产物尿素氮含量显著上升, 当精氨酸添加量高于最适需求量时, 氨基酸平衡被打破, 限制了其他氨基酸的有效利用, 多余的氨基酸经脱羧和转氨作用被当作能量消耗掉, 从而造成了蛋白质利用率的下落和氮排泄增加等生理现象。谷草转氨酶和谷丙转氨酶的联合脱氨基作用是肝脏氨基酸代谢的主要途径, 在健康动物的血清中含量很少, 当动物受到生理或病理刺激, 肝细胞膜的通透性会发生改变, 使肝脏中的谷草转氨酶和谷丙转氨酶释放到血清中。本研究中, 血清谷丙转氨酶活力随饲料精氨酸含量的增加先降低后升高, 与欧洲鲈和黑鲷的研究结果一致(Peres *et al*, 2007; Zhou *et al*, 2010)。但在卵形鲳鲆的研究中发现, 饲料精氨酸水平对血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力无显著性影响(谭小红, 2015)。除去鱼种差异, 一些研究认为鱼类血清生化指标的变化更多的是应激反应等造成的。NO 是一种近年来新发现的重要的免疫调节因子, 在体内具有调节 T 淋巴细胞增殖以及抗体免疫应答反应的作用。精氨酸作为 NO 合成的前体物质, 经 NO 合酶合成 NO, 使得精氨酸在免疫调节方面具有一定的功能。Buentello 等(1999)研究发现, 在斑点叉尾鲷腹腔注射脂多糖(LPS)后, 腹腔巨噬细胞 NO 的产生可随饲料精氨酸含量的增加而增多。在塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)饲料中添加

0.8%、1.5%精氨酸时,正常养殖条件下,头肾 NO 含量分别提高 25.0%和 55.6%,应激条件下分别提高 100%和 245%,表明精氨酸可促进鱼体组织 NO 的产生(Costas *et al.*, 2013)。Wang 等(2015)发现,饲料中添加 1.41%精氨酸后提高了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鳃组织 Nrf2 mRNA 的丰度,组织 Nrf2 基因表达,可促进抗氧化酶合成,提高组织抗氧化能力。本研究中,血清 NO 含量随着饲料精氨酸水平的上升而显著增加,与吉富罗非鱼和红鳍东方鲀的研究结果一致(武文一, 2016; 张庆功, 2019)。

3.4 饲料精氨酸水平对许氏平鲈幼鱼肝脏相关酶活力的影响

溶菌酶是重要的抗菌物质,能溶解细菌细胞壁,破坏细菌肽聚糖支架,激活补体旁路和吞噬细胞活性,参与非特异性免疫防御,常用来作为鱼类非特异性免疫能力的评价指标(Zhu *et al.*, 2013)。不同种类鱼其适宜的精氨酸需求量存在差异,过高水平的精氨酸会降低鱼类血清中溶菌酶活力(Chen *et al.*, 2015)。本研究中,肝脏溶菌酶活力受到精氨酸水平的显著影响,呈现先升高后降低的趋势,与卵形鲳鲹和大口黑鲈的研究结果相同(周恒永, 2011; 谭小红, 2015),表明适量的精氨酸可显著提高鱼类的非特异性免疫能力。关于精氨酸影响溶菌酶活力的机制已有相关报道,但精氨酸调控溶菌酶基因表达的机制有待研究。

超氧化物歧化酶活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,丙二醛是脂肪的氧化产物,其含量的高低能间接反映肌体细胞的氧化损伤程度(Wen *et al.*, 2014)。本研究中,肝脏超氧化物歧化酶活力随着饲料精氨酸水平的增加先升高后降低,与红鳍东方鲀和斑点叉尾鲴的研究结果相同(张庆功, 2019; Buentello *et al.*, 1999)。但谭小红(2015)研究发现,饲料精氨酸含量对卵形鲳鲹的血清和肝脏中总超氧化物歧化酶活力无显著影响。研究结果的差异可能是实验鱼种类和实验条件等不同造成。本研究中,肝脏丙二醛含量受精氨酸水平的显著影响,呈先降低后升高的趋势,与吉富罗非鱼的研究结果一致(武文一, 2016)。超氧化物歧化酶和丙二醛的结果相互验证,表明精氨酸可通过增加抗氧化酶活力从而减少自由基氧化对机体的损伤,增强机体抗氧化能力。

4 结论

饲料中适宜含量的精氨酸能显著提升许氏平鲈幼鱼的生长性能,提高蛋白质沉积,降低饲料系数,

增强氨基酸代谢及非特异性免疫能力。以增重率为评价指标,许氏平鲈幼鱼[(12.03±0.03)g]精氨酸的适宜需求量为 2.78%(占 5.56%饲料粗蛋白)。

参 考 文 献

- ALAM M S, TESHIMA S I, KOSHIO S, *et al.* Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture*, 2002, 205(1/2): 127–140
- BORLONGAN I G. Arginine and threonine requirements of juveniles milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Aquaculture*, 1990, 93(4): 313–322
- BUENTELLO J A, GATLIN III D M. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture*, 1999, 179: 513–521
- CHEN G F, LIU Y, JIANG J, *et al.* Effect of dietary arginine on the immune response and gene expression in head kidney and spleen following infection of Jian carp with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 195–202
- COSTAS B, REGO P C N P, CONCEICA L E C, *et al.* Dietary arginine supplementation decreases plasma cortisol levels and modulates immune mechanisms in chronically stressed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(s1): 25–38
- FOURNIER V, GOUILLOU-COUSTANS M F, MÉTAILLER R, *et al.* Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilisation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture*, 2003, 217(1/2/3/4): 559–576
- HAN F L, ZHANG Q, HUANG G Q, *et al.* Requirement of dietary arginine for juvenile orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 584–593 [韩凤禄, 张琴, 黄国强, 等. 斜带石斑鱼幼鱼的饲料精氨酸需求量. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 584–593]
- HAN Y Z, KOSHIO S, ISHIKAWA M, *et al.* Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. *Aquaculture*, 2013, 414/415(15): 173–182
- KIM K W, WANG X J, BAI S C. Reevaluation of the optimum dietary protein level for the maximum growth of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 2001, 32: 119–125
- KLEIN R G, HALVER J E. Nutrition of salmonoid fishes: arginine and histidine requirements of chinook and coho salmon. *The Journal of Nutrition*, 1970, 100(9): 1105–1110
- LEE S M, JEON I G, LEE J Y. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes*

- schlegeli*). *Aquaculture*, 2002, 211: 227–239
- LIAO Y J, LIU B, REN M C, *et al.* Effects of dietary arginine level on growth performance, free essential amino acids, hematological characteristics, and immune response in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 549–559 [廖英杰, 刘波, 任鸣春, 等. 精氨酸对团头鲂幼鱼生长、血清游离精氨酸和赖氨酸、血液生化及免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 549–559]
- LIN H Z, TIAN X H, ZHOU C P, *et al.* Effect of dietary arginine levels on the growth performance, feed utilization, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 2015, 437: 382–389
- LUO Z, LIU Y J, MAI K S, *et al.* Advance in researches on arginine requirement for fish: A review. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(4): 450–459
- LUZZANA U, HARDY R W, HALVER J E. Dietary arginine requirement of fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 1998, 163(1): 137–150
- PERES H, OLIVA-TELES A. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 2007, 267(1/2/3/4): 119–128
- PERVIN S, SINGH R, HERNANDEZ E, *et al.* Nitric oxide in physiological concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: Involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Research*, 2007, 67(1): 289–299
- RAHIMNEJAD S, LEE K J. Dietary arginine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 2014, 434: 418–424
- REN H, ZHAN X A. Research progress on amino acid nutrition of aquatic animals. *Feed Research*, 2006(2): 41–43 [任和, 占秀安. 水产动物氨基酸营养研究进展. *饲料研究*, 2006(2): 41–43]
- TAN X H. Assessment of arginine and leucine requirement for juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 19–23 [谭小红. 卵形鲳鲹幼鱼对饲料中精氨酸和亮氨酸需求量的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 19–23]
- TIBALDI E, TULLI F, LANARI D. Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 1994, 127: 207–218
- WALTON M J, COWEY C B, Coloso R M. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1986(2): 161–169
- WAN L J, MAI K S, AI Q H, *et al.* The recent advance on arginine nutritional physiology in fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 679–685 [万军利, 麦康森, 艾庆辉, 等. 鱼类精氨酸营养生理研究进展. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 679–685]
- WANG B, FENG L, JIANG W D, *et al.* Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 125–137
- WEI J L, WANG J Y, SONG Z D, *et al.* Effects of the partial substitute for fish meal by hydrolyzed krill meal on growth performance, the body composition and the serum biochemical parameters of juvenile pearl gentian grouper. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 100–110 [魏佳丽, 王际英, 宋志东, 等. 酶解磷虾粉替代鱼粉对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、体组成及血清生化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 100–110]
- WEN H L, FENG L, JIANG W D, *et al.* Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 275–287
- WILSON R P. Protein and amino acid requirements of fishes. *Annual Review of Nutrition*, 1986, 6(1): 225–244
- WU W Y. Studies on the requirements of arginine, phenylalanine and valine in the diet to GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 21–26 [武文一. 吉富罗非鱼对饲料精氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸的需要量研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 21–26]
- YAN Q G, XIE S Q, LEI W, *et al.* Quantitative dietary lysine requirement for juvenile *Sebastes schlegeli*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 459–465 [严全根, 解绶启, 雷武, 等. 许氏平鲈幼鱼的赖氨酸需求量. *水生生物学报*, 2006, 30(4): 459–465]
- YAN Q G, XIE S Q, ZHU X. Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(3): 163–169
- ZHANG Q G, LIANG M Q, XU H G, *et al.* Dietary methionine requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 1–10 [张庆功, 梁萌青, 徐后国, 等. 红鳍东方鲀幼鱼对饲料中蛋氨酸需求的研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 1–10]
- ZHANG Q G. Studies on nutritional physiology of lysine, methionine and arginine for juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019, 53–58 [张庆功. 红鳍东方鲀幼鱼赖氨酸、蛋氨酸、精氨酸营养生理研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019, 53–58]
- ZHAO H X, CAO J M, WU J K, *et al.* Studies of arginine requirement for juvenile cobia. *Journal of South China Agricultural University*, 2007, 28(4): 87–90 [赵红霞, 曹俊明, 吴建开, 等. 军曹鱼幼鱼对饲料中精氨酸的需要量. *华南农业大学学报*, 2007, 28(4): 87–90]
- ZHOU F, XIONG W, XIAO J X, *et al.* Optimum arginine requirement of juvenile black sea bream, *Sparus*

- macrocephalus*. *Aquaculture Research*, 2010, 41(10): 418–430
- ZHOU H Y. Assessment of arginine requirement for largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2010, 40–43 [周恒永. 大口黑鲈对饲料中精氨酸需求量的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 40–43]
- ZHOU Q C, ZENG W P, Wang H L, *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile yellow grouper *Epinephelus awoara*. *Aquaculture*, 2012, 350–353: 175–182
- ZHU L Y, LI N, ZHU G, *et al.* Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(1/2): 39–62
- ZHU L, SUI F M. Biology and artificial culture of *Sebastes schlegelii* (Hilgendorf). *Modern Fisheries Information*, 1999, 14(4): 21–25 [朱龙, 隋风美. 许氏平鲈的生物学特征及其人工养殖. 现代渔业信息, 1999, 14(4): 21–25]

(编辑 陈 辉)

Dietary Arginine Requirement of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegelii*)

SHEN Yubo^{1,2}, WANG Jiying^{2①}, LI Baoshan², LIU Caili^{1,2}, WANG Xiaoyan²,
HUANG Bingshan², WANG Shixin², SUN Yongzhi²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai, Shandong 264006, China)

Abstract An eight week experiment was conducted to investigate the effects of dietary arginine on the growth performance, body composition, serum biochemical parameters, and liver enzyme activities of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) and to determine the dietary arginine requirement. Six isonitrogenous and isolipidic diets were formulated to contain graded dietary arginine (1.5%, 1.0%, 2.0%, 2.5%, 3.5%, and 4.5% dry diet). The crystalline amino acid mixture was supplemented in the test diets to simulate the amino acid profile of the juvenile *S. schlegelii* muscle protein, except for arginine. The initial average body weight of the juvenile *S. schlegelii* was (12.03±0.03) g. The results showed that, with increasing dietary arginine, the weight gain rate (WGR), specific growth rate, and protein efficiency ratio significantly increased at first and then decreased; these were significantly higher in the 2.34% and 2.80% arginine diets than the 1.39% arginine diet, but the feed conversion ratio showed the opposite trend. The crude protein content of the muscle was significantly affected by dietary arginine levels and was significantly higher in the 2.34% arginine diet than the other groups. The concentrations of both total essential amino acids and total amino acids first increased and then decreased in the whole fish and muscle tissues. The levels of albumin and nitrogen oxide in the serum significantly increased first and then decreased ($P<0.05$), whereas the serum blood urea nitrogen content first increased and then plateaued. However, the glutamic pyruvic transaminase in the serum significantly decreased at first and then increased, and was significantly lower in the 2.34% arginine diet than in other groups. The activities of superoxide dismutase, lysozyme, aspartate aminotransferase, total antioxidant enzymes, alkaline phosphatase, total nitric oxide synthase, and inducible nitric oxide synthase in the liver first significantly increased and then decreased, whereas the content of malonaldehyde first significantly decreased and then increased. With WGR as an evaluation index, the optimal arginine requirement of juvenile *S. schlegelii* was 2.78% (5.56% dietary protein).

Key words Juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*); Arginine; Requirement; Growth

① Corresponding author: WANG Jiying, E-mail: ytwjy@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210326001

http://www.yykyxjz.cn/

李玉萍, 田晶晶, 张凯, 夏耘, 王广军, 郁二蒙, 李志斐, 龚望宝, 谢骏. 皇竹草粉对草鱼幼鱼生长、抗氧化反应和肠道健康的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 45-55

LI Y P, TIAN J J, ZHANG K, XIA Y, WANG G J, YU E M, LI Z F, GONG W B, XIE J. Effects of *Pennisetum sinense* Roxb meal on growth, antioxidant response, and intestinal health of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 45-55

皇竹草粉对草鱼幼鱼生长、抗氧化反应 和肠道健康的影响*



李玉萍^{1,2} 田晶晶² 张 凯² 夏 耘² 王广军² 郁二蒙²
李志斐² 龚望宝² 谢 骏^{2①}

(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
农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 广东 广州 510380)

摘要 为评估皇竹草(*Pennisetum sinense* Roxb)粉对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)幼鱼生长、抗氧化和肠道健康的影响, 配制 3 组分别含 0% (对照组 C)、10%和 20%皇竹草粉(P1 和 P2)的等氮等能半精制饲料(蛋白质水平为 36%, 脂肪水平为 9%), 饲喂草鱼稚鱼[(28.51±0.04) g] 56 d。结果显示, 相比 C 组, P1 和 P2 组显著提高了草鱼幼鱼的增重率和成活率($P<0.05$); P2 组草鱼血清丙二醛(MDA)含量比 C 组草鱼显著降低($P<0.05$); P1 和 P2 组草鱼血清中谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性比 C 组草鱼显著降低($P<0.05$); P1 和 P2 组的草鱼血清中补体 C3 和 C4 的含量显著提高($P<0.05$); 同时, 这 2 组肝脏的 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶(HOAD)和细胞色素 C 氧化酶(COX)的活性也显著高于 C 组($P<0.05$); 肠道显微结构显示, P1 和 P2 组显著提高了草鱼幼鱼肠道的绒毛高度和皱褶深度, 降低了肌层厚度($P<0.05$); 基因表达层面, 相比 C 组, P1 和 P2 组下调了肠道促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α (*tnf- α*)和白细胞介素 1 β (*il-1 β*)的基因相对表达量。综上所述, 饲料中添加一定量的皇竹草粉能增强草鱼幼鱼的生长, 降低体内氧化应激和肠道炎症。

关键词 草鱼; 皇竹草; 生长性能; 肠道发育; 肠炎

中图分类号 S963.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0045-11

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为中国“四大家鱼”之一, 广泛分布于我国淡水水域, 具有生长快、饲料成本低、蛋白利用率高等优点(马贵华等, 2008)。草鱼是我国养殖产量最大的淡水鱼类, 据《2020 中国

渔业统计年鉴》统计, 2019 年, 我国草鱼总产量为 553.30 万 t, 占养殖淡水鱼总产量的 21% (于秀娟等, 2020)。随着养殖产业化和集约化的快速发展, 养殖草鱼因饲料的不均衡等因素的影响导致鱼体免疫力

* 中国水产科学研究院珠江水产研究所基本科研业务费(2018SJ-YB02)、大宗淡水鱼产业技术体系专项(CARS-45-21)、广东省自然科学基金(2018A030313412)和 2019 广东省科技专项资金(2019B020204)共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018SJ-YB02), the Modern Agroindustry Technology Research System (CARS-45-21), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313412), and Science and Technology Special Fund of Guangdong Province (2019B020204)]. 李玉萍, E-mail: yupingli666@163.com

① 通讯作者: 谢 骏, 研究员, E-mail: xiejunhy01@126.com

收稿日期: 2021-03-26, 收修改稿日期: 2021-05-07

下降,在应激状态下易爆发一系列的疾病,包括草鱼出血病、肠炎、烂鳃和赤皮病等,对养殖生产造成严重的影响(陈继楚等,2020)。鉴于国家对抗生素等药物滥用的控制,通过绿色饲料学途径提高草鱼机体抗病力是未来养殖产业发展的重要方向。

在自然环境中,草鱼生长到特定规格(5.5 cm左右)后就以各种草类作为食物的主要来源(He *et al.*, 2015)。从进化的角度来看,青草类饲料应该是最符合草鱼营养需求且有益于草鱼机体健康的食物来源。然而,当前商用草鱼配合饲料中几乎不添加青草类饲料原料(叶元土等,2013)。有研究表明,传统养殖模式中采用青饲料与配合饲料搭配投喂草鱼,显示出促草鱼生长、提高草鱼成活率、增加养殖经济效益等特点(张耀武等,2007;段小明等,2008;朱庆红等,2009;李建光等,2012)。在其他鱼类中,如饲料中添加大蒜(*Allium sativum* L.)茎粉和牛至(*Origanum vulgare* L.)草粉能提高鳊鲤(*Cyprinus carpio*)血清溶菌酶活性、C3和C4活性等非特异免疫性能(徐奇友等,2010),基础饲料中添加7.5%杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver)叶粉能显著促进青鱼鱼种的生长性能,并提高免疫球蛋白M、补体C3等非特异免疫基因的表达(许友卿等,2015)。这些结果提示,饲料中添加青草类饲料不仅有益于草食性鱼类,且对杂食性和肉食性鱼类免疫力的提升都有正面效果。推测与人摄食有益于健康的膳食纤维类似(刘劫等,2020)。由此,在鱼饲料制作的过程中,应考虑青草类饲料的添加。另一方面,随着养殖产业的发展以及饲料用粮食的贸易风险,发展含青草类的草鱼饲料也是当前饲料产业的一个重要选择。然而,鉴于青草分为很多种类,产量、营养成分及饲料制作工艺也存在差异,很难判断哪种青草类饲料有益于鱼体健康并适用于鱼饲料中,因此,大量相关的评估工作亟待展开。

皇竹草(*Pennisetum sinense* Roxb)为多年生禾本科植物,由象草(*Pennisetum purpureum*)和美洲狼尾草(*Pennisetum americanum*×*P. purpure*)杂交选育而成,属四碳植物(夏先玖,1999),具有产量高、竞争力强、易栽易管、生长快、抗逆性强和营养丰富等特点,广泛分布于热带与亚热带,在广东、广西、海南等地区产量较高(古辉辉等,2019)。由于皇竹草叶质柔软,茎叶脆嫩多汁,适口性好,可用作多种动物(猪、牛、鸡、鹅、鱼等)的饲料,表现出较高的饲料利用率(于凌云等,2013),是一种新型高效经济作物,被誉为“牧草之王”(唐式校等,2006)。研究表明,皇竹草含19种氨基酸,其中,赖氨酸、矿物质和维生素等的含量较高,可以满足鱼类生长发育的需要(丁翠华,

2008;吴斌等,2018)。杨明富(2003)指出,不论是鲜草,还是青贮或风干加工成草粉,皇竹草都是饲养各种草食性鱼类的好饲料。本团队前期发现,单纯投喂皇竹草的草鱼具有出肉率高、体型好等优点(毛东东等,2018)。在广东,已经有企业将皇竹草制成草粉在鱼饲料中添加,然而,皇竹草粉对草鱼的健康影响如何,目前还不明确。为此,本研究以草鱼幼鱼为研究对象,在半精制饲料的基础上评估皇竹草粉对草鱼的生长及健康的影响,重点关注抗氧化与肠道健康相关指标,为皇竹草粉作为水产类饲料原料的应用提供理论依据和基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验用皇竹草粉购自广东省江门市鹤山广佛饲料厂。参考Lovell(1989)中的饲料配方,以酪蛋白和明胶为蛋白源,鱼油和大豆油为脂肪源,设置3组蛋白质水平为33%、脂肪水平为9%的等氮等能半精制饲料。对照组(C)不做处理,处理组分别添加10%和20%皇竹草粉(P1和P2),每组添加0.1%二丁基羟基甲苯作为抗氧化剂(表1)。饲料制备前先将饲料原料粉碎,过60目筛。按比例准确称取饲料原料,按照含量从小到大的原则逐级混合,然后再将脂肪源和水分别混入,搓匀。将混合均匀的原料用饲料制粒机挤压成2.0 mm粒径的颗粒饲料,在阴凉处风干后放在-20℃储存备用。

1.2 饲养与管理

实验用鱼购自广东佛山市南海通威水产科技有限公司,养殖实验在中国水产科学研究院珠江水产研究所养殖基地进行。实验鱼先放于4.5 m×4.5 m×1.1 m的水泥池中暂养14 d,以对照组饲料对草鱼进行驯食。暂养结束后,挑选规格均一、体格健壮的草鱼198尾[(28.51±0.04) g]分配到9个养殖缸(1.2 m×0.6 m×0.5 m)中,每个养殖鱼缸22尾。每组饲料随机投喂3个养殖缸,实验周期为56 d,每天08:30和16:30各投喂1次。养殖期间,饲喂采用饱食投喂,每天记录进食量、水温、天气和死亡情况,期间水体pH为6.5~7.8,溶氧量(DO)为5.7~7.6 mg/L,氨氮浓度≤0.20 mg/L,水温为28.0℃~33.0℃。

1.3 采样与处理

养殖结束后停食24 h,对所有鱼进行采样。采样前先用MS222麻醉,进而测量体重和体长。

表 1 实验饲料组成及成分
Tab.1 Formulation and chemical composition of the experimental diets

项目 Items	组别 Groups		
	C	P1	P2
酪蛋白 Casein	320	308	300
明胶 Gelatin	80	77	75
糊精 Dextrin	280	280	280
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	189	106	18
皇竹草粉 Grass meal	0	100	200
鱼油 Fish oil	40	40	40
大豆油 Soybean oil	40	38	36
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose	30	30	30
二丁基羟基甲苯 Butylated hydroxytoluene ¹	1	1	1
混合维生素无机物 Mixed vitamin inorganics ²	20	20	20
总计 Total	1000	1000	1000
常规组分 Conventional components			
水分 Moisture/%	9.10	9.30	9.70
粗蛋白 Crude protein/(% (N×6.25))	33.09	33.50	33.98
粗脂肪 Crude fat/%	9.40	9.40	9.20
粗灰分 Ash/%	1.90	2.80	3.70
粗纤维 Fiber/%	18.90	12.45	5.50

注: 1: 二丁基羟基甲苯: 简称 BHT, 抗氧化剂; 2: 混合维生素无机物: 硫酸铝钾 1.59 g/kg, 碳酸钙 181.01 g/kg, 磷酸二氢钙 116.01 g/kg, 氯化钴 0.7 g/kg, 硫酸镁 52.16 g/kg, 硫酸锰 0.07 g/kg, 氯化钾 165.53 g/kg, 碘化钾 0.14 g/kg, 碳酸锌 1.92 g/kg, 磷酸二氢钠 136.05 g/kg, 硒酸钠 0.06 g/kg, 硫酸铜 0.75 g/kg, 柠檬酸铁 13.38 g/kg; 硫胺素 50 mg/kg, 核黄素 50 mg/kg, 维生素 A 25 000 IU/kg, 维生素 E 400 IU/kg, 维生素 D₃ 24 000 IU/kg, 甲萘醌 40 mg/kg, 盐酸吡哆醇 40 mg/kg, 氰钴胺 0.1 mg/kg, 生物素 6 mg/kg, 泛酸钙 100 mg/kg, 叶酸 15 mg/kg, 烟酸 200 mg/kg, 肌醇 2000 mg/kg

Note: 1: Dibutyl hydroxytoluene: BHT for short, antioxidant; 2: Mixed vitamin inorganics: Aluminium potassium sulfate 1.59 g/kg, calcium carbonate 181.01 g/kg, calcium dihydrogen phosphate 116.01 g/kg, cobalt chloride 0.7 g/kg, magnesium sulfate 52.16 g/kg, manganese sulfate 0.07 g/kg, potassium chloride 165.53 g/kg, potassium iodide 0.14 g/kg, zinc carbonate 1.92 g/kg, sodium dihydrogen phosphate 136.05 g/kg, sodium selenate 0.06 g/kg, copper sulfate 0.75 g/kg, citric acid Iron 13.38 g/kg; thiamine 50 mg/kg, riboflavin 50 mg/kg, vitamin A 25 000 IU/kg, vitamin E 400 IU/kg, vitamin D₃ 24 000 IU/kg, menadione 40 mg/kg, hydrochloric acid Pyridoxine 40 mg/kg, cyanocobalamin 0.1 mg/kg, biotin 6 mg/kg, calcium pantothenate 100 mg/kg, folic acid 15 mg/kg, nicotinic acid 200 mg/kg, and inositol 2000 mg/kg

从每个鱼缸中随机选取 6 尾草鱼, 在工作台上, 用 1 mL 无菌注射器从尾静脉取血, 装于 1.5 mL 无菌离心管中, 4℃ 静置过夜后 3500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 分装于 1.5 mL 无菌离心管中, 并保存在 -80℃ 冰箱, 用于血清指标测定。另随机取 9 尾草鱼进行解剖。其中, 中肠和肝脏迅速置于液氮中冻存, 进而转移到 -80℃ 超低温冰箱冷冻保存, 用于肝脏生化指标测定和 RNA 提取。随机挑选 3 尾鱼采集长度约 1 cm 的中肠, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于组织切片。实验鱼的增重率 (weight gain rate, WGR, %)、成活率 (survival rate, SR, %)、饲料系数 (feed conversion ratio, FCR)、摄食率 (feeding ratio, FR, %/d) 计算公式如下:

$$WGR=100 \times (W_t - W_0) / W_0;$$

$$SR=100 \times N_t / N_0;$$

$$FCR=F / (W_t - W_0);$$

$$FR=100 \times F / (W_0/2 + W_t/2) / t;$$

式中, W_0 为初始体重(g); W_t 为终末体重(g); N_t 为终末尾数; N_0 为初始尾数; F 为摄入饲料总量(g); t 为饲养天数(d)。

1.4 血清与肝脏生化指标和酶活性的测定

血清中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙二醛 (malondialdehyde, MAD)、补体 3 (complement 3, C3)、补体 4 (complement 4, C4) 等指标测定使用试剂盒检测 (南京建成生物科技有限公司), 操作步骤均按照试剂盒说明书进行。

肝脏的鱼 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶 (fish 3-hydroxyacyl-

CoA dehydrogenase, HOAD)和鱼细胞色素 C 氧化酶 (fish cytochrome c oxidase, COX)的测定使用试剂盒进行,并参照说明书进行具体操作。HOAD 和 COX 试剂盒购于上海酶联生物有限公司。

1.5 组织切片

将固定的肠道组织样品在自来水中洗涤 12 h,然后在一系列梯度乙醇中进行脱水(30%、50%、70%、80%、90%、95%和 100%两次)。根据先前描述的标准组织学技术,将样品在二甲苯中平衡并包埋在石蜡中(Yu *et al.*, 2017)。用旋转切片(莱卡 RM2235, 德国)切割为 5 μm 的切片。中肠肠道组织采用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, H&E)染色。使用立式显微镜(Leica biosystems, Wetzlar, 德国)观察组织学样品并拍照。

1.6 肠道组织免疫相关基因表达量测定

1.6.1 总 RNA 的提取 中肠肠道组织总 RNA 采用 TRIZOL 试剂盒(TaKaRa, 日本)提取,并用 1%琼脂糖变性胶来检测总 RNA 的提取质量和完整性。除去总 RNA 中的 DNA 后,利用 PrimeScript™ 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本),以 1 μg 总 RNA 为模板,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束,反转录合成 cDNA。cDNA 保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 用于基因检测。

1.6.2 实时定量 PCR 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)是通过 LightCycler®96—TimePCR Detection System (Roche, 瑞士)来完成的,所用的 qRT-PCR 试剂是 Power SYBR™Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, 美国)。qRT-PCR 反应的总体积为 20 μL , 包括:上下游引物各 0.6 μL , 1.0 μL 稀释的第一链 cDNA 产物, 10 μL 2 \times Power SYBR™Green PCR Master Mix 和 7.8 μL 灭菌双蒸馏水。循环参数如下: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。PCR 反应后,熔解曲线为 72 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内进行分析(以 1 $^{\circ}\text{C}$ /20 s 的步长)以确认单个产物。qRT-PCR 中检测的基因的引物是通过已经发表的草鱼 β -肌动蛋白(β -actin)、肿瘤坏死因子 α (*tnfa*)和白细胞介素 1 β (*il-1 β*)序列基础上设计的,由生工生物工程

(上海)有限公司合成(表 2)。相关基因的相对表达水平是以 β -actin 基因的表达为参照,运用比较 CT 方法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)计算基因表达值(Livaka *et al.*, 2001)。所有的 RNA 样品都设置 3 个重复进行检测。

1.7 数据计算与分析

所有的数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,实验所获得各项数据采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析,差异显著时,采用 Duncan's 进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼生长性能及饲料利用的影响

经 56 d 的养殖实验,饲料中添加皇竹草粉对草鱼生长性能的影响见表 3。结果显示,与对照组(C 组)比较,10%皇竹草粉组(P1 组)与 20%皇竹草粉组(P2 组)的增重率分别提高了 10.85%和 17.18% ($P < 0.05$),成活率提高了 19.50%和 23.69% ($P < 0.05$),饲料系数分别降低 10.69%和 12.07%,摄食率提高 6.25%和 4.86%,但均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼血清生化、抗氧化和免疫相关指标的影响

由图 1a、图 1b 可知,饲料中添加皇竹草粉显著降低草鱼血清中 AST 和 ALT 的活性($P < 0.05$)。P2 组的 MDA 含量显著低于 C 组($P < 0.05$) (图 1c)。P1 组和 P2 组的补体 C3 和 C4 含量显著高于 C 组($P < 0.05$) (图 1d、图 1e)。

2.3 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼肝脏细胞活性相关指标的影响

如图 2a、图 2b 所示,与 C 组相比, P1 和 P2 组显著增加了草鱼肝脏 HOAD 和 COX 的活性($P < 0.05$)。

2.4 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼肠道的组织学观察

从肠道显微结构(图 3)中可以看出,相对照组,饲料中添加皇竹草粉后促进了中肠肠道绒毛的发育,

表 2 实时荧光定量 PCR 中基因的引物
Tab.2 Primers used in quantitative real-time PCR

靶基因 Target genes	登录号 Accession No.	正向引物 Forward (5'~3')	反向引物 Reverse (5'~3')
Tumour necrosis factora (<i>tnfa</i>)	JQ670915	AACCAGGACCAGGCTTTCT	GCATAACTGCGTGGCTCATA
Interleukin-1 β (<i>il-1β</i>)	JX014320	GCCAAGTAGCCGAATCACAGA	AAGCCCAAGATATGCAGGAGTC
β -actin	DQ211096	TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATT	AGTTTGAGTCGGCGTGAAGTGGTA

表 3 饲料中皇竹草粉对草鱼幼鱼生长和饲料利用的影响
Tab.3 Effects of diets supplemented with *P. sinense* Roxb meal on growth performance and feed utilization of juvenile grass carp ($n=3$)

项目 Items	组别 Groups		
	C	P1	P2
初重 IBW/g	28.50±0.11	28.52±0.14	28.47±0.60
末重 FBW/g	38.46±0.14 ^b	39.57±0.25 ^a	40.12±0.48 ^a
增重率 WGR/%	34.93±0.38 ^b	38.72±1.39 ^a	40.93±1.38 ^a
成活率 SR/%	72.27±4.55 ^b	86.36±4.55 ^a	89.39±2.63 ^a
饲料系数 FCR	2.72±0.16	2.59±0.20	2.55±0.04
摄食率 FR/%	1.44±0.07	1.53±0.07	1.51±0.04

注: 同列肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 标有相同字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$), 下同

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

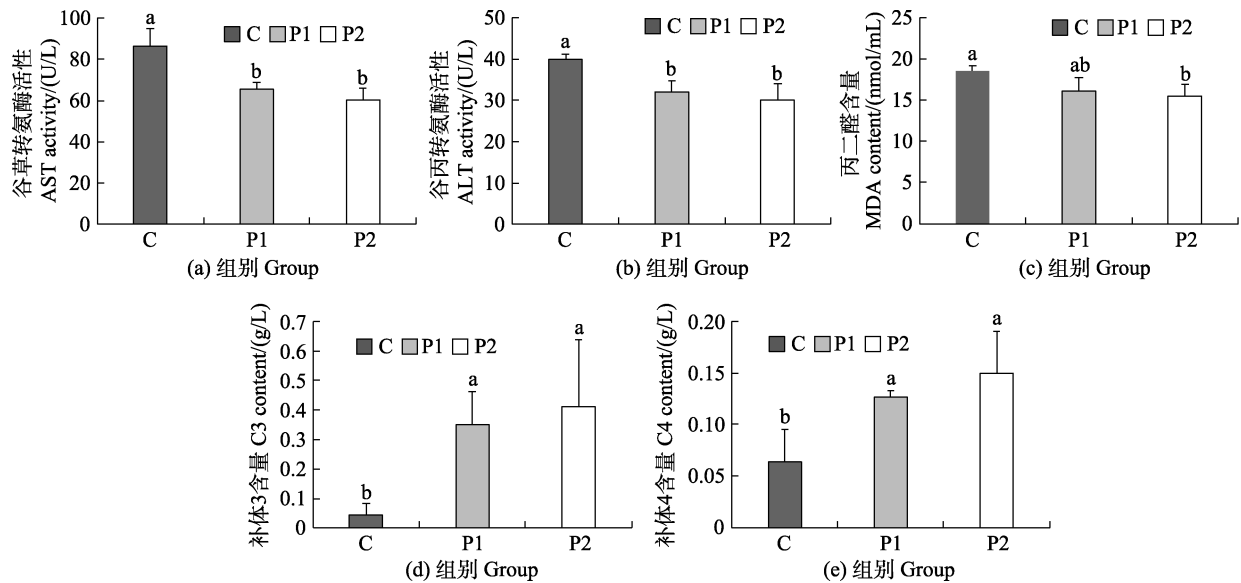


图 1 饲料中添加皇竹草粉对草鱼幼鱼血清生理生化指标的影响($n=3$)

Fig.1 Effects of the diets supplemented with *P. sinense* Roxb meal on serum physiological and biochemical indexes of juvenile grass carp ($n=3$)

不同小写字母表示数据间有显著的统计学差异($P<0.05$); C: 对照组; P1: 10%皇竹草粉组; P2: 20%皇竹草粉组, 下同
Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ($P<0.05$); C: Control group; P1: 10% grass meal group; P2: 20% grass meal group, the same as below

绒毛高度与皱褶深度有所增加, 但肌层厚度有所下降。表 4 显示, 饲料中添加皇竹草粉显著提高草鱼幼鱼中肠道绒毛高度和皱褶深度, 降低了肠道肌层厚度($P<0.05$)。

2.5 基因表达定量分析

饲料中添加皇竹草粉对草鱼中肠炎症相关基因表达的影响见图 4。与 C 组相比, P1 组和 P2 组的促炎因子 *tnfa* 和 *il-1 β* 的基因的相对表达水平显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼生长性能的影响

本研究中饲料添加皇竹草粉提高了草鱼的生长性能, 可能草鱼对植物性饲料原料有天然的需求。研究发现, 饲喂植物性饵料浮萍(*Lemna minor* L.)的草鱼生长发育速度明显快于饲喂动物性饵料摇蚊幼虫(*Chironomid*)的草鱼(张杏波等, 2012)。黄飞等(2008)研究指出, 草粉可促进肠道发育, 降低肠道 pH 值,

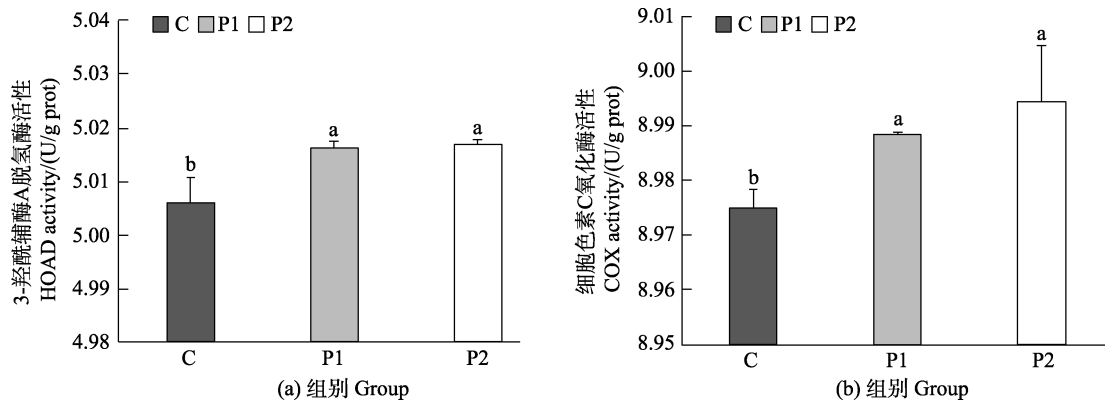


图 2 饲料中皇竹草粉对草鱼幼鱼肝脏生理生化指标的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of the diets supplemented with *P. sinense* Roxb meal on liver physiological and biochemical indexes of juvenile grass carp ($n=3$)

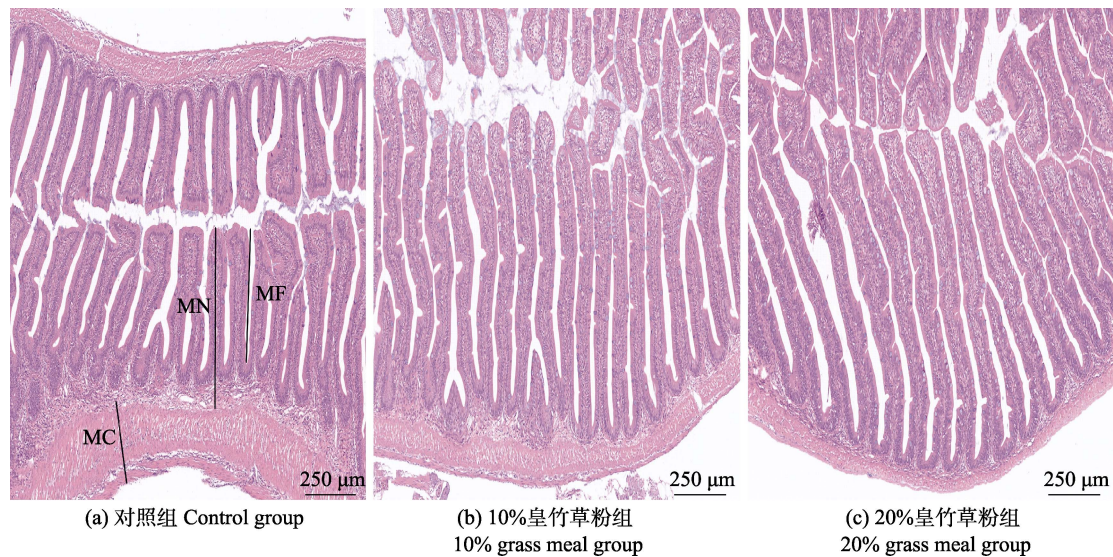


图 3 饲料中添加皇竹草粉后草鱼幼鱼肠道组织的显微结构($\times 100$)

Fig.3 Microstructure of the intestinal tissue of grass carp juveniles after adding *P. sinense* Roxb meal to the diets($\times 100$)

MN: 绒毛高度; MF: 皱褶深度; MC: 肌层厚度
 MN: Villus height; MF: Folds depth; MC: Muscle thickness

表 4 饲料中皇竹草粉对草鱼幼鱼肠道形态学影响($n=3$)

Tab.4 Effects of diets supplemented with *P. sinense* Roxb meal on intestinal morphology of juvenile grass carp ($n=3$)

项目 Items	组别 Groups		
	C	P1	P2
绒毛高度 MN/ μm	378.00 \pm 18.52 ^c	638.33 \pm 41.50 ^b	772.33 \pm 58.23 ^a
皱褶深度 MF/ μm	258.67 \pm 11.85 ^c	558.33 \pm 41.74 ^b	701.00 \pm 13.53 ^a
肌层厚度 MC/ μm	155.00 \pm 13.89 ^a	86.33 \pm 4.71 ^b	46.80 \pm 4.78 ^c

促进有益菌群的繁殖,这些有益菌能产生一系列有益于生长和健康的挥发性脂肪酸,如乙酸、丙酸和丁酸等。He 等(2015)研究发现,草鱼在食性转变后(从肉食性转为植食性),肠道中丝氨酸蛋白、酸性葡聚糖、兴奋性氨基酸转运蛋白 3 等参与消化代谢的基因也显著增加。研究表明,青草类饲料对草鱼体内环境的改

善间接提高了鱼体对饲料的利用率。在本研究中,草鱼在摄食添加皇竹草粉的饲料后对生长表现出了正向的效果,尽管本研究中也发现草鱼在摄食半精制饲料的过程中生长较为缓慢,针对皇竹草粉对草鱼生长的影响还需后期长时间饲喂实验或者在实用饲料中进行评估。

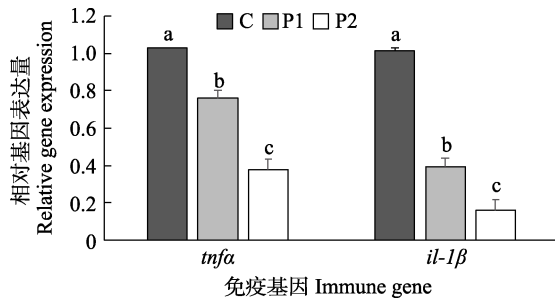


图 4 饲料添加皇竹草粉对草鱼肠道组织免疫基因相对表达的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of diets supplemented with *P. sinense* Roxb meal on the relative mRNA expression of the intestine in grass carp ($n=3$)

3.2 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼血清和肝脏生理生化指标的影响

鱼类血液指标被广泛运用于评价鱼体健康状况、营养状况及对环境的适应状况等,是一种良好的生理、病理和毒理学指标(周玉等, 2001)。AST 和 ALT 在血液中的活性通常被用来指示肝脏的健康程度(郭小泽, 2013)。本研究中,摄食添加皇竹草粉饲料的草鱼血清中的 AST 和 ALT 都显著低于对照组,说明皇竹草粉减少了草鱼肝细胞的损伤。类似的,草鱼在摄食苦草(*Vallisneria natans*)粉饲料后,血清中的 AST 活力也显著降低(黄仲园等, 2020),表明青草类饲料可能具有护肝的功效。这可能与肝脏脂肪含量有关,一般认为肝脏的脂肪含量和血清 AST 和 ALT 呈现正相关的关系(Tian *et al*, 2020)。本研究中,另外也检测了肝脏的脂肪含量,发现摄食皇竹草粉后草鱼肝脏的脂肪含量显著降低,一些与肥胖相关的肠道菌群明显下降(未发表资料),推测皇竹草粉改善了肠道微环境,降低了草鱼肝脏内脂肪的沉积,进而减少了肝细胞的损伤。与之对应的是,饲喂皇竹草粉后草鱼肝脏的 HOAD 和 COX 活性显著升高,这 2 种酶反映了细胞代谢的活力(Beenackers *et al*, 1984; 曹玲芳等, 2013),侧面支持了皇竹草粉提高草鱼肝脏健康的作用。

本研究中,饲喂皇竹草粉提高了草鱼幼鱼的成活率,间接表明皇竹草粉可能提高了鱼体的抗病力。血液是机体免疫发生的主要内环境,作为补体激活经典途径的 C4 及补体激活替代途径的 C3 主要成分在血液免疫功能上发挥着重要作用(唐宏刚, 2008)。本研究中,皇竹草粉组草鱼 C3 和 C4 含量显著增高,显示饲料添加皇竹草粉一定程度增加草鱼的抗病菌的能力。与徐奇友等(2010)在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)上的研究结果一致。一般认为,草粉饲料里富含多糖类物质,

Chen 等(2019)研究表明,饲料中添加多糖类饲料原料可以提高草鱼稚鱼血清中补体 C3 和 C4 含量,减少了细菌和病毒的感染。另一方面,抗氧化能力也是机体非特异免疫屏障中重要的一环,脂质,尤其是多不饱和脂肪酸易受氧自由基攻击,引起膜脂质的氧化损伤,进而损害细胞的生物膜。MDA 是脂质过氧化损伤的最终代谢产物,间接反映了细胞损伤的程度(Zhou *et al*, 2003)。本研究中,与 C 组相比较, P1 组和 P2 组血清中 MDA 的含量都降低,表明饲料中添加皇竹草粉可能降低了鱼体内部的氧化应激反应。在黄河鲤(*Cyprinus carpio-haematopterus*)中的研究发现,苜蓿草(*Medicago sativa* L.)粉也能够降低 MDA 含量(王成章等, 2008)。草粉类物质中富含胡萝卜素、硒和多种维生素(包括维生素 C 和维生素 E)等,这些物质在提高机体抗氧化能力、消除自由基等方面均有积极的效果(史莹华等, 2011)。氧化应激是很多应激损伤的本质所在,也是众多病害发生的病理生理基础(Lushchak, 2011)。本研究中,添加皇竹草粉后减缓的氧化应激可能是草鱼生长增加和免疫性能提升的原因之一(Fast *et al*, 2008)。

3.3 饲料添加皇竹草粉对草鱼幼鱼肠道结构和基因表达的影响

肠道绒毛高度、皱褶深度、肌层厚度是衡量肠道消化、吸收和肠道健康的重要指标(张敏等, 2009)。本研究发现,饲料中添加皇竹草粉提高了草鱼幼鱼肠道的绒毛高度和皱褶深度,但降低了肌层厚度。目前,较少的研究指出草粉在鱼类肠道组织学的影响,但在肉鸡(*Gallus gallus domesticus*)中发现,饲喂苜蓿草粉增加了肠绒毛的高度和肌层厚度(徐珊珊, 2013)。较长的绒毛能够在肠腔中充分延伸,保证绒毛与食糜间的充分接触,是提高消化吸收效率的结构保障(刘敏, 2009)。肌层厚度上升会造成鱼类肠内膜面积变小,降低鱼类对营养物质的消化吸收能力(姚浪群等, 2003)。推测肠绒毛高度的增加以及肌层厚度的降低是肠道对于更多营养物质吸收的适应性结果。另外,有益肠道菌群产生的短链脂肪酸也在促进肠道发育过程中起到重要作用(余荣等, 2012)。本研究是采用等氮等能的饲料配方,在此机制下草鱼在饲喂皇竹草粉后肠道对营养物质的吸收总量可能有所增强,有利于提高饲料的消化率,与本研究中饲料系数的变化趋势相符。

除了消化和吸收营养素,肠道还扮演阻断肠道内共生微生物屏障的作用(Patankar *et al*, 2020)。当肠道

损伤、肠道微生物失衡或者病原菌入侵,均会造成肠道炎症,造成机体的不健康状态,增加死亡率。肿瘤坏死因子(*tnf- α*)是机体在病原体入侵时,由激活的巨噬细胞、淋巴细胞以及其他免疫细胞产生的促炎细胞因子,在抵抗细菌、病毒和寄生虫感染的过程中发挥重要介质的作用(Horiuchi *et al.*, 2010)。白细胞介素 1 β (*il-1 β*)是一种由单核细胞、巨噬细胞、朗氏细胞等多种细胞产生的一种重要的促炎细胞因子,在炎症过程中起着重要的作用(Bird *et al.*, 2002)。鱼类肠道中这 2 个细胞因子的表达量与肠炎密切相关(Liu *et al.*, 2018; 胡鹏莉等, 2019)。本研究结果显示,饲料中添加皇竹草粉下调了促炎细胞因子 mRNA 的相对表达水平,可能一定程度缓解肠道炎症反应对组织的损害。在哺乳动物中,增加膳食纤维能够缓解肠道炎症, Singh 等(2019)研究表明,纤维类食物主要通过改变肠道菌群的组成以及它们的代谢产物丁酸来调控肠道炎症。此外, Zhou 等(2020)研究指出,气单胞菌属(*Aeromonas*)是一类条件致病菌,往往造成草鱼的肠道炎症。同时, Blumberg 等(2012)研究指出,厚壁菌门(Firmicutes)细菌减少是肠道炎症的主要表现之一。本研究还对摄食皇竹草粉饲料肠道菌群分析,发现厚壁菌门和气单胞菌属的丰度在皇竹草粉组显著降低,拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度显著上调(未发表资料),暗示皇竹草粉可能通过调节肠道菌群的组成,进而影响了肠道炎症的状态。

综上所述,本研究探讨了饲料添加皇竹草粉对草鱼生长、免疫、抗氧化和肠道健康的影响。研究发现,饲料中添加 10%和 20%的皇竹草粉能够显著促进草鱼的生长、提高鱼体非特异免疫力、降低氧化应激以及改善肠道炎症状况等。研究结果可为生产实践中皇竹草作为一种新型的饲料原料的应用提供理论依据和基础数据。

参 考 文 献

- BEENAKKERS A M, VAN DER HORST D J, VAN MARREWIK W J A. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochemistry*, 1984, 14(3): 243–260
- BIRD S, ZOU J, WANG T H, *et al.* Evolution of interleukin-1 β . *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002, 13(6): 483–502
- BLUMBERG R, POWRIE F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(137): 137
- CAO L F, LI Y F, HE R R, *et al.* Regulation function of cytochrome C oxidase on aging: Research advances. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2013, 40(6): 751–756 [曹玲芳, 李怡芳, 何蓉蓉, 等. 细胞色素 c 氧化酶对衰老调控作用的研究进展. *国际药学研究杂志*, 2013, 40(6): 751–756]
- CHEN J C, CHEN C X, WANG X M, *et al.* Research progress of grass carp immune genes. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(2): 46–51 [陈继楚, 陈成勋, 王晓梅, 等. 草鱼免疫基因研究进展. *江苏农业科学*, 2020, 48(2): 46–51]
- CHEN L, ZHANG Y P. The growth performance and nonspecific immunity of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) affected by dietary *Porphyra yezoensis* polysaccharide supplementation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 87: 615–619
- DING C H. Characteristics and comprehensive utilization of *Pennisetum hybridum*. *Modernizing Agriculture*, 2008(12): 33–34 [丁翠华. 皇竹草特性及综合开发利用. *现代化农业*, 2008(12): 33–34]
- DUAN X M, CHEN S Q, PENG S Z. Comparative experiment on the benefits of green fodder and pelleted fodder for breeding grass carp. *Current Fisheries*, 2008, 33(1): 21–22 [段小明, 陈世琪, 彭双智. 青饲料和颗粒饲料养殖草鱼效益对比试验. *内陆水产*, 2008, 33(1): 21–22]
- FAST M D, HOSOYA S, JOHNSON S C, *et al.* Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(2): 194–204
- GU H H, XU H P, ZHENG J Y, *et al.* Effects of different additives on the fermentation quality of *Pennisetum sinense* Roxb silage. *Guangdong Feed*, 2019, 29(3): 22–23 [古辉辉, 许萍好, 郑洁怡, 等. 不同添加剂对皇竹草青贮发酵品质的影响. *广东饲料*, 2019, 29(3): 22–23]
- GUO X Z. Effect of dietary non-protein energy sources on fat deposition and lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 [郭小泽. 饲料中非蛋白能量源对草鱼脂肪蓄积及脂肪代谢的影响研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2013]
- HE S, LIANG X F, LI L, *et al.* Transcriptome analysis of food habit transition from carnivory to herbivory in a typical vertebrate herbivore, grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1–14
- HORIUCHI T, MITOMA H, HARASHIMA S, *et al.* Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 2010, 49(7): 1215–1228
- HU P L, WU R, LU K L, *et al.* Effects of replacing fish meal with composite protein on growth, diet digestibility, and gut health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 56–65 [胡鹏莉, 吴瑞, 鲁康乐, 等. 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 56–65]
- HUANG F, ZHOU Z Y. The effect of alfalfa meal on the performance of growing pigs and immune function. *Journal*

- of Shaoguan University, 2008, 29(6): 88–90 [黄飞, 周志远. 苜蓿草粉对生长猪生产性能和免疫功能的影响. 韶关学院学报, 2008, 29(6): 88–90]
- HUANG Z Y, HE W H, PENG Z R, *et al.* Effects of adding *Vallisneria natans* meal to diet on growth performance, physiological and biochemical properties of juvenile grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 169–177 [黄仲园, 何文辉, 彭自然, 等. 苦草粉对草鱼幼鱼生长性能与生理生化性能的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 169–177]
- LI J G, LIU H Z, YANG X, *et al.* Cultivation of grass carp species with fine green material in pond. *Guizhou Animal Science and Veterinary Medicine*, 2012, 36(1): 66 [李建光, 刘化铸, 杨兴, 等. 池塘精青料混合培育草鱼种. 贵州畜牧兽医, 2012, 36(1): 66]
- LIU H X, ZHOU X Q, JIANG W D, *et al.* Optimal α -lipoic acid strengthen immunity of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by enhancing immune function of head kidney, spleen and skin. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 80: 600–617
- LIU J, YAN D Q, LIU J. Dietary fiber—The guardian of human health. *Modern Food*, 2020(1): 113–115 [刘劫, 严冬青, 刘健. 膳食纤维—人类的健康卫士. 现代食品, 2020(1): 113–115]
- LIU M. Study on the histology and histochemistry of digestive tract in *Brachymystax lenok* larvae. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2009 [刘敏. 细鳞鱼稚鱼消化道组织学与组织化学研究. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2009]
- LIVAKA 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
- LOVELL T. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989
- LUSHCHAK V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13–30
- MA G H, CHEN D Y, LIU L Y, *et al.* The study situation of the immunology of grass carp's toxic bleeding disease. *Fishery Modernization*, 2008, 35(1): 45–49 [马贵华, 陈道印, 刘六英, 等. 草鱼出血病的免疫学研究进展. 渔业现代化, 2008, 35(1): 45–49]
- MAO D D, ZHANG K, OU H X, *et al.* Effects of hybrid giant napier *Pennisetum sinense* Roxb and formulated feed on growth and nutrient compositions in muscle of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2018, 33(1): 7–13 [毛东东, 张凯, 欧红霞, 等. 投喂皇竹草和配合饲料对草鱼生长及肌肉营养成分的影响. 大连海洋大学学报, 2018, 33(1): 7–13]
- PATANKAR J V, BECKER C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 17(9): 543–556
- SHI Y H, WANG C Z, CHEN M L, *et al.* Effects of alfalfa hay meal on growth performance, antioxidant and immune values of Sichuan white geese. *Pratacultural Science*, 2011, 28(5): 841–847 [史莹华, 王成章, 陈明亮, 等. 苜蓿草粉对四川白鹅生长性能及抗氧化和免疫指标的影响. 草业科学, 2011, 28(5): 841–847]
- SINGH V, YEOH B S, WALKER R E, *et al.* Microbiota fermentation-NLRP3 axis shapes the impact of dietary fibres on intestinal inflammation. *Gut*, 2019, 68(10): 1801–1812
- TANG H G. Effects of fish protein hydrolysate on growth and metabolism, muscle quality, immunity and antioxidant properties of *Larimichthys crocea*. Master's Thesis of Zhejiang University, 2008 [唐宏刚. 鱼蛋白水解物对大黄鱼生长代谢、肌肉品质、免疫及抗氧化性能的影响. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2008]
- TANG S X, LU Y C, WANG Y L, *et al.* The feeding characteristics of “King of Pasture” *Pennisetum sinense* Roxb. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006(10): 61 [唐式校, 陆玉春, 王寅雷, 等. “牧草之王”皇竹草的饲用特点. 畜牧与兽医, 2006(10): 61]
- TIAN J J, FU B, YU E M, *et al.* Feeding faba beans (*Vicia faba* L.) reduces myocyte metabolic activity in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 391
- WANG C Z, HE Y, SHI Y H, *et al.* Effect of adding alfalfa meal in diet on antioxidant function and lipid metabolism of *Cyprinus carpio-haematopterus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2008, 17(4): 141–148 [王成章, 何云, 史莹华, 等. 饲料中添加苜蓿草粉对黄河鲤鱼抗氧化性能及脂质代谢的影响. 草业学报, 2008, 17(4): 141–148]
- WU B, HE G, WANG Q P, *et al.* The key technologies and typical cases of the “*Pennisetum sinense* Roxb+grass carp+micro-flowing water” model. *Fishery Guide to Be Rich*, 2018(11): 31–34 [吴斌, 贺刚, 王庆萍, 等. “皇竹草+草鱼+微流水”模式的关键技术及典型案例. 渔业致富指南, 2018(11): 31–34]
- XIA X J. Summary of high-quality and high-yielding forage grass. *Sichuan Grassland*, 1999(3): 15–17 [夏先玖. 优质高产牧草皇竹草综述. 四川草原, 1999(3): 15–17]
- XU J Y, TANG L, WANG C A, *et al.* Effects of garlic stem powder and oregano leaf powder on antioxidant capacity, non-specific immune performance and meat quality of the carp (*Cyprinus specularis*). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(z2): 133–139 [徐奇友, 唐玲, 王常安, 等. 大蒜茎粉和牛至草粉对镜鲤抗氧化, 非特异免疫以及肌肉品质的影响. 华北农学报, 2010, 25(z2): 133–139]
- XU S S. Effect of alfalfa meal on production performance and intestinal development of broilers. Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2013 [徐珊珊. 饲喂苜蓿草粉对肉鸡生产性能及肠道发育的影响. 吉林农业大学硕士研究生学位论文, 2013]

- XU Y Q, ZHANG Q H, LI Y H, *et al.* Effects of dietary *Eucommia ulmoides* Oliver leaf powder on the growth performance and expression of immunity related genes in *Mylopharyngodon piceus*. *Research of Agricultural Modernization*, 2015, 36(6): 1074–1079 [许友卿, 张青红, 李颖慧, 等. 饲料中添加杜仲叶粉对青鱼生长和组织免疫相关基因表达的影响研究. *农业现代化研究*, 2015, 36(6): 1074–1079]
- YANG M F. High quality hybrid pasture—*Pennisetum sinense* Roxb—a brief introduction to the development prospects and key cultivation techniques of *Pennisetum sinense* Roxb. *Applicable Technologies for Rural Areas*, 2003(1): 20–21 [杨明富. 优质杂交牧草—皇竹草—皇竹草的开发前景及栽培技术要点简介. *农村实用技术*, 2003(1): 20–21]
- YAO L Q, SA R N, TONG J M, *et al.* Effect of apramycin on intestinal flora and intestinal morphology of piglets. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003, 34(3): 250–257 [姚浪群, 萨仁娜, 佟建明, 等. 安普霉素对仔猪肠道微生物及肠壁组织结构的影响. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(3): 250–257]
- YE Y T, CAI C F, ZHANG B T, *et al.* Fish nutrition and feed preparation. Beijing: Chemical Industry Press, 2013 [叶元土, 蔡春芳, 张宝彤, 等. 鱼类营养与饲料配制. 北京: 化学工业出版社, 2013]
- YU E M, ZHANG H F, LI Z F, *et al.* Proteomic signature of muscle fibre hyperplasia in response to faba bean intake in grass carp. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45950
- YU L Y, BAI J J, LIU B H, *et al.* Analysis of nutrition composition of hybrid giant napier and artificial feed and evaluation of the effect of weight gain in two-month-old grass carp. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(28): 11388–11389 [于凌云, 白俊杰, 刘邦辉, 等. 皇竹草和人工配合饲料营养成分分析及其对 2 月龄草鱼的增重效果. *安徽农业科学*, 2013, 41(28): 11388–11389]
- YU R, XU X F, WANG W X. Research progress on the effects of butyric acid on animal intestines. *Chinese Journal of Animal Science*, 2012, 48(16): 64–68 [余荣, 徐小芳, 王雯熙. 丁酸对动物肠道影响的研究进展. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(16): 64–68]
- YU X J, XU L J, WU F X. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [于秀娟, 徐乐俊, 吴反修. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- ZHANG M, ZOU X T, SUN Y L. Supplement of glutamine on growth performance and intestinal mucosae development in avian broilers. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 45(9): 32–36 [张敏, 邹晓庭, 孙雅丽. 外源性谷氨酰胺对艾维茵肉仔鸡生长性能和小肠发育的影响. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(9): 32–36]
- ZHANG X B, LIANG X F, ZHU T, *et al.* The digestive tube development and the activity distribution of three kinds of digestive enzymes of *Ctenopharyngodon idellus* fed on different diets. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(3): 569–572 [张杏波, 梁旭方, 朱滔, 等. 食性对草鱼消化道发育及三种消化酶活性的影响. *水生生物学报*, 2012, 36(3): 569–572]
- ZHANG Y W, CHEN W G. Effects of different feeds on the main grass carp pond. *Scientific Fish Farming*, 2007(2): 65–66 [张耀武, 陈万光. 不同饲料对主养草鱼池塘的效果试验. *科学养鱼*, 2007(2): 65–66]
- ZHOU J F, CAI D, TONG G Z. Oxidative stress and potential free radical damage associated with photocopying. A role for ozone? *Free Radical Research*, 2003, 37(2): 137–143
- ZHOU L, WEI J F, LIN K T, *et al.* Intestinal microbial profiling of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2020, 524: 735292
- ZHOU Y, GUO W C, YANG Z G, *et al.* Advances in the study of haematological indices of fish. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10(2): 163–165 [周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 鱼类血液学指标研究的进展. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 163–165]
- ZHU Q H, LI L. High-yield experiment of cultivating grass carp species with compound feed and duckweed. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(16): 7493–7494, 7511 [朱庆红, 李莉. 配合饲料搭配浮萍培育草鱼种高产试验. *安徽农业科学*, 2009, 37(16): 7493–7494, 7511]

(编辑 陈 辉)

Effects of *Pennisetum sinense* Roxb Meal on Growth, Antioxidant Response, and Intestinal Health of Juvenile Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)

LI Yuping^{1,2}, TIAN Jingjing², ZHANG Kai², XIA Yun², WANG Guangjun²,
YU Ermeng², LI Zhifei², GONG Wangbao², XIE Jun^{2①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

Abstract The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal on the growth, antioxidant response, and intestinal health of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Three isonitrogenous and isoenergetic semi-purified diets containing 0% (control group C), 10%, and 20% *P. sinense* Roxb meal (P1 and P2) were designed (protein level 36%, fat level 9%) and fed to juvenile grass carp (28.51±0.04) g for 8 weeks. The results showed that the weight gain rate and survival rate of fish in the P1 and P2 groups were significantly higher than those in the C group ($P<0.05$). Serum malondialdehyde (MDA) levels in the P2 group were significantly lower than those in the C group ($P<0.05$). The serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels of the P1 and P2 groups were significantly lower than those of the C group ($P<0.05$). Fish in the P1 and P2 groups significantly increased their complement of C3 and C4 contents in the serum compared to those in the C group ($P<0.05$). Meanwhile, these two groups also showed increased hepatic 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and cytochrome C oxidase activities ($P<0.05$). The intestinal microstructure showed that the intestinal villus height and fold depth in the P1 and P2 groups were significantly increased compared with those in the C group, but the thickness of the muscle layer was reduced ($P<0.05$). In terms of transcripts, the relative gene expression of intestinal pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (*tnf-α*) and interleukin 1β (*il-1β*) were significantly down-regulated in the P1 and P2 groups compared with those in the C group. In conclusion, our data showed that 10% and 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal dietary supplementation could enhance the growth, reduce the oxidative response, and improve the health status of the intestine in juvenile grass carp.

Key words Grass carp; *Pennisetum sinense* Roxb; Growth performance; Intestinal development; Enteritis

① Corresponding author: XIE Jun, E-mail: xiejunhy01@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210224005

http://www.yykxjz.cn/

马本贺, 王海华, 徐先栋, 李燕华, 王梦杰, 吴斌, 陶志英. 大刺鲃消化道结构及食性研究. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 56-63

MA B H, WANG H H, XU X D, LI Y H, WANG M J, WU B, TAO Z Y. Research on structure of digestive tract and feeding habits in *Mastacembelus armatus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 56-63

大刺鲃消化道结构及食性研究*



马本贺 王海华^① 徐先栋 李燕华 王梦杰 吴斌 陶志英

(江西省水产科学研究所 农业农村部湖泊渔业资源环境科学观测实验站
南昌市特种水产繁育与健康养殖重点实验室 江西 南昌 330039)

摘要 为了解大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)消化道结构特点及其功能与食性的关系,以采自东江和桃江水域的大刺鲃为研究对象,采用解剖、石蜡切片、HE染色和胃含物分析等方法,研究了大刺鲃消化道的形态学、组织学结构及食性特征。结果显示,大刺鲃消化道由口咽腔、食道、胃和肠构成;口咽腔具舌、咽骨和咽磨;食道黏膜上皮为复层扁平上皮,含有丰富的杯状细胞,内壁具纵行褶皱和次级分支,肌层由横纹肌和平滑肌共同组成;胃壁和肠壁均由黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层构成,肌层为平滑肌,分为环肌和纵肌;胃呈“V”型,分为贲门部、胃体部、幽门部3个部分,各部分的肌层厚度相比差异显著($P<0.05$),贲门部向胃体部逐渐增粗,且含有胃腺细胞,幽门部肌层极为发达,形成幽门括约肌;肠较短,具一个弯曲,肠道系数为 0.325 ± 0.050 ,肠绒毛丰富,前肠、中肠和后肠的肠绒毛高度相比差异显著($P<0.05$);胃幽门部和前肠间有2个幽门盲囊。大刺鲃食谱较广,消化道中鉴定出虾类、水生昆虫、鱼类、螺、卵和植物碎屑6大类饵料,摄食时食物不经咀嚼直接吞入;食物多样性指数(H')为2.19,不确定性较低,饵料优势指数(D)为0.33,集中性较高;虾类为大刺鲃的主要食物,其相对重要性指数百分比(IRI%)、质量百分比($W\%$)和数量百分比($N\%$)分别为97.75%、92.29%和73.07%。研究表明,大刺鲃属肉食性鱼类,其消化道形态和组织学结构表现出与食性相适应的特点,该研究可为大刺鲃人工养殖和饲料开发提供理论参考。

关键词 大刺鲃; 消化道; 形态学; 组织学; 食性

中图分类号 Q955 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0056-08

大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)俗称猪麻锯、刀鲃,主要分布在我国长江及其以南水系,属温水性鱼类(Nelson, 2006; 林婷婷, 2017)。大刺鲃肉质鲜美、营养均衡,含有丰富的氨基酸和不饱和脂肪酸(樊海平等, 2018),具有较高的经济和食用价值,市场前景广阔。随着自然资源的过度捕捞、栖息环境受到人为影响,大刺鲃野生资源遭到严重破坏(吴斌等, 2020)。

福建、广东等省已将大刺鲃列为省级重点保护野生动物名录,并先后建立了大刺鲃国家级种质资源保护区,在一定程度上保护了大刺鲃的种群数量和野生资源(何美峰等, 2015)。

大刺鲃人工养殖产业尚处于起步阶段,已有科研单位和相关工作者开展其繁养殖研究并取得阶段性进展,但繁苗量和成活率偏低。受到苗种供应和养殖

*江西省重点研发计划项目(20171ACF60012)和江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-10)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Plan of Jiangxi Province (2017ACF60012), and the Earmarked Fund for Jiangxi Agriculture Research System (JXARS-10)]. 马本贺, E-mail: mabenhe@126.com

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

收稿日期: 2021-02-24, 收修改稿日期: 2021-03-24

技术的限制,大刺鲃商业化养殖规模和产量较小,随着人们对食物种类多样化和品质提升的要求,大刺鲃越来越不能满足市场需要。近年来,大刺鲃相关研究主要集中在形态学(周惠强等, 2019; 舒琰等, 2017)、生物学(Verma *et al.*, 2015; 陈方平等, 2015; 薛凌展, 2018)、遗传多样性(杨华强等, 2016; 房祖业等, 2018)和种质资源(Wu *et al.*, 2019; 徐先栋等, 2020)等方面,从进化上来看,大刺鲃与黄鳝(*Monopterus albus*)的关系更为接近(Tian *et al.*, 2021)。开展消化道结构和食性的研究是了解和探讨鱼类消化吸收生理机制的重要途径(赵彦花等, 2019),也是其野生资源保护、探索人工养殖模式和配合饲料开发的重要前提,目前,国内外未见定量描述大刺鲃消化道结构与食性相关性的研究报道。本研究对赣南地区大刺鲃的消化道形态结构及食性开展探索,以期为大刺鲃资源保护和人工养殖提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018年3月—2020年9月,每年3、6、9和12月分别于江西省赣州市信丰县桃江水域和定南县东江水域使用地笼作业方式采集野生大刺鲃。实验期间,共采集大刺鲃278尾,体长为9.26~42.78 cm。选取体长 ≥ 20.00 cm、体表无伤、健康正常的大刺鲃,对其空胃样本开展形态学及组织学观察,实胃样本进行食性分析,现场观察测量及取样固定。

1.2 研究方法

1.2.1 形态学及组织学观察 观察大刺鲃外表形态,测量体重(精确到0.01 g)、体长、吻长、口裂长和肠长(精确到0.01 cm),现场解剖观察消化道的形态构造。取空胃大刺鲃用于组织学研究,采集消化道各组织块分别置于中性甲醛溶液中常温固定,进行常规石蜡切片制作、HE染色。显微镜下观察拍照(NIKON Eclipse Ci, 日本)。每张切片挑选3个视野进行拍照,拍照时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。应用Image-Pro Plus 6.0软件测量黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层等相应指标的数值(精确到0.01 μm)。

1.2.2 食性分析 选用胃含物分析法,对胃内有食物的大刺鲃个体,称取胃重后将胃置于5%福尔马林溶液中常温固定,带回实验室进行分析。饵料尽量鉴定到最小分类单元,不完整饵料依据如附肢、外壳等残存的器官进行鉴定(赵文, 2005)。参照李波等(2019)

的方法使用空胃率和胃饱满指数表示摄食强度,用食物组成的质量百分比($W\%$)、数量百分比($N\%$)、出现频率($F\%$)(Hyslop *et al.*, 1980)和相对重要性指数百分比(IRI%)(Pinkas *et al.*, 1971)来评价大刺鲃各饵料成分的重要性,采用Shannon-Wiener(H')多样性指数和饵料优势指数(D)反映食物生态位宽度(洪巧巧等, 2012)。

肠道系数(intestinal coefficient)=肠长/体长

空胃率(empty stomach rate, %)=空胃数/总胃数 $\times 100$

胃饱满指数(gastric fullness index, %)=胃内食物质量(g)/鱼体长(cm) $\times 100$

$F\%$ =含某饵料生物的胃数/实胃数 $\times 100$

$N\%$ =某饵料生物的个数/胃含物饵料生物总个数 $\times 100$

$W\%$ =某饵料生物的实际质量(g)/胃含物总质量(g) $\times 100$

$$\text{IRI} = (N\% + W\%) \times F\% \times 10\ 000 \quad (1)$$

$$\text{IRI}\% = \text{IRI}_i / \left(\sum_i^n \text{IRI}_i \right) \times 100 \quad (2)$$

$$H' = - \sum_i^n P_i \log_2 P_i \quad (3)$$

$$D = \sum_i^n P_i^2 \quad (4)$$

式中, P_i 为某一饵料在大刺鲃胃含物饵料组成中所占的比例,在计算食物多样性指数和饵料优势指数时采用 $N\%$ 。

1.2.3 数据处理 实验数据采用平均值 \pm 标准差(Means \pm SD)表示,数据统计使用SPSS 17.0和Excel 2010软件,采用单因素方差(one-way ANOVA)分析法进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 消化道结构

2.1.1 消化道形态学特征 采集空胃大刺鲃样本10尾,平均体长为(29.91 \pm 7.34) cm,平均体重为(60.51 \pm 32.52) g。大刺鲃消化道由口咽腔、食道、胃和肠组成,在体内呈“Z”型排列(图1)。口腔和咽腔分界不明显,合称口咽腔。大刺鲃吻细长、前端有2个左右分布的鼻管,口下位,唇较厚,口裂长/吻长为0.763 \pm 0.065。上颌长于下颌,上下颌均有尖锐的细齿;下颌后方生有骨质舌,前端游离。鳃弓5对,第5对鳃弓特化为咽骨;咽背面生有一对纵向分布的咽磨,咽磨为表面粗糙的椭圆形角质硬垫。食道连接

口咽腔与胃, 是1条直管, 内壁有发达的纵行褶皱。胃呈“V”型, 内壁具褶皱, 分为贲门部、胃体部和幽门部3个部分。贲门部向胃体部逐渐增粗, 幽门部肌层增厚, 胃腔直径变小。大刺鲃具2个状似凸起的幽门盲囊, 由肠的始端分别向幽门部左右延伸, 2个盲囊的中间为胃幽门部与肠的接口。肠道具有1个弯曲, 输胆管开口于前肠, 中肠肠径小于前肠和后肠, 后肠直达肛门, 肠道系数为 0.325 ± 0.050 。

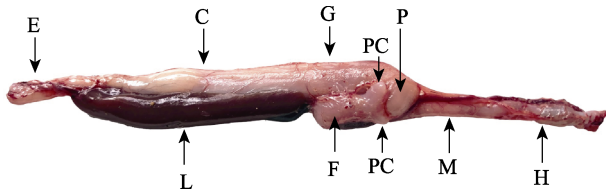


图1 大刺鲃消化道形态学观察
Fig.1 Morphological observation of digestive tract in *M. armatus*

E: 食道; C: 贲门; G: 胃体; P: 幽门; F: 前肠;
M: 中肠; H: 后肠; PC: 幽门盲囊; L: 肝
E: Esophagus; C: Cardia; G: Gastric body; P: Pylorus;
F: Foregut; M: Midgut; H: Hindgut;
PC: Pyloric caeca; L: Liver

2.1.2 消化道组织结构 口咽腔: 口咽壁主要由黏膜层、黏膜下层和肌层组成。黏膜层平均厚度为 $(104.71\pm 4.66)\mu\text{m}$, 黏膜层上皮为复层扁平上皮细胞, 上皮中分布有味蕾和黏液细胞。黏膜下层相对较薄, 与黏膜层分界不明显。最内侧为横纹肌组成的肌层, 肌层较厚(图2A)。

食道: 食道壁自内而外由黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层组成。黏膜层平均厚度为 $(107.46\pm 11.19)\mu\text{m}$, 内壁纵向褶皱发达, 可产生褶皱分支, 褶皱表面为复层扁平上皮, 上皮细胞间分布有大量杯状细胞。黏膜下层由疏松结缔组织构成, 平均厚度为 $(40.43\pm 7.54)\mu\text{m}$ 。黏膜下层外与肌层相连, 食道中部肌层由横纹肌和平滑肌共同构成。最外层是较薄的浆膜层, 平均厚度为 $(23.70\pm 6.17)\mu\text{m}$, 主要由结缔组织构成(图2B)。

胃: 胃是消化管中最膨大的部分, 胃壁由内而外依次为黏膜层、黏膜下层、环肌层、纵肌层和浆膜层。黏膜层向内腔突起形成黏膜褶皱, 由固有膜和单层柱状上皮构成, 黏膜上皮中无柱状细胞。贲门部黏膜褶皱高度较大, 上皮向固有膜凹陷形成胃小凹, 固有膜中分布胃腺细胞, 腺细胞开口于胃小凹, 可分泌腺液(图2C); 胃体部的黏膜褶皱高度达到胃的最大值, 胃腺细胞数量增多, 在黏膜层下出现少量黏膜肌

(图2D); 幽门部黏膜褶皱高度最低, 固有膜中无胃腺细胞, 黏膜肌增加(图2E)。黏膜下层为结缔组织, 分布有毛细血管。胃壁中肌层为发达的平滑肌, 环肌层厚于纵肌层; 环肌和纵肌厚度在贲门部、胃体部、幽门部分别依次增大(表1), 均在幽门部达到胃的最大值, 并形成幽门括约肌, 使得胃与肠的连接处骤然缩为一个孔。胃的浆膜层很薄, 主要为疏松结缔组织。

肠: 肠壁同样由黏膜层、黏膜下层、环肌层、纵肌层和浆膜层构成。肠黏膜层发达, 向肠腔内突起形成指状的肠绒毛, 由单层柱状上皮及固有膜组成; 上皮细胞呈高柱状, 其细胞核位于基部, 游离端形成纹状缘, 杯状细胞分散在上皮细胞间; 肠根据弯曲位置和肠径大小可分为前肠、中肠、后肠; 前肠绒毛长而密, 黏膜褶皱高度达到最大, 几乎充满了整个肠腔(图2G); 肠绒毛宽度和上皮细胞高度在前肠、中肠、后肠3个部分依次减小(图2H和图2I)。黏膜下层为疏松的结缔组织, 含有丰富的毛细血管。环肌与纵肌的厚度差异逐渐变小; 肌层厚度在肠道中呈先升高后降低的趋势, 中肠肌层厚度最大。肠道浆膜层较薄, 各部分厚度基本一致(表2)。幽门盲囊横切面为圆形, 组织学结构与前肠相似, 盲囊壁较薄, 内腔充满了发达的黏膜褶皱(图2F)。

2.2 食性分析

2.2.1 摄食强度和食物多样性 实验期间, 共采集到体长 $\geq 20\text{ cm}$ 大刺鲃213尾。其中, 实胃样本56尾, 空胃样本157尾, 空胃率73.71%。56尾实胃个体均采集于6月和9月, 平均体长为 $(26.32\pm 6.18)\text{ cm}$ 、体重为 $(51.64\pm 27.35)\text{ g}$, 平均胃饱满指数为 $(2.86\pm 1.69)\%$, H' 为2.19, D 为0.33。

2.2.2 食物组成 大刺鲃饵料生物主要由虾类、水生昆虫、鱼类、螺、卵和植物碎屑6个大类(9个小类)组成。虾类包括日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)和秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*); 水生昆虫包括划蝽(Corixidae)和仰泳蝽(Notonectidae), 均为半翅目(Hemiptera); 螺为淡水壳菜(*Limnoperna fortunei*)和福寿螺(*Pomacea canaliculata*)。食物组成中, 日本沼虾的 $W\%$ 、 $N\%$ 、 $F\%$ 和 $IRI\%$ 均最高, 分别为72.23%、51.92%、67.86%和81.99%。秀丽白虾的 $W\%$ 、 $N\%$ 、 $F\%$ 和 $IRI\%$ 分别为20.06%、21.15%、39.29%和15.76%, 各项指标仅次于日本沼虾, 排在第2位。从饵料生物的 $W\%$ 、 $N\%$ 、 $F\%$ 和 $IRI\%$ 分析, 大刺鲃的主要饵料类群为虾类, 其他饵料类群的比例相对较低(表3)。

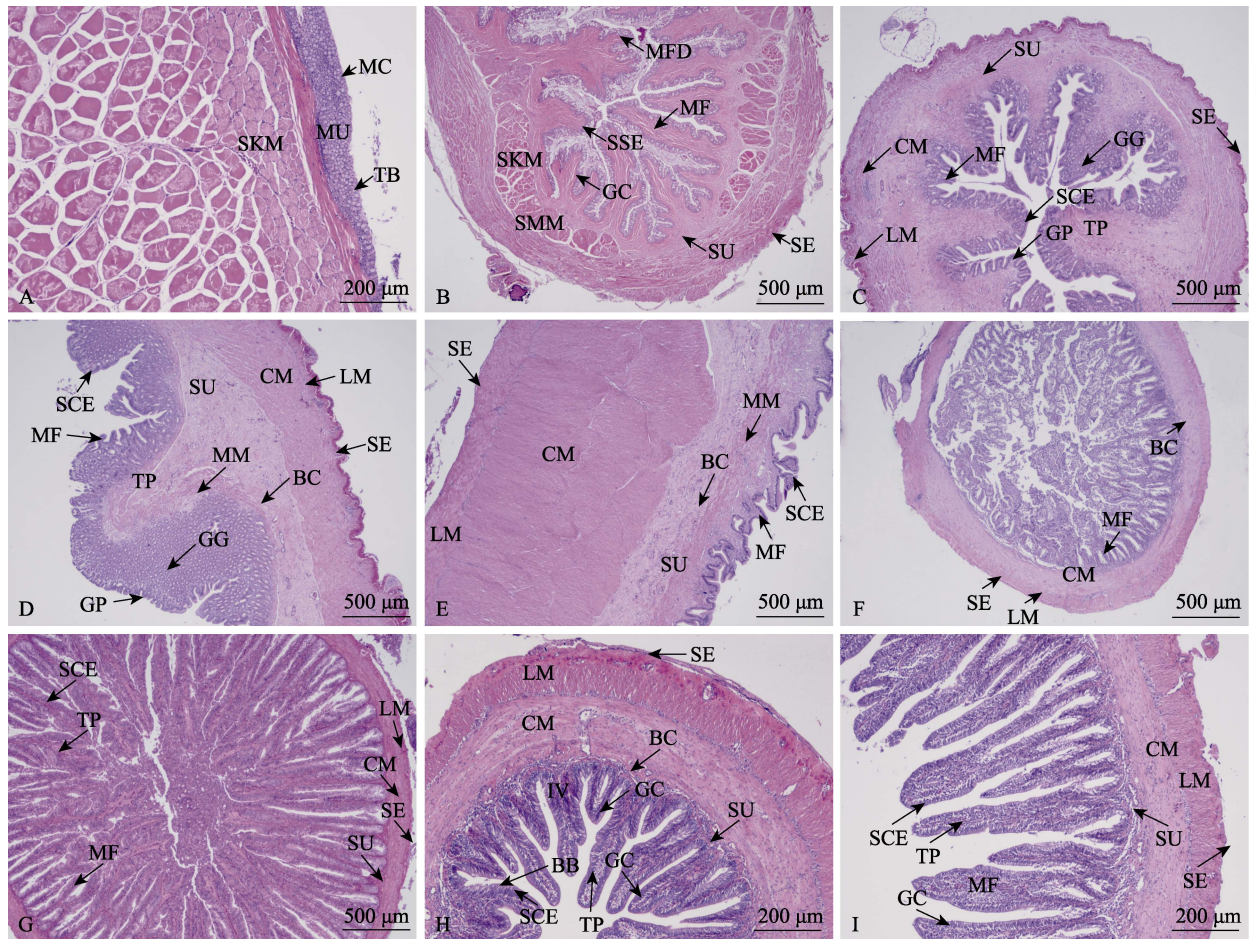


图 2 大刺鲈消化道组织学结构

Fig 2. Histological structure of digestive tract in *M. armatus*

- 1: 口咽腔横切; 2: 食道横切; 3: 贲门横切; 4: 胃体横切; 5: 幽门纵切;
6: 幽门盲囊横切; 7: 前肠横切; 8: 中肠横切; 9: 后肠横切

MC: 粘液细胞; MU: 黏膜层; TB: 味蕾; SKM: 横纹肌; SMM: 平滑肌; GC: 杯状细胞; MF: 黏膜褶皱;
MFD: 黏膜褶皱分支; SSE: 复层扁平上皮; SE: 浆膜层; SU: 黏膜下层; TP: 固有膜; CM: 环肌; LM: 纵肌;
GG: 胃腺; GP: 胃小凹; SCE: 单层柱状上皮; MM: 黏膜肌; BC: 毛细血管; BB: 纹状缘; IV: 肠绒毛

- 1: Cross-section of oropharyngeal cavity; 2: Cross-section of esophagus; 3: Cross-section of cardia;
4: Cross-section of gastric body; 5: Longitudinal-section pylorus; 6: Cross-section of pyloric caeca;
7: Cross-section of foregut; 8: Cross-section of midgut; 9: Cross-section of hindgut

MC: Mucous cell; MU: Mucosa; TB: Taste bud; SKM: Skeletal muscle; SMM: Smooth muscle; GC: Goblet cell;
MF: Mucosal fold; MFD: Mucosal fold branch; SSE: Stratified squamous epithelium; SE: Serosa; SU: Submucosa;
TP: Tunica propria; CM: Circular muscle; LM: Longitudinal muscle; GG: Gastric gland; GP: Gastric pit; SCE: Single columnar epithelium; MM: Muscularis mucosa; BC: Blood capillary; BB: Brush border; IV: Intestinal villus

表 1 大刺鲈胃各组织结构比较(μm)

Tab.1 Comparison of various tissue structures of the stomach in *M. armatus* (μm)

形态指数 Morphological index	贲门部 Cardia	胃体部 Gastric body	幽门部 Pylorus
黏膜褶皱高 Spiral valve height	405.76±77.78 ^a	599.72±62.13 ^b	345.12±28.84 ^a
黏膜下层厚 Submucosa thick	25.00±2.62 ^a	367.95±43.23 ^b	338.74±6.10 ^b
环肌层厚 Circular muscle thick	227.02±11.79 ^a	368.50±15.51 ^b	1 301.34±28.44 ^c
纵肌层厚 Longitudinal muscle thick	33.70±7.43 ^a	76.55±7.16 ^b	212.21±16.79 ^c
浆膜层厚 Serosa thick	21.15±1.82 ^b	84.33±7.50 ^c	15.98±3.00 ^a

注: 表中数据均为平均值±标准差; 同一行中不同字母上标表示差异显著(P<0.05), 下同

Note: Values presented as Mean±SD; The data with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05), the same as below

表2 大刺鲃肠各组织结构比较(μm)Tab.2 Comparison of various tissue structures of the intestine in *M. armatus* (μm)

形态指数	Morphological index	前肠 Foregut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
黏膜褶皱高	Spiral valve height	1 254.96±67.18 ^c	391.26±43.19 ^a	617.52±59.28 ^b
黏膜下层厚	Submucosa thick	56.93±7.28 ^a	51.68±12.68 ^a	62.04±16.00 ^a
环肌层厚	Circular muscle thick	82.87±9.09 ^a	171.86±18.36 ^c	116.65±7.42 ^b
纵肌层厚	Longitudinal muscle thick	42.75±4.22 ^a	100.36±11.04 ^c	78.30±8.41 ^b
浆膜层厚	Serosa thick	37.16±6.06 ^a	30.13±5.85 ^a	28.71±5.79 ^a
黏膜褶皱宽	Spiral valve width	100.33±12.85 ^b	75.88±22.61 ^{ab}	56.29±19.72 ^a
上皮细胞高	Epithelial cell height	33.21±2.63 ^b	19.49±3.78 ^a	18.51±1.49 ^a

表3 大刺鲃饵料组成

Tab.3 Food composition of *M. armatus*

胃含物组成	质量百分比	数量百分比	出现频率	相对重要性指数百分比
Food contents	Quality percentage/(W%)	Numerical percentage/(N%)	Occurrence/(F%)	Relative importance index percentage/(IRI%)
日本沼虾 <i>M. nipponense</i>	72.23	51.92	67.86	81.99
秀丽白虾 <i>E. modestus</i>	20.06	21.15	39.29	15.76
仰泳蝽 <i>Notonectidae</i>	0.77	5.77	7.14	0.45
划蝽 <i>Corixidae</i>	0.74	3.85	3.57	0.16
斗鱼 <i>Belontiidae</i>	4.86	1.92	3.57	0.24
淡水壳菜 <i>Limnoperna fortunei</i>	0.98	1.92	3.57	0.10
福寿螺 <i>P. canaliculata</i>	0.12	1.92	3.57	0.07
卵 Eggs	0.19	5.77	10.71	0.62
植物碎屑 Plant detritus	0.05	5.77	10.71	0.61

3 讨论

3.1 大刺鲃的食物组成与摄食习性

从食物组成来看,大刺鲃动物性饵料的 $W\%$ 和 $N\%$ 分别为 99.95%和 94.23%,食物中植物碎屑 $F\%$ 为 10.71%,但 $W\%$ 仅为 0.05%,营养贡献小,参照刘其根等(2015)对光泽黄颡鱼(*Pelteobagrus nitidus*)的研究方法,推测植物碎屑可能是大刺鲃在摄食动物性饵料过程中产生的被动摄食,认为大刺鲃属于肉食性鱼类,这与汀江水域大刺鲃(黄永春,1999)的研究结果相符。综合 $W\%$ 、 $N\%$ 、 $F\%$ 和 $IRI\%$ 来看,本研究中大刺鲃的主要食物为虾类。从虾类、水生昆虫和鱼类在大刺鲃胃中的形态看到,大刺鲃从猎物头部、尾部位置的摄食均有发生,大刺鲃室内暂养时投喂水蚯蚓发现,大刺鲃还会从水蚯蚓的背部将其吞食,说明大刺鲃的袭击方式多样。

大刺鲃属温水性鱼类,最适水温为 20℃~29℃,当水温较低时,将逐渐减少或停止摄食(曾庆祥等,2016),采样过程中样本在地笼内存留的时间长短不一,大刺鲃空胃率偏高,且实胃样本集中在 6 月、9 月,可能是受到季节和地笼作业方式的影响。大刺鲃习性

凶猛,其摄食前悄悄靠近猎物,然后迅速袭击将猎物整个吞入。实胃样本中大部分食物形体较完整,且集中在胃体部,肠道中的食物均为糜状。胃饱满指数与摄食强度成正比。Xue (2005)研究指出,鱼类的食物质量与其体长之间的相关性比与体重之间的相关性更好。本研究中,使用体长计算胃饱满指数,减少大刺鲃因性腺发育对胃饱满指数的影响。胃饱满指数最高可达 11.39%,说明大刺鲃在食物充足时,可大量摄食进行能量储备,在食物短缺时,则可长时间不摄食或少摄食。大刺鲃食物的多样性指数 H' 值为 2.19,属中等水平;饵料优势指数 D 为 0.33,食物组成优势种群集中性较高(洪巧巧等,2012),这与饵料生物的 $IRI\%$ 相符合。

3.2 大刺鲃消化道结构及其功能关系

消化道是鱼类食物消化吸收的主要场所。鱼类口裂的大小与其食性密切相关,大刺鲃吻细长,导致口裂长/吻长的平均值为 0.763±0.065。上下颌生有细密的小齿,可以固定食物,防止猎物逃脱。口咽腔中含有强有力的骨骼肌,配合咽骨和咽磨,有利于将食物压紧送往食道。食道前端含有收缩能力强的横纹肌,内壁为粗大的纵行褶皱,有助于输送食物;食道黏膜

层为复层扁平上皮,且其中含有大量杯状细胞;复层扁平上皮细胞具有很强的再生修复能力,对摩擦和损伤的耐受能力强;杯状细胞可分泌黏液到管腔中,保持食道的润滑(赵柳兰等,2018;任永丽等,2020),对于未经咀嚼直接吞入的食物,具有保护食道减少机械损伤的作用(Cinar *et al*,2006),这与大刺鲃将食物不经咀嚼直接吞咽的摄食习性相适应。

胃是大刺鲃消化食物的主要器官,胃从贲门部到胃体部为逐渐增粗的长管状结构,充满食物时膨大成囊状;胃壁的环肌厚度较大,有助于增加胃的伸缩性和提高食糜的机械消化效率,同时,扩大了胃的容量,增加大刺鲃的一次摄食量(张杰等,2015)。胃体部的黏膜褶皱较高且固有层发达,大大增加了与食物的接触面积,胃腺分泌大量腺液,促进食物的快速消化(曹潇等,2018)。幽门括约肌发达且与肠的通道口极小,有效地延缓胃内食物糜团排空和防止肠道内容物逆流(庾云等,2019)。初庆柱等(2009)对粤西水域大刺鲃的消化系统组织学开展了定性描述并指出,其幽门盲囊数量为一个。本研究发现,大刺鲃具有2个幽门盲囊,从解剖形态学观察来看,2个幽门盲囊大小、长短各不一,且不同样本个体间幽门盲囊的形态也有所差异,推测前人研究将其中1个较小的幽门盲囊归为肠道,亦或是大刺鲃2个地理群体间存在差异。幽门盲囊的形态结构与肠相似,是为了增加肠道功能而进化的适应性结构(Khayyami *et al*,2015),具有容纳食物、辅助消化吸收的作用。

肠是大刺鲃食物营养吸收的主要场所,肠道系数是鱼类形态学的重要参数之一,Albrecht等(2001)研究指出,肠道系数与其食性有着密切的关系。一般而言,典型肉食性鱼类肠道系数较小,植食性鱼类的肠道系数较大,杂食性鱼类介于二者之间(Davis *et al*,2013)。大刺鲃的肠道较短,结构简单仅有一个弯曲,平均肠道系数为 0.325 ± 0.050 ,小于黄鳝、乌鳢(*Channa argus*)、鲮(*Siniperca chuatsi*)、大口黑鲈(*Microperus salmoides*)等肉食性鱼类(潘黔生等,1996)。鱼类的肠绒毛数量和高度与消化吸收能力相关,前肠、中肠和后肠的肠绒毛高度存在显著差异,前肠中黏膜褶皱高度、宽度和上皮细胞高度均达到最大,有助于食物的消化吸收(曾端等,1998)。

综上所述,大刺鲃口咽腔具咽骨和咽磨,上下颌生有细齿,食道内壁纵行褶皱粗大且富含黏液细胞,有利于捕食和吞咽;胃壁肌层发达,含有丰富的皱褶,具有较大的食物容纳量和较高的消化效率;肠道较短,仅有一个弯曲,肠绒毛细长而密集,是营养吸收的主要场所。大刺鲃属肉食性鱼类,虾类是其最主要

食物。大刺鲃表现出消化道形态、结构与摄食习性相适应的特点。其在人工养殖中应投喂动物性饵料或以动物性蛋白饲料为主,宜采取少量多次的投喂策略。

参 考 文 献

- ALBRECHTI M P, FERREIRA M F N, CARAMASCHI E P. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(2): 419-430
- CAO X, SUN M, ZHU L H, *et al*. Morphology and histology of the digestive system in *Girella leonine*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2018, 37(1): 20-26 [曹潇, 孙敏, 朱亮华, 等. 黑魮消化系统的形态学及组织学研究. *热带海洋学报*, 2018, 37(1): 20-26]
- CHEN F P, LI L C, ZHA G C, *et al*. Study on the correlation between accumulated temperature and induced-spawning efficiency of *Mastacembelus armatus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(19): 116-117 [陈方平, 李林春, 查广才, 等. 大刺鲃催产效率与积温的相关性研究. *安徽农业科学*, 2015, 43(19): 116-117]
- CHU Q Z, CHEN G, ZHANG J D, *et al*. Histological studies on digestive system of *Mastacembelus armatus*. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(2): 14-18 [初庆柱, 陈刚, 张健东, 等. 大刺鲃消化系统的组织学研究. *淡水渔业*, 2009, 39(2): 14-18]
- CINAR K, SENOL N, OZEN M R. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in astrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(42): 6874-6878
- DAVIS A M, UNMACK P J, Pusey B J, *et al*. Ontogenetic development of intestinal length and relationships to Australasian fish family (*Terapontidae*). *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13(1): 53-55
- FAN H P, QIU M L, ZHONG Q F, *et al*. Comparison of nutritional component of wild and cultured *Mastacembelus armatus* in different growth stages. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(8): 92-96 [樊海平, 邱曼丽, 钟全福, 等. 不同生长阶段野生和养殖大刺鲃营养成分的比较. *安徽农业科学*, 2018, 46(8): 92-96]
- FANG Z Y, CHEN X D, WU Y S, *et al*. Screening and characteristic analysis on di- / tri- / tetra - nucleotide- repeated microsatellites in *Mastacembelus armatus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 174-182 [房祖业, 陈晓东, 吴咏诗, 等. 大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)二、三、四碱基重复微卫星标记的筛选和特征分析. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 174-182]
- HE M F, YUAN D Q, CUI L F, *et al*. Study on fish community and impact factors in *Mastacembelus armatus* national aquatic reserve in Tingjiang River. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(1): 121-129 [何美峰, 袁定清, 崔利峰, 等. 汀江大刺鲃国家级水产种质资源保护区鱼类群落结构及其影响因子. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(1): 121-129]
- HONG Q Q, ZHUANG P, YANG G, *et al*. Feeding habits of *Lateolabrax maculatus* in Yangtze River estuary. *Acta*

- Ecologica Sinica, 2012, 32(13): 4182–4190 [洪巧巧, 庄平, 杨刚, 等. 长江口中国花鲈食性分析. 生态学报, 2012, 32(13): 4182–4190]
- HUANG Y C. Feeding habit and reproductive biology of *Mastacembelus armatus* in Tingjiang River. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(s1): 1–6 [黄永春. 汀江大刺鲃食性和繁殖生物学. 水产学报, 1999, 23(s1): 1–6]
- HYSOLP E J. Stomach contents analysis a review of methods and their application. Journal of Fish Biology, 1980, 17(4): 411–429
- KHAYYAMI H, ZOLGHARNEI H, SALAMAT N, et al. Morphological variability of *Liza klunzingeri* (Day, 1888) from Bandar abbas port and qeshm island in northeastern Persian gulf. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2015, 10(3): 191–198
- LI B, YANG X F, WANG J X, et al. Feeding ecology of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the South China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2019, 50(2): 337–346 [李波, 阳秀芬, 王锦溪, 等. 南海大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)摄食生态研究. 海洋与湖沼, 2019, 50(2): 337–346]
- LIN T T. Isolation of microsatellite markers and population genetic diversity analysis in *Mastacembelus armatus*. Master's Thesis of Guangzhou University, 2017, 1–3 [林婷婷. 大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)微卫星标记开发及野生群体遗传多样性分析. 广州大学硕士研究生学位论文, 2017, 1–3]
- LIU Q G, WU J Y, YAN K T, et al. Feed habits of *Pelteobagrus nitidus* in Dianshan Lake. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 859–866 [刘其根, 吴杰洋, 颜克涛, 等. 淀山湖光泽黄颡鱼食性研究. 水产学报, 2015, 39(6): 859–866]
- NELSON J S. Fish of the world. Hoboken: Wiley and Sons, 2006, 316–317
- PAN Q S, GUO G Q, FANG P Z, et al. The comparative anatomy studies on digestive system of 6 fish species of stomach-containing teleost in freshwater. Journal of Huazhong Agricultural University, 1996, 15(5): 463–469 [潘黔生, 郭广全, 方平之, 等. 6种有胃真骨鱼消化系统比较解剖的研究. 华中农业大学学报, 1996, 15(5): 463–469]
- PINKAS L, OLIPHANT M S, IVERSON L K. Food habits of albacore, bluefin tuna and bonito in California waters. Calif. Fish Game, 1971, 152: 105
- REN Y L, NIE Z L, YANG Z J, et al. Morphology and histology studies of the digestive system of *Schizothorax biddulphi*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 49–57 [任永丽, 聂竹兰, 杨志军, 等. 塔里木裂腹鱼消化系统形态学与组织学研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 49–57]
- SHU H, JIANG X L, YANG H Q, et al. Analysis of morphological variations among seven wild populations of *Mastacembelus armatus* in south china area. Journal of Guangzhou University, 2017, 16(3): 8–14 [舒琥, 江小璐, 杨华强, 等. 华南地区7个大刺鲃野生群体的形态差异分析. 广州大学学报, 2017, 16(3): 8–14]
- TIAN H F, HU Q M, LI Z. A high-quality denovo genome assembly of one swamp eel (*Mastacembelus armatus*) strain with Pacbio and Hi-C sequencing data. G3 Genes Genomes Genetics, 2021, (11): 1–9
- TUO Y, XIAO T Y, LI W C. Morphological and histological characteristics of the digestive system in *Spinibarbus caldwelli*. Journal of Hydroecology, 2019, 40(4): 83–92 [庾云, 肖调义, 李伟臣. 刺鲃幼鱼消化系统形态学和组织学研究. 水生态学杂志, 2019, 40(4): 83–92]
- WU B, WANG H H, MA B H, et al. Estimation of population parameters and stock assessment of *Mastacembelus armatus* in the Taojiang River, Xinfeng County, Jiangxi Province, China. Indian Journal of Animal Research, 2019, 1185
- WU B, WANG H H, ZENG Q X, et al. Population viability analysis and minimum viable population estimation of simulated population of *Mastacembelus armatus*. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(9): 107–112 [吴斌, 王海华, 曾庆祥, 等. 大刺鲃模拟种群生存力分析及最小可存活种群估算. 江西农业学报, 2020, 32(9): 107–112]
- XU X D, WANG H H, LI Y H, et al. Investigation on LDH and EST isozymes in different tissues of *Mastacembelus armatus*. Hunan Agricultural Sciences, 2020(9): 76–78 [徐先栋, 王海华, 李燕华, 等. 大刺鲃不同组织乳酸脱氢酶及酯酶同工酶研究. 湖南农业科学, 2020(9): 76–78]
- XUE L Z. Effects of exogenous hormone, temperature and parental weight on artificial induced spawning and incubation of *Mastacembelus armatus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(2): 333–341 [薛凌展. 外源激素、温度和亲本规格对大刺鲃人工催产及孵化的影响. 水生生物学报, 2018, 42(2): 333–341]
- XUE Y, JIN X, ZHANG B, et al. Seasonal, diel and ontogenetic variation in feeding patterns of small yellow croaker in the central Yellow Sea. Journal of Fish Biology, 2005, 67(1): 33–50
- YANG H Q, LI Q, SHU H, et al. Genetic diversity of *Mastacembelus armatus* southern china and surrounding areas based on ISSR analysis. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(1): 63–70 [杨华强, 李强, 舒琥, 等. 华南及邻近地区大刺鲃遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 2016, 40(1): 63–70]
- ZENG D, YEE Y T. Studies on digestive system and different feeding habits of some fishes in fresh water. Journal of Southwest Agricultural University, 1998, 20(4): 361–364 [曾端, 叶元土. 鱼类食性与消化系统结构的研究. 西南农业大学学报, 1998, 20(4): 361–364]
- ZENG Q X, FANG Y, ZENG X P, et al. The biological characteristics and artificial breeding technology of *Mastacembelus armatus*. Fisheries of China, 2016(3): 70–73 [曾庆祥, 方园, 曾学平, 等. 大刺鲃的生物学特性与人工繁殖技术. 中国水产, 2016(3): 70–73]
- ZHANG J, WANG Y B, LI X M, et al. Histological observation on digestive system of *Plectropomus leopardus* under industrialized culture. Marine Fisheries, 2015, 37(3): 233–243 [张杰, 王永波, 李向民, 等. 工厂化养殖条件下豹纹鳃棘鲈消化系统组织学的观察. 海洋渔业, 2015, 37(3): 233–243]
- ZHAO L L, CHEN Q L, YANG S, et al. Analysis of histological structure, the types and distribution of mucous cells of digestive tract in largemouth bass (*Micropterus samoides*). Journal of Sichuan Agricultural University, 2018, 36(4): 549–554 [赵柳兰, 陈侨兰, 杨淞, 等. 大口黑鲈消化道组织结构及粘液细胞的类型和分布. 四川农业大学学报,

- 2018, 36(4): 549–554]
- ZHAO W. Hydrobiology. Beijing: China Agriculture Press, 2005, 1–526 [赵文. 水生生物学. 北京: 中国农业出版社, 2005, 1–526]
- ZHAO Y H, OU Y J, LI J E, *et al.* Histology and distribution of mucous cells in digestive system of *Bahaba flavolabiata*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 80–86 [赵彦花, 区又君, 李加儿, 等. 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 80–86]
- ZHOU H Q, LI F, SHU H, *et al.* Analysis on morphological indexes and discrimination of male and female *Mastacembelus armatus*. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(1): 1–6 [周惠强, 李芬, 舒琥, 等. 大刺鲃雌雄个体形态差异分析. 广东海洋大学学报, 2019, 39(1): 1–6]

(编辑 陈 辉)

Research on Structure of Digestive Tract and Feeding Habits in *Mastacembelus armatus*

MA Benhe, WANG Haihua^①, XU Xiandong, LI Yanhua, WANG Mengjie, WU Bin, TAO Zhiying

(Jiangxi Fisheries Research Institute, Experimental Station of Lake Fishery Resources and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanchang Key Laboratory of Special Aquaculture Breeding and Healthy Aquaculture, Nanchang, Jiangxi 330039, China)

Abstract *Mastacembelus armatus* is primarily distributed in the Yangtze River and aquatic systems in the south of China, and is affiliated with *Mastacembelus*, Mastacembelidae, and Symbranchiformes. It has great economic value and breeding prospects owing to its high meat quality and balanced nutritional content. However, with overfishing and human influences on its habitat, the population of *M. armatus* has gradually decreased. We characterized the morphology and histology of the *M. armatus* digestive tract, aiming to investigate the relationship between the morphological and histological features of the digestive tract and its feeding behavior. Anatomy, paraffin sections, HE staining, and stomach content analysis were used to study samples collected from the Dongjiang River and Taojiang River in Ganzhou, Jiangxi Province. The results indicated that the digestive tract was composed of the oropharyngeal cavity, esophagus, stomach, and intestine. The oropharyngeal cavity contained the tongue, pharyngeal bone, and callous pad. The mucosal surface of the esophagus was covered with squamous epithelial cells, and the inner wall was full of longitudinal folds and secondary branches. The muscle layer consisted of striated and smooth muscles. The gastric wall and intestinal wall were composed of the mucosal layer, submucosa, muscle layer, and serosal layer. The mucosal layer was a single layer of the columnar epithelium, and the muscle layer was a smooth muscle that was divided into circular and longitudinal muscles. The “V-shaped” stomach was divided into the cardia, gastric body, and pylorus. The thickness of the muscular layer in each part was significantly different. There were no goblet cells in the mucosa, but many glands were located in the cardia or body of the stomach. The gastric pylorus muscle layer was extremely developed. There were two pyloric caeca between the stomach and intestine. The intestine had a curve and included three parts: The foregut, midgut, and hindgut. The average intestinal coefficient of *M. armatus* was 0.325 ± 0.050 . There were significant differences among the anterior, middle, and posterior intestinal villi. Nine prey items were identified in the digestive tract of *M. armatus*, including shrimp, aquatic insects, fish, snails, eggs, and plant detritus. The average percentage of the stomach fullness index was 2.86%. The prey diversity H' was 2.19, and prey dominance D was 0.33. Shrimp were dominant in the stomach contents, accounting for the relative importance index percentage of 97.75%, numerical percentage of 92.29%, and quality percentage of 73.07%. In conclusion, the histological structure of the digestive system of *M. armatus* is related to its function and feeding habits. This study provides a theoretical basis for wild resource conservation and nutrition research on *M. armatus*.

Key words *Mastacembelus armatus*; Digestive tract; Morphology; Histology; Feeding habits

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210206001

http://www.yykyxjz.cn/

王国浩, 董宣, 王一婷, 郭晓萌, 王德浩, 孟凡增, 黄捷. 患铁虾综合征罗氏沼虾眼柄转录组研究. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 64–74

WANG G H, DONG X, WANG Y T, GUO X M, WANG D H, MENG F Z, HUANG J. Study on the eyestalk transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii* suffering from iron prawn syndrome. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 64–74

患铁虾综合征罗氏沼虾眼柄转录组研究*

王国浩^{1,2} 董宣^{2①} 王一婷^{2,3} 郭晓萌^{2,4}
王德浩^{2,5} 孟凡增^{1,2} 黄捷^{1,2,6,7}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071;

3. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 4. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 山东 青岛 266109;

5. 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271000; 6. 亚太水产养殖中心网 泰国 曼谷 10900;

7. 江苏数丰水产种业有限公司 江苏 高邮 255654)

摘要 为探索罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)铁虾综合征(IPS)的分子机制,采用高通量测序平台(Illumina Hiseq-2500)分别对患 IPS 罗氏沼虾(IPS 虾)和正常罗氏沼虾开展转录组测序,进行生物信息学分析。结果显示,高通量测序共获得 56.42 G 高质量数据,拼接后得到 221 901 条单基因序列(unigene),长度范围为 201~30 985 bp,平均长度为 1572 bp, N50 长度为 2867 bp, N90 长度为 646 bp。将单基因序列分别在 Nr、Nt、Swissprot、KEGG、KOG、GO、PFAM 数据库进行序列比对及功能注释,103 570 条得到注释,其中,GO 数据库注释到的单基因序列最多。差异表达分析显示,2003 个基因在 IPS 虾眼柄中差异表达,包括 1209 个上调基因和 794 个下调基因,516 个基因被注释到 242 条 KEGG 通路中,翻译、信号转导和免疫系统富集的差异基因数目最多。催乳素、雌激素、胰岛素、促性腺激素释放激素、胰高血糖素、催产素、谷氨酸能突触、血清素能突触等与生殖调控相关激素的代谢过程在 IPS 虾与正常虾眼柄之间存在差异。此外,一些已被证明在免疫反应中起重要作用的基因在 IPS 虾眼柄中显著上调,如血管内皮生长因子受体 1、丝氨酸蛋白酶抑制剂 6、C 型凝集素、芳基硫酸酯酶 B、酚氧化酶原激活酶 2a、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 L、甲壳类抗菌肽 4 等。同时,注释到溶酶体、吞噬体、抗原处理与呈递、细胞凋亡、内吞作用等多条与免疫相关的途径,支持近期研究得出的罗氏沼虾 IPS 与病原感染相关的结论。本研究为解析罗氏沼虾 IPS 的成因和分子机制提供了数据支撑。

关键词 罗氏沼虾; 铁虾综合征; 眼柄; 转录组

中图分类号 S945.1+9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0064-11

* 山东省自然科学基金资助项目(ZR2019BC058)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS48)和中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2020TD39)共同资助 [This work was supported by Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2019BC058), China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS48), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39)]. 王国浩, E-mail: wgh15866019360@163.com

① 通讯作者:董宣,副研究员, E-mail: dongxuan@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-02-06, 收修改稿日期: 2021-03-24

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)是世界上个体最大的淡水虾类之一, 主要分布在东南亚、南亚国家及澳大利亚北部的淡水及咸淡水水域内(陈国孝, 1981)。因罗氏沼虾生物学特性优良, 其养殖效益明显, 被世界上许多国家和地区作为主要淡水养殖品种进行养殖。自1976年被引入我国以来, 罗氏沼虾养殖业发展迅速(李增崇, 1987)。目前, 我国罗氏沼虾年育苗量在250亿尾左右, 养殖面积约为30 000 hm², 2019年我国罗氏沼虾养殖总产量达139 609 t(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020), 从苗种、饲料、成虾、加工到国内外贸易总产值超过100亿元, 形成一条巨大的产业链, 我国已成为世界上罗氏沼虾养殖产量最大的国家。

然而, 2010年开始, 罗氏沼虾养殖业中出现了以性早熟和生长缓慢为主要特征的铁虾综合征(iron prawn syndrome, IPS)问题(孙华良, 2013)。所谓“铁虾”, 又称“铁壳虾”, 是养殖户对性成熟早、壳硬、长不大的罗氏沼虾的一种称呼。一般指罗氏沼虾长到4~6 cm时出现生长缓慢, 6~7 cm时已经性成熟, 雌虾抱卵, 雄虾的第2步足很长(袁锐等, 2017)。与水生动物大规模死亡事件不同, 罗氏沼虾患IPS后并不出现明显死亡情况, 仍正常吃料, 但饵料系数很高, 这与引起大规模死亡事件所造成的损失不同(孙华良, 2013, 袁锐等, 2017)。

甲壳动物的生殖发育受到多种激素和神经递质的调控。位于眼柄的X器官-窦腺复合体(XO-SG)是甲壳动物最重要的神经内分泌器官之一, 分泌包括性腺抑制激素(GIH)、蜕皮抑制激素(MIH)、甲壳动物高血糖激素(CHH)等多种激素及5-羟色胺、多巴胺等神经递质, 可调节甲壳动物的性腺发育、蜕皮、糖代谢、渗透压调节等生理过程(Nagaraju, 2011, Keller, 1992, 宋霞等, 2000)。但对于甲壳动物尤其是罗氏沼虾性腺发育的分子调控机制仍有待探索。

本研究采用Illumina HiSeq-2500平台对患IPS罗氏沼虾(IPS虾)和正常罗氏沼虾眼柄进行转录组测序, 建立IPS虾和正常罗氏沼虾眼柄的转录组文库, 鉴定可能在罗氏沼虾性早熟中起重要作用的差异表达基因和途径, 对了解罗氏沼虾IPS的成因和分子机制具有重要参考意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验用罗氏沼虾样品采集自江苏省的某罗氏沼虾养殖场。IPS虾样品取自表现出IPS症状的养殖池的偏小并有性成熟表现的个体, 共取4份虾(T1、T2、

T3和T4)的眼柄组织放入95%乙醇中干冰运送到实验室, 取样虾的生物学体长为4.8~5.5 cm; 正常罗氏沼虾样品取自放苗时间相近、饲养管理方式相当的未表现出IPS症状的养殖池, 共取3份虾(C1、C2和C3)的眼柄组织放入95%乙醇中干冰运送到实验室, 取样虾的生物学体长为6.5~7.0 cm。

1.2 转录组测序样品的核酸提取、文库构建和测序

提取4份IPS虾和3份正常罗氏沼虾眼柄样品的RNA, 使用1%琼脂糖凝胶检测RNA的完整性, 用NanoPhotometer[®] spectrophotometer (IMPLEN, 美国)和Qubit[®] RNA Assay Kit in Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies, 美国)检测RNA纯度和浓度, 用安捷伦生物分析仪2100系统(Agilent Technologie, 美国)的RNA Nano 6000检测试剂盒进一步评估RNA完整性。检测合格后, 每个样品取1.5 μg RNA用于文库构建和测序。RNA-Seq文库构建和测序由北京诺禾致源生物科技有限公司完成, 测序平台为Illumina HiSeq 2500, 采用PE250测序。

1.3 测序数据组装及功能注释

为保证信息分析质量, 去除原始序列中含有接头和低质量的序列后得到clean reads。采用Trinity(Grabherr *et al*, 2011)进行拼接, 将拼接所得的单基因序列(unigene)与Nr (NCBI non-redundant protein sequences)、Nt (NCBI nucleotide sequences)、PFAM (protein family)、KOG (eukaryotic ortholog groups)、Swissprot (a manually annotated and reviewed protein sequence database)、GO (gene ontology)和KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)七大数据库进行比对注释, 从而得到较为全面的基因功能注释信息和通路富集信息。

1.4 差异表达分析

使用RSEM (Li *et al*, 2011)软件的bowtie 2程序将每个样本的clean reads比对到Trinity拼接获得的转录组上。通过比对结果可得到每个基因的测序数目(read count), 并对其进行FPKM转换, 进而分析基因的表达水平。采用DEGseq (Anders *et al*, 2010)软件进行差异分析, 先对7个样本的数据进行矫正, 再分别对IPS虾的4个生物学重复和正常虾的3个生物学重复取平均值, 按组进行分析, 筛选阈值为padj<0.05。进一步使用Goseq (Young *et al*, 2010)软件在GO数据库中对差异表达基因进行分类注释; 使用KOBAS (Mao *et al*, 2005)软件对差异表达基因参与的代谢通路进行注释。

2 结果

2.1 转录组测序和序列组装

通过 RNA-Seq, 本研究分别构建了患 IPS 罗氏沼虾和正常罗氏沼虾眼柄的 cDNA 文库, 在 3 只正常虾和 4 只 IPS 虾眼柄中获得的 raw reads 及 clean reads 如表 1 所示。用 Trinity 软件将获得的 clean reads 组装, 共得到 221 901 条单基因序列, 对应 578 702 个转录本, 长度范围为 201~30 985 bp(图 1), 平均长度

为 1572 bp, N50 长度为 2867 bp, N90 长度为 646 bp。

2.2 基因功能注释和分类

为获得全面的基因功能信息, 使用 Nr、Nt、Pfam、KOG、Swiss-prot、KEGG 和 GO 数据库对得到的 221 901 条单基因序列进行基因功能注释, 分别有 69 094、26 846、78 844、30 744、55 540、30 354 和 79 503 条单基因序列得到了注释。除此之外, 有 8594 条单基因序列在 7 个数据库中都注释, 103 570 条单基因序列在至少 1 个数据库中注释成功(图 2)。

表 1 转录组数据统计表

Tab.1 Statistics of transcriptome sequencing data

样本 Sample	Raw reads 总数 Total raw reads	Clean reads 总数 Total clean reads	Q20/%	Q30/%	GC/%
C1	54 197 532	52 726 292	96.81	92.27	46.41
C2	50 760 528	48 434 636	96.64	91.99	45.74
C3	58 555 480	56 911 338	96.67	92.01	45.56
T1	57 446 544	55 158 724	96.36	91.13	45.85
T2	60 265 154	54 384 118	96.63	91.88	46.16
T3	54 337 372	51 460 866	97.08	92.74	45.45
T4	59 451 926	56 990 332	96.87	92.39	45.56

注: Q20、Q30 指 Phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比; GC 指碱基 G+C 的数量总和占总的碱基数量的百分比

Note: Q20 and Q30 refer to the percentage of bases with a Phred value greater than 20 and 30, respectively, to the total base; GC refers to the percentage of the total number of bases G + C to the total number of bases

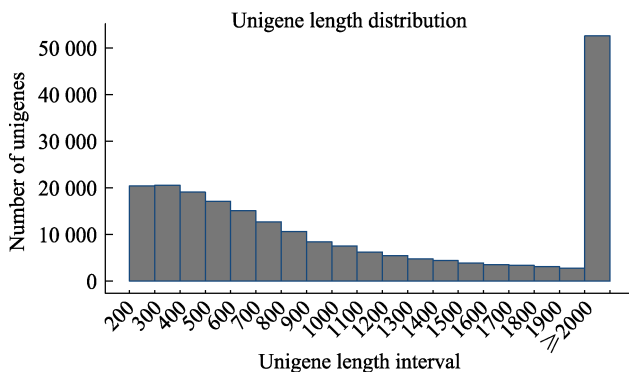


图 1 单基因序列长度分布

Fig.1 Length distribution of assembled unigene

与 Nr 数据库比对结果显示, 注释匹配的物种中, 内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)所占的比例最高, 达到 10.4%。其次是蚤状溞(*Daphnia pulex*)(5.2%)和赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)(3.3%)(图 3A)。KEGG 分类注释结果显示, 54 196 条单基因序列可分为细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、代谢、有机系统 5 个分支中所含的 32 条二级通路, 其中, 运输和分解代谢(2448)、信号转导(4802)、翻译(2092)、碳水化合物

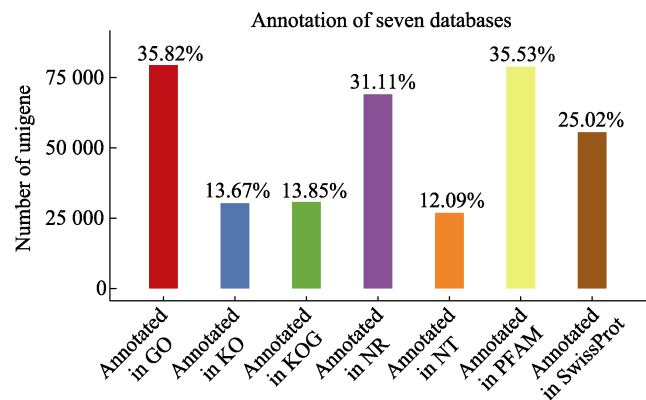


图 2 单基因序列注释结果

Fig.2 Annotation results of unigene

代谢(1423)、内分泌系统(2634)是单基因序列二级通路数目最多的 5 个分支(图 3B)。GO 数据库注释结果将注释成功的基因分为生物学过程、分子功能、细胞成分 3 个大类, 有 58 942 条单基因序列注释到生物学过程中, 64 920 条单基因序列注释到分子功能中, 46 242 条单基因序列注释到细胞成分中。3 个大类中注释单基因序列数目最多的功能分类为大分子代谢过程(28 058), 核酸结合(13 469)和细胞内部分(25 489)(图 3C)。

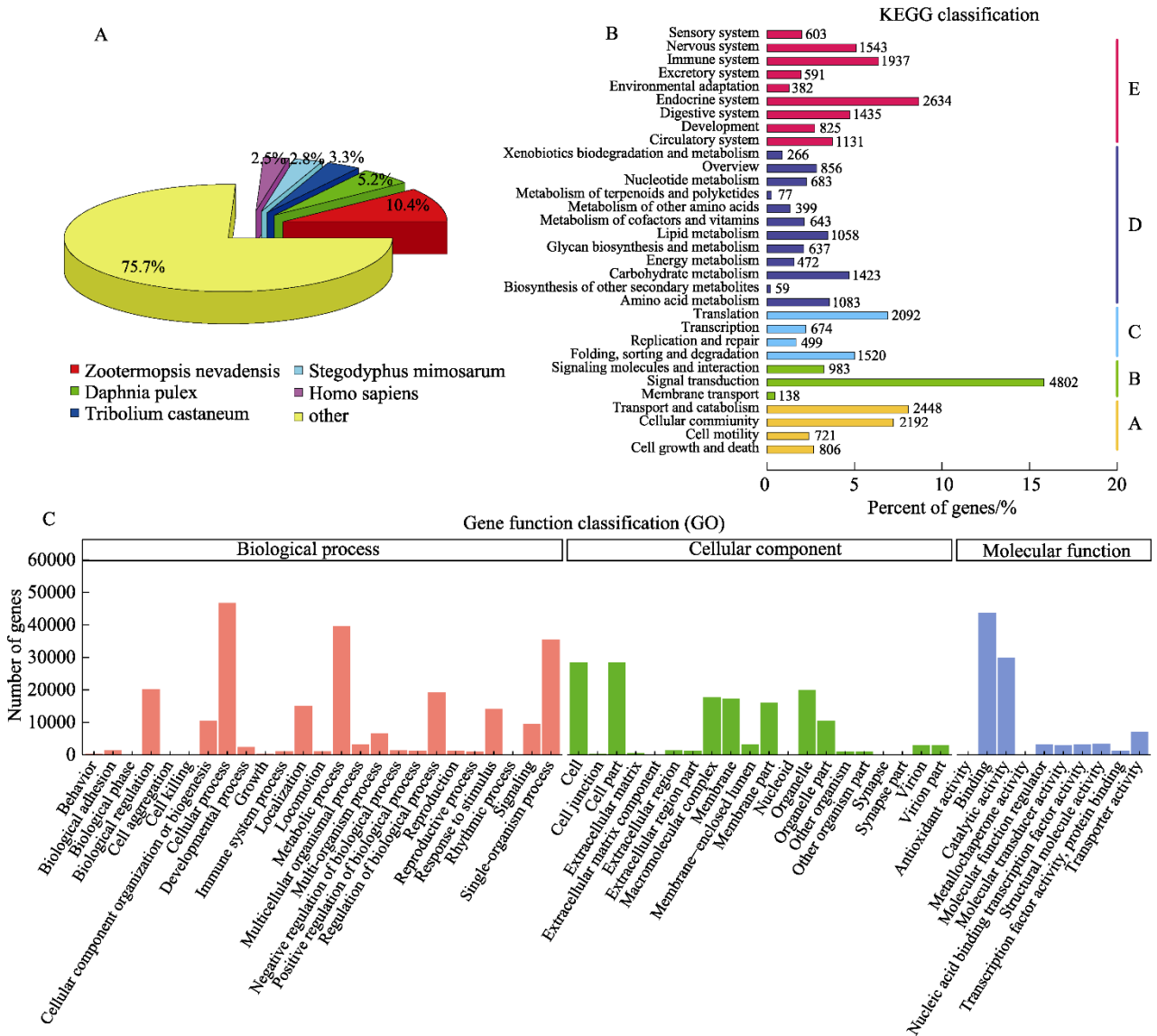


图 3 转录组序列功能注释和分类

Fig. 3 Functional annotation and classification of transcriptome sequences.

A: NR 数据库比对上的物种分布图; B: KEGG 分类图; C: GO 功能注释

A: Species distribution of Nr; B: KEGG classification map; C: Gene ontology (GO) assignment of assembled unigenes

2.3 差异表达基因鉴定

以 $padj < 0.05$ 为阈值筛选在 IPS 虾和正常虾眼柄中差异表达的基因, 结果见图 4。2003 个基因在 IPS 虾和正常虾眼柄中差异表达, 其中, 1209 个基因在 IPS 虾眼柄中上调, 794 个基因在 IPS 虾眼柄中下调。

GO 功能分类结果显示, 808 个差异基因被注释到 3024 条 GO 条目, 44 条显著富集, 其中, 生物学过程中显著富集 28 条, 分子功能富集 13 条, 细胞成份富集 3 条。蛋白质代谢过程在生物学过程中含有最多的单基因序列, 肽酶活性在分子功能中含有最多的单基因序列, 胞外区在细胞成分中含有最多的单基因序列(图 5)。

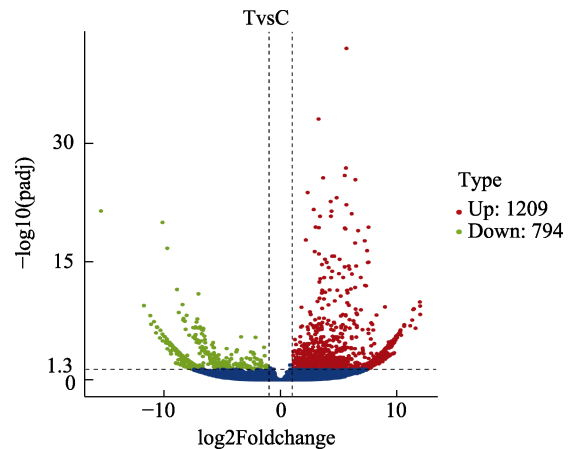


图 4 基因差异表达分析火山图

Fig. 4 Volcano plot of differentially expressed genes

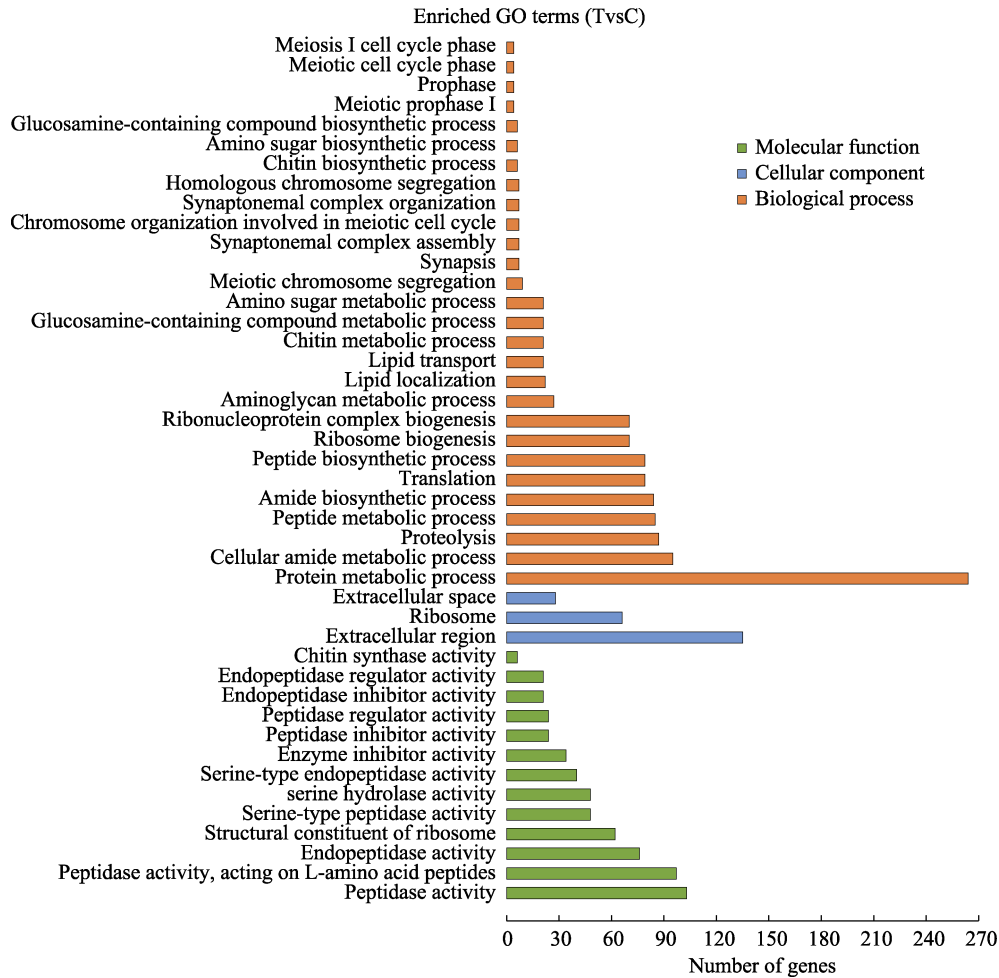


图 5 差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 5 GO assignment of differentially expressed genes

差异基因 KEGG 富集分析结果显示, 516 个差异基因被注释到 242 条 KEGG 通路, 其中核糖体(ribosome)、金黄色葡萄球菌感染(*Staphylococcus aureus* infection)、脂肪消化吸收(fat digestion and absorption)、胰腺分泌物(pancreatic secretion)、矿物吸收(mineral absorption)、产生 IgA 的肠道免疫网络(intestinal immune network for IgA production) 6 条通路显著富集。在 KEGG 5 大类通路中, 翻译(81)、信号转导(56)和免疫系统(55)富集的差异基因数目最多(图 6)。

2.4 生殖和免疫相关通路及差异表达基因鉴定

根据 KEGG 功能富集分析结果及已发表文献, 242 条 KEGG 通路中与生殖调控相关的通路包括类固醇激素生物合成(steroid biosynthesis)、催乳素信号通路(prolactin signaling pathway)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、胰岛素信号通路(insulin signaling pathway)、促性腺激素释放激素信号通路(GnRH signaling pathway)、甲状腺激素信号通路

(thyroid hormone signaling pathway)、胰高血糖素信号通路(glucagon signaling pathway)、催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)、甲状腺激素合成(thyroid hormone synthesis)、谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)、血清素能突触(serotonergic synapse)等。从这些通路中鉴定出 C-4 甾醇甲基氧化酶(C-4 sterol methyl oxidase)、UDP-葡萄糖 4-差向异构酶(UDP-glucose 4-epimerase)、Ras 相关 GTPase (Ras-related GTPase)、胆碱转运体(choline transporter)、70 kDa 热休克蛋白(heat shock 70 kDa protein)、雌激素相关受体蛋白(estrogen-related receptor protein)等基因下调表达, L-苏氨酸 3-脱氢酶(L-threonine 3- dehydrogenase)、锌指蛋白(zinc finger protein)、雷帕霉素靶点(target of rapamycin)、NAD 依赖性差向异构酶(NAD dependent epimerase)、90kDa 热休克蛋白 β (heat shock protein 90kDa beta)、谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase)、核受体共抑制因子 1 (nuclear receptor corepressor 1)、芳香烃受体核转运体(aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator)等基因上调表达。

同时,发现溶酶体(lysosome)、抗原处理与呈递(antigen processing and presentation)、吞噬体(phagosome)、细胞凋亡(apoptosis)、过氧化物酶体(peroxisome)、B 细胞受体信号通路(B cell receptor

signaling pathway)、Toll 样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)等多条与免疫相关的通路(表 2)。从这些途径中筛选出血管内皮生长因子受体 1、丝氨酸蛋白酶抑制剂 6、C 型凝集素 2 (C-type lectin2)、

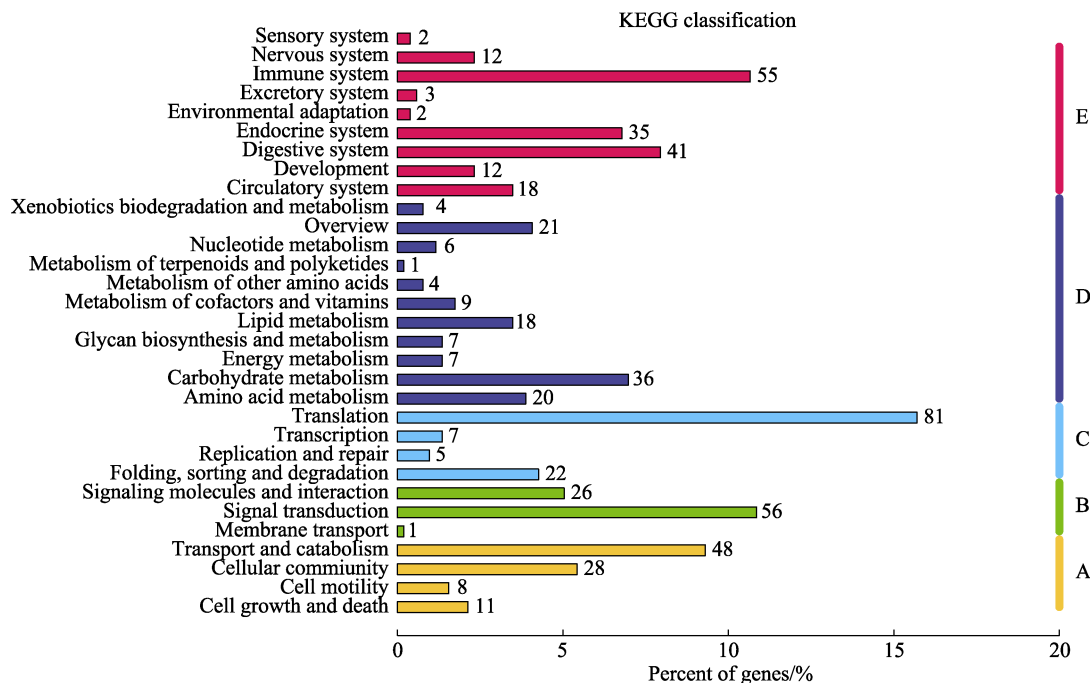


图 6 差异表达基因 KEGG 富集分析
Fig. 6 KEGG assignment of differentially expressed genes

表 2 与免疫相关的 KEGG 通路

Tab. 2 KEGG pathways associated with immune

通路编号 Pathway ID	通路名称 Pathway name	差异表达基因数量 Number of DEGs
ko04142	溶酶体 Lysosome	17
ko04151	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	17
ko04145	吞噬体 Phagosome	15
ko04210	细胞凋亡 Apoptosis	14
ko04066	HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	14
ko04144	内吞作用 Endocytosis	13
ko04612	抗原处理和呈递 Antigen processing and presentation	11
ko04014	Ras 信号通路 Ras signaling pathway	11
ko04015	Rap1 信号通路 Rap1 signaling pathway	9
ko04146	过氧化物酶体 Peroxisome	6
ko04120	泛素介导的蛋白质水解 Ubiquitin mediated proteolysis	6
ko04010	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	6
ko04152	AMPK 信号通路 AMPK signaling pathway	6
ko04062	趋化因子信号通路 Chemokine signaling pathway	5
ko04022	cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	5
ko04630	Jak-STAT 信号通路 Jak-STAT signaling pathway	4
ko04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性 Natural killer cell mediated cytotoxicity	4
ko04068	FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	4

续表 2

通路编号 Pathway ID	通路名称 Pathway name	差异表达基因数量 Number of DEGs
ko04020	钙信号通路 Calcium signaling pathway	4
ko04662	B 细胞受体信号通路 B cell receptor signaling pathway	3
ko04666	Fc γ R 介导的吞噬作用 Fc gamma R-mediated phagocytosis	3
ko04215	凋亡-多物种 Apoptosis-multiple species	2
ko04150	mTOR 信号通路 mTOR signaling pathway	2
ko04623	胞浆 DNA 传感途径 Cytosolic DNA-sensing pathway	2
ko04640	造血细胞系 Hematopoietic cell lineage	2
ko04370	血管内皮生长因子信号通路 VEGF signaling pathway	2
ko04620	Toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	1
ko04660	T 细胞受体信号通路 T cell receptor signaling pathway	1
ko04621	NOD 样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	1
ko04064	NF- κ B 信号通路 NF-kappa B signaling pathway	1

芳基硫酸酯酶 B、组织蛋白酶 B (cathepsin B)、甲壳类抗菌肽 4 (crustin 4)、锌指 CCCH 型抗病毒蛋白 1 样(zinc finger CCCH-type antiviral protein 1-like)、酚氧化酶原激活酶 2a (prophenoloxidase-activating enzyme 2a)等多个在免疫反应中起重要作用的差异表达基因在 IPS 虾的眼柄中上调表达(表 3)。

3 讨论

为探索罗氏沼虾 IPS 的分子机制,本研究对患 IPS 罗氏沼虾和正常罗氏沼虾眼柄进行转录组测序。KEGG 富集分析结果显示,在免疫系统中差异表达的基因的数量仅次于翻译和信号转导。根据已发表的文献和 KEGG 富集分析结果,鉴定出大量在机体免疫反应中起重要作用的通路和基因,提示可能存在病原微生物的感染。同时,KEGG 和 GO 富集分析结果表明,正常虾和 IPS 虾眼柄中的各种激素和神经递质的合成和代谢存在差异。

1998 年日本和越南报道了罗氏沼虾存在性早熟所致的生长缓慢(Hien *et al*, 1998)。在 2008 年印度就曾报道池塘养殖罗氏沼虾存在生长缓慢的问题,可能就是 IPS 的类似情况(Paulraj *et al*, 2008)。国内外多个团队对罗氏沼虾“铁虾”开展相关研究,Kutty 等(2001)和 Banu 等(2015)通过一系列遗传学研究发现,体形较大的蓝爪雄虾或黄瓜雄虾及体形较小的小雄虾 3 种雄虾的基因有明显的差异性;周梦颖(2014)研究表明,温度、盐度和养殖密度可显著影响罗氏沼虾的生长及性腺发育。温度可影响罗氏沼虾眼柄中性腺抑制激素的表达(Qiao *et al*, 2015);密度胁迫显著影响中国对虾(*Penaeus chinensis*)的生长及抗氧化能力(张海恩等,

2020)。周俊名等(2017)通过遗传多样性、水质、病原感染状况及白斑综合征病毒(WSSV)感染实验,探讨池养罗氏沼虾生长缓慢的原因,推测和水质、种质差异或退化等因素相比,感染特定病原引起罗氏沼虾生长缓慢的可能性更大。Gao 等(2021)研究发现,一株阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)与罗氏沼虾生长缓慢有关。本研究通过流行病学调查发现,正常虾苗在和 IPS 虾混养后会出现 IPS 症状,提示 IPS 具有传染性,推测 IPS 可能是由病原感染引起。

甲壳动物主要依靠先天免疫系统来抵御病原微生物的入侵,需要通过模式识别蛋白来识别病原,进而激发机体的免疫反应(Wang *et al*, 2013)。C 型凝集素和凝集素是模式蛋白的一种,在本研究中,这 2 个基因在 IPS 虾眼柄中的表达量显著增加。之前的研究也呈现相似的结果,罗氏沼虾在感染罗氏沼虾野田村病毒(MrNV)、阴沟肠杆菌后,C 型凝集素的表达量也显著上升(Pasookhush *et al*, 2019; Gao *et al*, 2020)。溶酶体和吞噬体是与免疫相关的 KEGG 通路中富集到差异表达基因数目最多的 2 条通路,组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 L 在这 2 条通路中起重要作用。组织蛋白酶是一种溶酶体内肽酶,可分解细胞和胞外蛋白质,在免疫反应中起重要作用(Turk *et al*, 2001)。越来越多的研究证明,组织蛋白酶 L 在甲壳动物免疫防御中起作用,如罗氏沼虾在感染 MrNV、WSSV、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)后,组织蛋白酶 L 在血淋巴中的表达量显著增加(Arockiaraj *et al*, 2013b),中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在感染鳃弧菌(*V. anguillarum*)后,组织蛋白酶 L 在血淋巴中的表达量也显著增加(Li *et al*, 2010)。甲

表 3 显著上调的免疫相关差异表达基因
Tab.3 Immune-related DEGs up-regulated significantly

基因 Gene	转录本 ID Transcript ID	Fold change	物种 Species
组织蛋白酶 B Cathepsin B	Cluster-17476.63251	2.373 2	青虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>
组织蛋白酶 L Cathepsin L	Cluster-17476.49977	7.315 2	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
组织蛋白酶 A Cathepsin A	Cluster-17476.83082	1.232 6	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>
芳基硫酸酯酶 B Arylsulfatase B	Cluster-17476.91956	7.886 3	含羞草绒蛛 <i>Stegodyphus mimosarum</i>
Ras 样 GTP 结合蛋白 RhoL Ras-like GTP-binding protein RhoL	Cluster-17476.36127	1.873 6	比罗粗角猛蚁 <i>Cerapachys biroi</i>
血管内皮生长因子受体前体 Vascular endothelial growth factor receptor precursor	Cluster-17476.124116	1.585 2	凡纳对虾 <i>Penaeus vannamei</i>
血管内皮生长因子受体 1 样亚型 X1 Vascular endothelial growth factor receptor 1-like isoform X1	Cluster-17476.124408	9.814 6	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>
锌指 CCCH 型抗病毒蛋白 1 样 Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1-like	Cluster-17476.122639	3.172 9	绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>
精子相关抗原 7 样蛋白 Sperm-associated antigen 7-like protein	Cluster-17476.109130	7.335 9	含羞草绒蛛 <i>Stegodyphus mimosarum</i>
甲壳类抗菌肽 4 Crustin 4	Cluster-17476.2778	2.886 0	青龙虾 <i>Panulirus japonicus</i>
C 型凝集素 5 C-type lectin 5	Cluster-17476.124399	7.969 4	墨吉对虾 <i>Penaeus merguensis</i>
C 型凝集素 4 C-type lectin 4	Cluster-17476.30627	5.635 6	帝王斑蝶 <i>Danaus plexippus</i>
C 型凝集素 2 C-type lectin 2	Cluster-17476.20352	3.540 7	日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>
酚氧化酶原激活酶 2a Prophenoloxidase-activating enzyme 2a	Cluster-17476.133530	4.722 2	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>
丝氨酸蛋白酶抑制剂 6 Serine proteinase inhibitor 6	Cluster-17476.17621	8.082 2	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>
丝氨酸蛋白酶残基因 Serine proteinase stubble	Cluster-17476.102420	7.564 4	内华达古白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>
纤胶凝蛋白样蛋白 1 Ficolin-like protein 1	Cluster-17476.89007	7.802 0	软尾太平蝾蛄 <i>Pacifastacus leniusculus</i>
干扰素诱导的超大 GTPase1 样蛋白 Interferon-induced very large GTPase 1-like	Cluster-17476.17550	5.384 0	白头鹰 <i>Haliaeetus leucocephalus</i>
细胞增殖上调因子样蛋白 Up-regulator of cell proliferation-like	Cluster-17476.118036	4.814 0	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>
血细胞稳态相关蛋白 Hemocyte homeostasis-associated protein	Cluster-17476.119332	7.448 8	软尾太平蝾蛄 <i>Pacifastacus leniusculus</i>
雷帕霉素的靶标 Target of rapamycin	Cluster-17476.81152	1.680 2	中国对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>

壳类抗菌肽 4 是抗菌肽的一种,可阻止外来病原微生物的入侵,在海洋无脊椎动物先天免疫防御中起重要作用(Tincu *et al*, 2004)。罗氏沼虾在感染 WSSV、传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)及嗜水气单胞菌后,血淋巴中甲壳类抗菌肽的表达量增加(Arockiaraj *et al*, 2013a)。日本对虾(*Penaeus japonicus*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)在感染 WSSV 后也会出现类似结果(Hipolito *et al*, 2014, Antony *et al*, 2011),表明甲壳类抗菌肽对病毒入侵有一定的抵抗作用。

在虾类养殖业中通过单侧眼柄切除来促进亲虾

的性腺发育(水燕等, 2013), 切除眼柄后, GIH 等激素分泌量下降进而促进亲虾性腺的发育。罗氏沼虾在性腺开始发育前,能量都集中在生长上,当性腺开始发育后,部分能量被用来支持性腺发育,进而影响生长。本研究的 KEGG 通路富集结果显示,类固醇激素、催乳素、雌激素、促性腺激素释放激素、胰岛素、血清素(5-羟色胺)等多种调控性腺发育激素的合成和代谢在 IPS 虾与正常虾间表现出差异,然而,在上述通路的 27 个差异表达基因中,仅有 8 个在 IPS 虾眼柄中的表达量增加。这可能是由于 IPS 虾的性腺发育

已接近晚期,和正常虾相比,对这些激素的需求量减少,需要开展多个时间点的多组学分析,以明确上述表达在 IPS 虾中的作用和机制。

本研究对患 IPS 罗氏沼虾和正常罗氏沼虾的眼柄进行了转录组分析,除鉴定出与生殖调控相关的差异表达基因及途径外,还发现多个在甲壳动物先天免疫反应中起重要作用的基因在患 IPS 罗氏沼虾眼柄中的表达量上升,表明可能有病原体的感染。进一步的病原学研究表明,已知 8 种虾类致病病原均不是罗氏沼虾 IPS 致病病原,而一种新发现的传染性早熟病毒(infectious precocity virus, IPV)与 IPS 的发生密切相关(Dong *et al*, 2021), 本研究支持这一研究结论。本研究为解析罗氏沼虾铁虾综合征的成因和分子机制奠定了基础。

参 考 文 献

- ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11: R106
- ANTONY S P, SINGH I S B, SUDHEER N S, *et al*. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*, 2011, 216(1/2): 184–194
- AROCKIARAJ J, GNANAM A J, MUTHUKRISHNAN D, *et al*. Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Immune characterization. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013a, 34(1): 109–118
- AROCKIARAJ J, GNANAM A J, MUTHUKRISHNAN D, *et al*. *Macrobrachium rosenbergii* cathepsin L: Molecular characterization and gene expression in response to viral and bacterial infections. *Microbiological Research*, 2013b, 168(9): 569–579
- BANU M R, SIRAJ S S, CHRISTIANUS A, *et al*. Genetic variation among different morphotypes of the male freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Reports*, 2015, 1: 15–19
- Bureau of Fisheries and Fishery Administration under Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nation Fishery Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020. Beijing: China Agriculture Press, 2020, 158 [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, 158]
- CHEN G X. *Macrobrachium rosenbergii*. *Chinese Journal of Zoology*, 1981(3): 35–37 [陈国孝. 罗氏沼虾. 动物学杂志, 1981(3): 35–37]
- DONG X, WANG G H, HU T, *et al*. A novel virus of *Flaviviridae* associated with sexual precocity in *Macrobrachium rosenbergii*. *mSystems*, 2021, 6(3): e00003–21
- GAO X J, JIANG Z Y, ZHANG S M, *et al*. Transcriptome analysis and immune-related genes expression reveals the immune responses of *Macrobrachium rosenbergii* infected by *Enterobacter cloacae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 101: 66–77
- GAO X J, ZHOU Y F, ZHU X H, *et al*. *Enterobacter cloacae*: A probable etiological agent associated with slow growth in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2021, 530: 735826
- GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, *et al*. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 644–652
- HIEN T T T, MINH T H, PHUONG N T, *et al*. Current status of freshwater prawn culture in the Mekong River Delta of Vietnam. *JIRCAS Journal*, 1998, 6: 89–100
- HIPOLITO S G, SHITARA A, KONDO H, *et al*. Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 461–469
- KELLER R. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia*, 1992, 48(5): 439–448
- KUTTY R, KURUP B M. Primary intrinsic factors governing the heterogenous individual growth in male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii*. *International Conference on Fisheries*, 2001, 165–173
- LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323
- LI W W, JIN X K, HE L, *et al*. Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 1010–1018
- LI Z C. Biology and artificial culture of *Macrobrachium rosenbergii*. *Chinese Journal of Zoology*, 1987, 22(2): 5–8 [李增崇. 罗氏沼虾生物学及人工养殖. 动物学杂志, 1987, 22(2): 5–8]
- MAO X Z, CAI T, OLYARCHUK J G, *et al*. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*, 2005, 21(19): 3787–3793
- NAGARAJU G P. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(1): 3–16
- PASOOKHUSH P, HINDMARCH C, SITHIGORNGUL P, *et al*. Transcriptomic analysis of *Macrobrachium rosenbergii* (giant fresh water prawn) post-larvae in response to *M. rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) infection: De novo assembly and functional annotation. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 762
- PAULRAJ A, PEIXOTO S, VASUMATHI C, *et al*. Ovarian histology of stunted pond-reared *Macrobrachium rosenbergii*

- females. *Aquaculture Research*, 2008, 39(1): 64–69
- QIAO H, XIONG Y W, ZHANG W Y, *et al.* Characterization, expression, and function analysis of gonad-inhibiting hormone in Oriental River prawn, *Macrobrachium nipponense* and its induced expression by temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 185: 1–8
- SHUI Y, SHI Y H, XU Z H, *et al.* Advances of growth and development in crustaceans induced by eyestalk ablation. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(21): 124–126, 135 [水燕, 史永红, 徐增洪, 等. 眼柄切除快速诱导甲壳动物生长发育研究进展. *广东农业科学*, 2013, 40(21), 124–126, 135]
- SONG X, ZHOU K Y. Development of neurohormones in the eyestalk of crustacea. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(4): 39–43 [宋霞, 周开亚. 甲壳类的眼柄神经激素. *动物学杂志*, 2000, 35(4): 39–43]
- SUN H L. Gaoyou *Macrobrachium rosenbergii* encounters iron shrimp. *Fisheries Advance Magazine*, 2013(7), 39–41 [孙华良. 高邮罗氏沼虾遭遇铁虾困局. *海洋与渔业(水产前沿)*, 2013(7), 39–41]
- TINCU J A, TAYLOR S W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(10): 3645–3654
- TURK V, TURK B, TURK D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 2001, 20(17): 4629–4633
- WANG X W, WANG J X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 981–989
- YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, *et al.* Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14
- YUAN R, ZHANG C H, CHEN H, *et al.* Phenomenon and research progress on prevention and control of “iron shell” in giant freshwater prawn. *Fisheries Science*, 2017, 36(3): 383–390 [袁锐, 张朝晖, 陈辉, 等. 罗氏沼虾“铁壳”现象及其防控研究进展. *水产科学*, 2017, 36(3): 383–390]
- ZHANG H E, HE Y Y, LI J, *et al.* Effects of stocking density on growth, water quality, and antioxidant system of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 140–149 [张海恩, 何玉英, 李健, 等. 密度胁迫对中国对虾幼虾生长、抗氧化系统功能及水质指标的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 140–149]
- ZHOU J M, DAI X L, JIANG F, *et al.* The preliminary analysis of the reasons for the poor growth of *Macrobrachium rosenbergii* in pond. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(6): 853–861 [周俊名, 戴习林, 蒋飞. 池养罗氏沼虾生长缓慢原因初步分析. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(6): 853–861]
- ZHOU M Y. Effect of stocking density, salinity and temperature on sex differentiation and early gonadal development on *Macrobrachium rosenbergii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [周梦颖. 养殖密度、盐度和温度对罗氏沼虾性别分化和早期性腺发育的影响. *上海海洋大学硕士研究生学位论文*, 2014]

(编辑 马璀艳)

Study on the Eystalk Transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii* Suffering from Iron Prawn Syndrome

WANG Guohao^{1,2}, DONG Xuan^{2①}, WANG Yiting^{2,3}, GUO Xiaomeng^{2,4},
WANG Dehao^{2,5}, MENG Fanzeng^{1,2}, HUANG Jie^{1,2,6,7}

- (1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao, Shandong 266071, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China;
4. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;
5. College of Animal Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271000, China;
6. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok 10900, Thailand;
7. Jiangsu Shufeng Aquatic Seed Industry Co., Ltd., Gaoyou, Jiangsu 255654, China)

Abstract Since 2010, iron prawn syndrome (IPS), characterized by sexual precocity and slow growth, has seriously affected the development of *Macrobrachium rosenbergii* aquaculture. To investigate the molecular mechanism of IPS, we performed transcriptome sequencing of *M. rosenbergii* with and without IPS using next-generation sequencing technology. This resulted in a total of 56.42 G of high-quality data being obtained. A total of 221 901 unigenes were obtained, and the length range was 201~30 985 bp. The average length was 1572 bp. The length of N50 was 2867 bp, and the length of N90 was 646 bp. Sequence alignment and functional annotation of the unigenes were conducted in the Nr, Nt, Swissprot, KEGG, KOG, GO, and PFAM databases. A total of 103 570 unigenes were annotated, and the GO database had the most annotated unigenes. The differential expression analysis revealed that 2003 genes, including 1209 upregulated genes and 794 downregulated genes, were differentially expressed in the eyestalks of *M. rosenbergii* with IPS. Consequently, 516 genes were mapped into 242 KEGG pathways, and the number of differentially expressed genes in translation, signal transduction, and the immune system was the largest. Many reproduction-related pathways were identified, including prolactin, estrogen, insulin, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), glucagon, oxytocin, glutamatergic synapses, serotonergic synapses, and other metabolic processes related to reproductive regulation. In addition, some differentially expressed genes that have been proven to play an essential role in the immune response were upregulated in the eyestalks of *M. rosenbergii* with IPS, such as vascular endothelial growth factor receptor 1, serine proteinase inhibitor 6, C-type lectin, arylsulfatase B, prophenoloxidase-activating enzyme 2a, cathepsin B, cathepsin L, and crustin 4. At the same time, several immune-related pathways, such as lysosome, phagosome, antigen processing and presentation, apoptosis, endocytosis, and many others, were annotated. These results support the conclusion from the recent study that a pathogen is associated with IPS in *M. rosenbergii*. This study provides a foundation for understanding the causes and molecular mechanisms of IPS in *M. rosenbergii*.

Key words *Macrobrachium rosenbergii*; Iron prawn syndrome; Eystalk; Transcriptome

① Corresponding author: DONG Xuan, E-mail: dongxuan@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210302001

http://www.yykxjz.cn/

段健诚, 胡吉卉, 沈宇航, 邓高威, 高威, 牟华, 张庆起, 高焕. 虾肝肠胞虫感染对脊尾白虾肠道菌群的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 75–83

DUAN J C, HU J H, SHEN Y H, DENG G W, GAO W, MU H, ZHANG Q Q, GAO H. Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection on the intestinal microflora of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 75–83

虾肝肠胞虫感染对脊尾白虾肠道菌群的影响*

段健诚¹ 胡吉卉¹ 沈宇航¹ 邓高威¹ 高威¹
牟华^{1,2,3} 张庆起⁴ 高焕^{1,2,3①}

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 江苏 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台
江苏 南京 210014; 4. 连云港赣榆佳信水产开发有限公司 江苏 连云港 222100)

摘要 为探究虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)感染对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)肠道菌群的影响,本研究基于 16S rRNA 基因的测序结果,对感染 EHP 的脊尾白虾肠道菌群进行了分析。结果显示,感染虾与健康虾肠道菌群差异较大,且其肠道菌群结构多样性显著低于健康虾。研究发现,病虾中归属于变形菌门(Proteobacteria)的脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)、未分类蓝细菌科(unidentified Cyanobacteria)、支原体科(Mycoplasmataceae)和未分类 α 变形菌科(unidentified Alphaproteobacteria)为优势菌,而归属于厚壁菌门(Firmicutes)的乳杆菌科(Lactobacillaceae)、双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)及噬几丁质杆菌科(Chitinophagaceae)细菌在健康虾中占据优势地位。EHP 侵蚀导致感染虾肠道内潜在致病菌显著增加($P<0.05$),增加了其他疾病的易感性。此外,通过 Tax4Fun 功能预测,发现感染虾肠道菌群主要用于新陈代谢,从而抵抗 EHP 侵染,维持机体正常功能;健康虾肠道菌群则多用于个体生长与环境信息处理,进而保证生长与存活。本研究从虾肠道菌群结构方面入手,进一步探究了 EHP 感染对脊尾白虾肠道菌群的影响,以期对 EHP 的防治提供帮助。

关键词 虾肝肠胞虫; 脊尾白虾; 肠道菌群多样性; 功能预测

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0075-09

肠道微生物在对虾生长发育过程中发挥调控宿主营养代谢与抵抗病原菌侵染的作用,同时对其免疫功能也有重要影响(Rungrasamee *et al.*, 2016)。而病原微生物的侵染则会破坏肠道菌群结构,使其功能失常,从而引发其他疾病。研究表明,肠道菌群结构及

其代谢物的改变与甲壳类的生长和疾病有着密切联系,不同生长阶段和不同健康状态的虾体肠道菌群丰度与多样性存在一定差异,健康虾的肠道菌群多样性显著高于病虾(Xiong *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2019)。

* 国家重点研发计划(2018YFD0901302)、江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金(SH20191203)和江苏省优势学科建设工程项目共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901302), Open Project Fund of Jiangsu Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment (SH20191203), and Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)].

段健诚, E-mail: djcemp@163.com

① 通讯作者: 高 焕, 教授, E-mail: huanmr@163.com

收稿日期: 2021-03-02, 收修改稿日期: 2021-04-12

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是我国池塘单养和虾蟹混养模式常见的一种小型经济虾类,主要分布于黄渤海海域的浅海近岸水域,具有广温广盐、环境适应性强、繁殖能力强、生长快等优点(Zhang *et al.*, 2015)。然而,随着高密度养殖模式与混合养殖模式的发展,病害的发生呈上升趋势,严重制约了虾蟹混养等养殖模式(Xu *et al.*, 2010; 李新苍等, 2012; 王元等, 2013)。虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是一种高传染性细胞内寄生的微孢子虫,主要寄生于虾的肝胰腺和肠道中,可通过摄取宿主细胞内的 ATP 进行繁殖(Santhoshkumar *et al.*, 2017; Boakye *et al.*, 2017; Aranguren *et al.*, 2017; 程东远等, 2018)。EHP 孢子肉眼不可见,感染 EHP 的个体前期无明显感染症状,患病后期可发现群体内病虾体型大小不一,总体生长迟缓甚至停止生长(刘雅梅等, 2017; Singh *et al.*, 2018)。近年来,在脊尾白虾养殖过程中也有发现 EHP 感染,对脊尾白虾养殖业造成了一定的损失。

研究健康虾和病虾肠道菌群结构之间的差异及功能有助于阐明疾病的致病机理,指示宿主的健康状态(郁维娜等, 2018)。利用高通量测序技术对病虾的肠道微生物和免疫基因分析,可以从生物学角度对肠道菌群结构、免疫应答以及虾体生长之间的相互作用机制进行阐释(Zhou *et al.*, 2019)。蒋葛等(2019)研究表明,患有急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道菌群结构单一,弧菌属细菌在病虾肠道中占据优势地位。本研究拟采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,对感染 EHP 的脊尾白虾与健康虾肠道菌群进行 16S rRNA 基因测序,比较其肠道菌群结构多样性与群落差异,并利用 Tax4Fun 对肠道群落功能进行预测,进一步探究 EHP 感染对脊尾白虾肠道菌群的影响,以期 EHP 的防治提供帮助。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 EHP 人工感染

健康虾取自江苏省南通市如东县养殖池塘,体长为(4.5±0.3) cm,体重为(1.3±0.3) g。运回实验室后,随机选取 3 尾,利用巢式 PCR 方法检测是否感染 EHP,在水温 24℃、盐度 28、pH 7.9±0.2 的条件下暂养 1 周。暂养期间连续曝气,每日按体重的 5%投喂 2 次人工配合饲料(海大集团海龙牌),并及时清除残饵和排泄物,暂养结束后饥饿 24 h。

随机抽取 60 尾健康个体用于人工感染,健康组与感染组各 30 尾分别置于 50 L 的塑料箱中,水温为 24℃,盐度为 28, pH 为 7.9±0.2,感染期间连续曝气。健康组正常投喂人工配合饲料,感染组投喂新鲜的 EHP 病虾肝胰腺及肌肉组织。病虾来源于实验室扩大培养的感染 EHP 脊尾白虾,体长为(4.8±0.5) cm,体重为(1.7±0.6) g,投喂前将病虾肠道去除,剪碎肝胰腺和肌肉组织,并充分混匀,按体重的 5% 每日投喂 2 次,投喂 2 h 后及时清理残饵及粪便。每隔 2 d 换水 1 次,换水量为总量的 1/3。连续感染 10 d 后,随机选取健康虾与感染虾各 9 尾,在无菌环境下用无菌刀片与镊子分别取其肝胰腺和肠道组织,3 尾虾组织混为 1 个样品,共 3 个平行,肝胰腺样品用于 PCR 检测,肠道样品用于高通量测序,样品置于-80℃ 保存备用。

1.2 EHP 巢式 PCR 检测

取 25 mg 虾肝胰腺组织,按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]说明书进行 DNA 抽提,DNA 洗脱溶解后于-20℃ 保存。

根据 GenBank KF362130.1 设计巢式 PCR 引物(外引物: EX-F: AAA AGC CAT TGA GTT TGT TG, EX-R: TTG CCT TCT CCC TCC TGT; 内引物: In-F: TAG CGG AAC GGA TAG GGA, In-R: CCA GCA TTG TCG GCA TAG)(已验证特异性); PCR 反应体系(南京诺唯赞)为 10 μL,包含 3.8 μL ddH₂O、5 μL 2×Taq Mix II、EX-F/In-F 和 EX-R/In-R 各 0.4 μL、0.4 μL DNA。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。第 2 轮 PCR 模板为第 1 轮产物,体系和程序与第 1 轮相同。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.3 肠道总 DNA 提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 法提取健康虾(J 组)和感染虾(G 组)肠道总 DNA,之后用 1% 琼脂糖凝胶电泳与分光光度计检测 DNA 纯度与浓度,将样品用无菌水稀释至 1 ng/μL 作 DNA 模板,用 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs)和高效高保真酶,PCR 扩增引物为: 515-F (5'-GTG CCA GCM CCG CGG TAA-3')和 806-R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')。所得 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,采用 QIAquick 胶回收试剂盒(QIAGEN, 德国)回收目的条带。

1.4 上机测序与测序数据处理

使用 TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina) 构建文库, 文库质检合格后使用 NovaSeq 6000 进行上机测序(北京诺禾致源生物信息科技有限公司)。对下机数据使用 FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对样品的 reads 进行拼接、过滤, 得到高质量 Tags, 参照 QIIME (quantitative insights into microbial ecology, V1.7.0, <http://qiime.org/>) 流程对 Tags 进行质控, 去除嵌合体序列后得到有效数据 (Caporaso *et al.*, 2010)。

1.5 OTU 聚类注释与多样性分析

利用 Uparse 软件 (V7.0.1001, <http://www.drive5.com>) 对样品的全部 Tags 以 97% 的一致性将序列聚类成 OTUs (operational taxonomic units) (Haas *et al.*, 2011)。根据聚类结果, 筛选出 OTUs 中出现频率最高的序列尾代表序列, 参考 Mothur 方法与 SILVA132 (<http://www.arb-silva.de/>) 的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析 (设定阈值为 0.8~1) (Wang *et al.*, 2007; Edgar, 2013)。

利用 QIIME (V1.9.1) 软件计算 Observed-OTUs、Chao1、Shannon、Simpson 和 ACE 等指数, 使用 R (V2.15.3) 软件绘制稀释曲线和 Rank abundance 曲线, 并进行 Alpha 多样性和 Beta 多样性指数组间差异分析。

1.6 肠道菌群功能预测

采用 Tax4Fun 对肠道菌群功能进行预测, 基于最小 16S rRNA 序列相似度的最近邻居法实现。经提取 KEGG 数据库原核生物全基因组 16S rRNA 基因序列与 SILVA SSU Ref NR 数据库进行比对并建立数据库, 将 KEGG 数据库原核生物全基因组功能信息通过 UProC 和 PAUDA 两种方法进行注释并对应到 SILVA 数据库中, 实现 SILVA 数据库功能注释。随后以 SILVA 数据库序列为参考序列聚类出 OTU, 进而获取功能注释信息 (Abhauer *et al.*, 2015)。

2 结果与分析

2.1 EHP 感染检测结果

对健康虾与感染虾进行巢式 PCR 检测, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 (图 1), 胶回收产物测序后通过 GenBank BLAST 同源检索分析, 结果与 GenBank KF362130.1 序列一致。

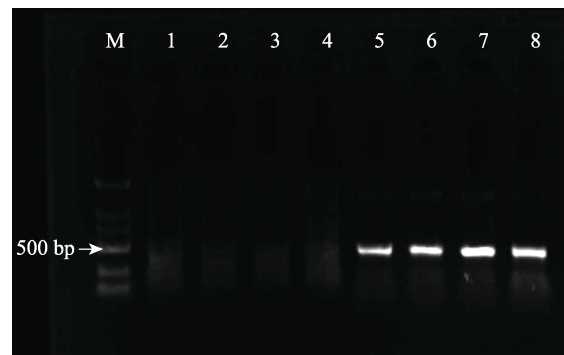


图 1 样品 EHP 检测

Fig.1 EHP detection of samples

M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1: 阴性对照; 2~4: 健康虾; 5: 阳性对照; 6~8: 感染虾
M: DL 2000 DNA marker; 1: Negative control; 2~4: Healthy shrimp; 5: Positive control; 6~8: Diseased shrimp

2.2 肠道菌群结构分析

实验虾肠道微生物样品在 97% 的相似性水平上共获得 2314 个 OTUs (472 451 个 reads)。归属于 35 个门、55 个纲、122 个目、233 个科、542 个属、318 个种。如图 2a 所示, 感染虾中主要菌群为变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、软壁菌门 (Tenericutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 其相对丰度分别为 92.64%、2.39%、1.88%、0.88% 和 0.24%, 占细菌总量的 98%。感染虾中变形菌门与拟杆菌门丰度显著高于健康虾 ($P < 0.05$), 而厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门丰度显著低于健康虾 ($P < 0.05$)。

如图 2b 和图 2c 所示, 感染虾中优势菌为劳森菌属 (*Lawsonia*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、未分类 α 变形菌属 (unidentified Alphaproteobacteria)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和沙雷氏菌属 (*Serratia*) 等, 主要归属于脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、弧菌科 (Vibrionaceae)、莫拉式菌科 (Moraxellaceae) 和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 分别归属于变形菌门和厚壁菌门。感染虾中变形菌门丰度显著高于健康虾 ($P < 0.05$), 而厚壁菌门丰度则显著低于健康虾 ($P < 0.05$)。

根据所有样本在科水平的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前 35 的科, 根据其在每个样本中的丰度信息, 从物种和样本 2 个层面进行聚类, 绘制成热图 (图 3), 感染虾共有 5 个优势菌科, 健康虾共有 30 个优势菌科, 分别归属于 7 个门。健康虾的 30 个优势菌科中共有 4 个潜在益生菌科, 分别是乳杆菌科 (Lactobacillaceae)、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)、

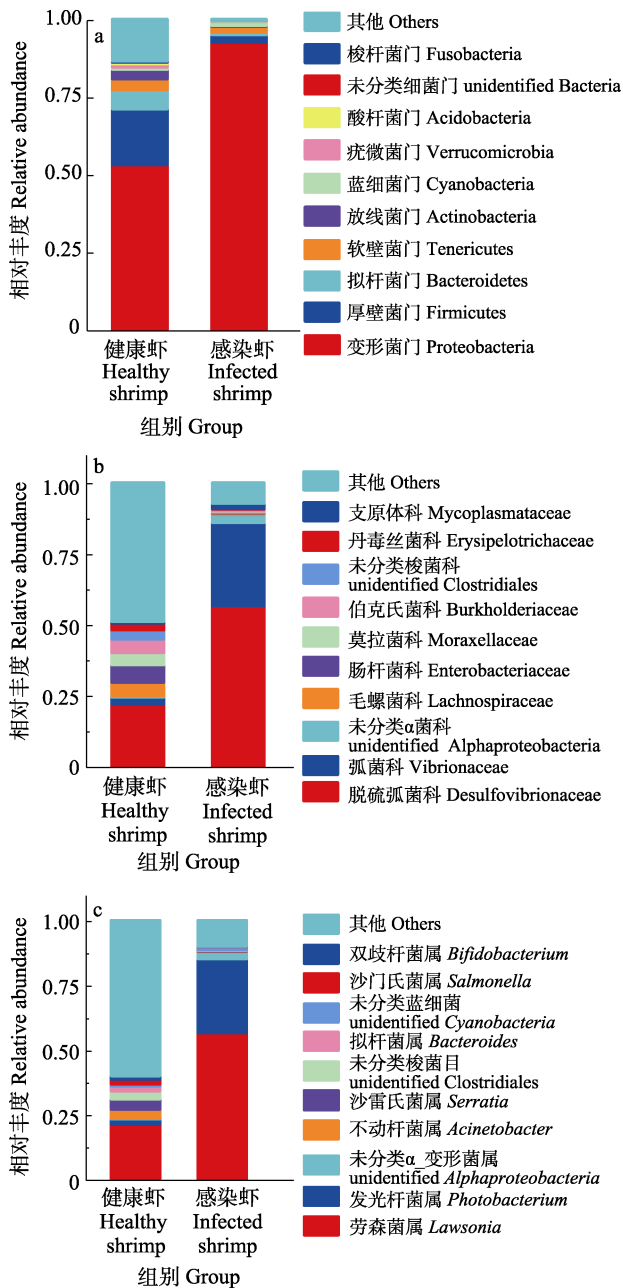


图2 健康虾与感染虾肠道主要细菌物种相对丰度
($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Fig.2 Relative abundance of intestinal bacteria in healthy and infected shrimp ($n=3, \bar{x} \pm SD$)

- a: 细菌门水平上物种相对丰度; b: 细菌科水平上物种相对丰度; c: 细菌属水平上物种相对丰度
a: Relative abundance of species at bacterial phylum level;
b: Relative abundance of species at bacterial family level;
c: Relative abundance of species at bacterial genus level

芽孢杆菌科和噬几丁质杆菌科(Chitinophagaceae)。感染虾中5个优势菌科分别是脱硫弧菌科、弧菌科、未分类蓝细菌科(unidentified Cyanobacteria)、支原体科(Mycoplasmataceae)和未分类 α 变形菌科(unidentified

Alphaproteobacteria)。

2.3 肠道菌群结构多样性分析

对不同样品在97%一致性阈值下的多样性分析指数进行统计分析(表1),结果显示,样品覆盖率大于99%。对Shannon指数、Simpson指数、Chao1指数和ACE指数进行比较,感染组各指数均低于健康组,通过分析比较可以发现,感染组个体的肠道菌群多样性显著低于健康虾($P<0.05$)。

稀释曲线和等级聚类曲线可反映测序数据量的合理性,直观反映样品中物种的丰富度和均匀度(Lundberg *et al*, 2013)。图4a为样品稀释曲线,由图4a可见,稀释曲线趋于平缓,说明测序数据合理。图4b为样品等级聚类曲线,曲线越宽说明样品丰富度越高,越平坦说明样品分布越均匀。由图4b可见,与健康虾相比,感染虾的曲线更窄、更平缓。这与 α 多样性分析结果一致,可见感染虾肠道菌群多样性与丰富度显著低于健康虾($P<0.05$)。

2.4 肠道菌群功能预测

功能注释聚类热图(Level 1)的结果显示(图5),健康虾肠道菌群的主要功能包括细胞过程、未分类、环境信息处理、有机系统等,感染虾肠道菌群的主要功能包括新陈代谢、人类疾病和遗传信息处理。*T-test*检验结果显示,二组之间并无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 虾肠道菌群结构分析

肠道菌群在虾体健康生长发育与非特异性免疫调控过程中扮演重要角色,可促进虾体对营养的吸收及新陈代谢,为其抵抗病害侵袭提供屏障(Nie *et al*, 2017; Libertucci *et al*, 2018)。研究表明,凡纳滨对虾肠道菌群中丰度较高的菌群为变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门,主要包括弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和蓝细菌(*Cyanobacteria*)等,同时与虾体不同健康状况有关(Zheng *et al*, 2016; Landsman *et al*, 2019; Zeng *et al*, 2020),这与本研究结果相似。本研究中,感染虾与健康虾肠道菌群丰度差异较大,感染虾肠道优势菌多归属于变形菌门与拟杆菌门,其丰度显著高于健康虾,而健康虾中厚壁菌门丰度则显著高于感染虾。研究发现,脊尾白虾肠道优势菌群为变形菌门和厚壁菌门,其中丰度较高的有假单胞菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、弧菌属、赤杆菌属(*Erythrobacter*)等(沈辉

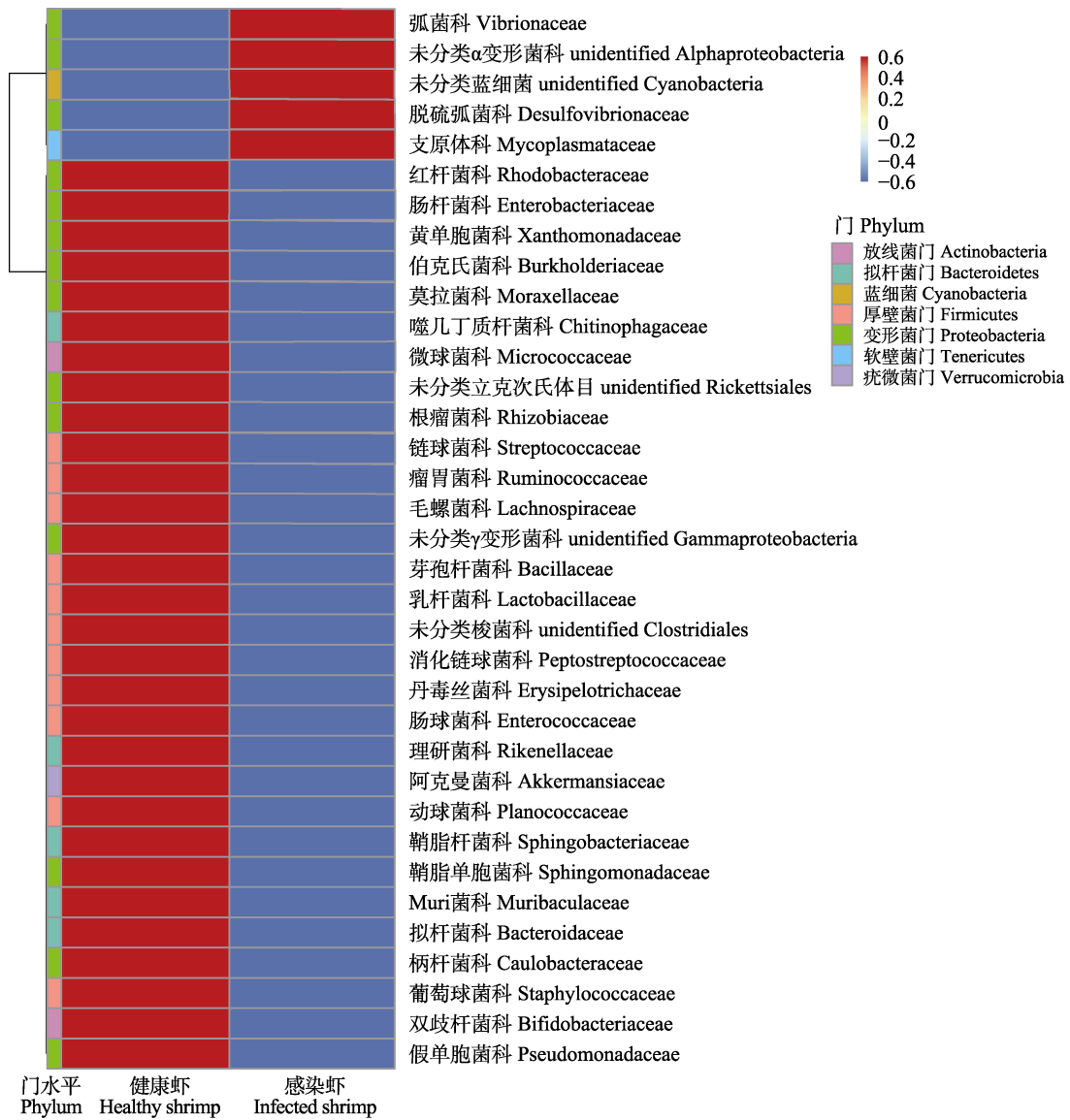


图 3 健康虾与感染虾物种丰度聚类图(科水平)($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Fig.3 Cluster heatmap of healthy shrimp and infected shrimp (Family level)($n=3, \bar{x} \pm SD$)

表 1 α 多样性统计表($n=3; \bar{x} \pm SD$)

Tab.1 Alpha diversity indices table ($n=3; \bar{x} \pm SD$)

α 多样性指数 Alpha diversity index	平均值 Mean		标准差 Standard deviation		显著性 Significance
	健康虾 Healthy shrimp	感染虾 Infected shrimp	健康虾 Healthy shrimp	感染虾 Infected shrimp	
物种数量 Observed species	1 347.000	651.667	33.941	44.837	0
Shannon	6.430	1.739	1.255	0.358	0.007
Simpson	0.925	0.347	0.059	0.061	0.002
Chao1	1 403.138	824.373	13.359	52.378	0.001
ACE	1 412.952	867.725	4.806	57.204	0.001

等, 2015)。本研究中, 弧菌科(变形菌纲)丰度在感染虾中属于优势菌, 弧菌病可对虾类产生较大的伤害, 破坏其组织器官, 造成非特异性免疫与代谢功能下降, 导致大量死亡(Khimmakthong *et al*, 2017)。

Xiong 等(2014)研究表明, 从科水平上可简单有效对虾体健康进行预测。本研究对科水平 OTUs 分类热图进行分析, 发现感染虾中优势潜在致病菌为脱硫弧菌科、弧菌科、未分类蓝细菌科、支原体科和未命

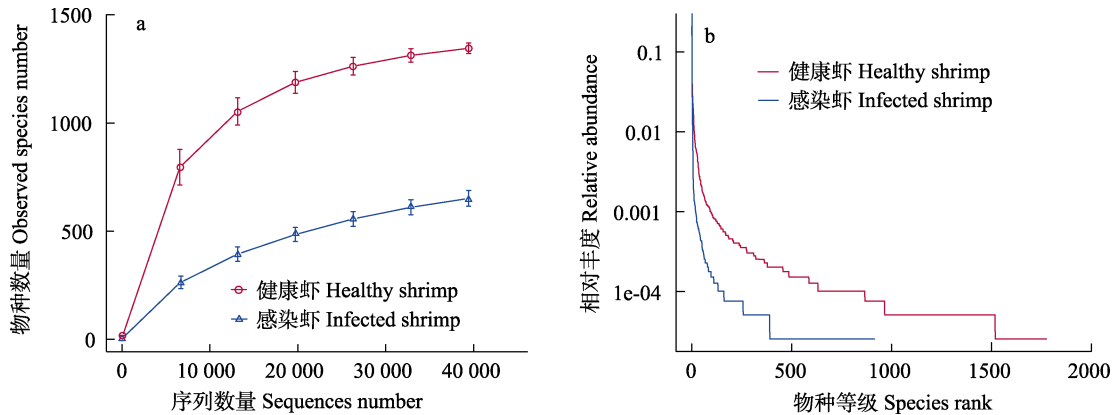


图4 健康虾与感染虾样品物种多样性曲线($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Fig.4 Species diversity curve of healthy and infected shrimp samples ($n=3, \bar{x} \pm SD$)

a: 样品稀释曲线; b: 等级聚类曲线

a: Rarefaction curve of sample; b: Rank abundance of sample

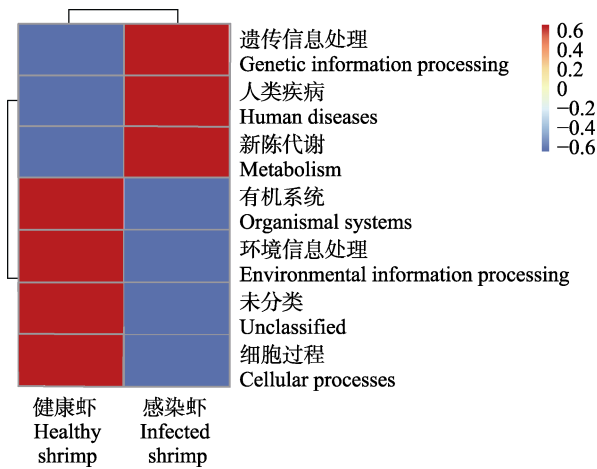


图5 Tax4Fun 功能注释聚类热图(Level 1)($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Fig.5 Tax4Fun functional annotation cluster heatmap (Level 1)($n=3, \bar{x} \pm SD$)

名 α 变形菌科, 其弧菌科丰度显著高于健康虾 ($P < 0.05$), 可能是 EHP 的侵染破坏了虾肠道菌群结构, 益生菌群的抑菌功能遭破坏, 以至于致病菌群占据优势, 增加了弧菌病的发病几率(Zokaeifar *et al*, 2014; Santhoshkumar *et al*, 2017; Aranguren *et al*, 2017)。健康虾中的乳杆菌科、芽孢杆菌科、双歧杆菌科的某些属可分泌多种胞外酶和抗菌肽, 不仅可抑制致病菌繁殖, 还可改善水质, 提高水产动物的非特异性免疫(Zokaeifar *et al*, 2014; Lugli *et al*, 2017)。因此, 推测在 EHP 感染初期向养殖水体或饲料中添加这些益生菌有望减缓或抑制 EHP 的传播(宁梓健等, 2020)。

3.2 肠道微生物多样性分析

Zhou (2019)研究发现, “棉花状”的凡纳滨对虾肠道与健康虾肠道中优势菌群分属于变形菌门、软壁菌

门和拟杆菌门, 健康虾肠道菌群多样性显著高于病虾组, 与本研究结果相似。吴金凤等(2016)通过高通量测序技术对凡纳滨对虾肠道及养殖水体进行检测, 同样发现健康虾肠道微生物多样性显著高于病虾。在本研究中, 受 EHP 感染的个体肠道微生物多样性显著低于健康个体, 表明 EHP 的侵染对脊尾白虾肠道菌群多样性造成了一定的影响。EHP 多和其他疾病共同发现, 肠道菌群结构遭到破坏后, 变形菌门丰度显著增加, 厚壁菌门丰度显著降低, 导致潜在致病菌暴发几率增加, 感染虾更容易暴发弧菌病等疾病(Aranguren *et al*, 2017)。

虾肠道菌群多样性关系到虾体肠道群落生态功能稳定性, 多样性越高说明肠道菌群越稳定, 抗病能力越强(金若晨等, 2020)。本研究中, 健康虾肠道内也存在多种潜在致病菌, 但并没有出现患病症状, 这与健康虾肠道菌群结构有一定关联。通过物种稀释曲线与等级聚类曲线可以看出, 健康虾肠道菌群多样性更高, 这与 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数等多样性指数所表达的结果也一致。因此, 健康虾肠道菌群结构更为完整, 对致病菌的抑制能力更强。

3.3 肠道功能预测

虾体感染 EHP 后群体间个体差异较大, 出现生长缓慢甚至停止生长的现象。通过 Tax4Fun 功能预测, 发现感染虾的肠道主要功能为新陈代谢和人类疾病, 可能由于感染虾分配更多的能量用于抵抗 EHP 的侵染和其他疾病, 减少了用于生长相关的能量; 而从健康虾的功能预测中可以看出, 其将更多的能量用于生长和对环境的适应, 从而保证安全存活与繁殖(Zhou *et al*, 2019)。

4 结论

综上所述, 健康虾与感染 EHP 虾的肠道菌群差异较大, 其中感染虾肠道菌群结构多样性显著低于健康虾。通过 16S rRNA 基因测序分析, 发现病虾中归属于变形菌门的脱硫弧菌科、弧菌科、未分类蓝细菌科、支原体科和未分类 α 变形菌科为优势菌, 而归属于厚壁菌门的乳杆菌科、双歧杆菌科、芽孢杆菌科和噬几丁质菌科细菌在健康虾中占据优势地位。由此可见, EHP 的侵蚀破坏了脊尾白虾肠道菌群结构, 导致潜在致病菌丰度增加。

参 考 文 献

- ARANGUREN L F, HAN J E, TANG K F J. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2017, 471: 37–42
- ABHAUER K P, WEMHEUER B, DANIEL R, *et al.* Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2882–2884
- BOAKYE D W, JAROENLAK P, PRACHUMWAT A, *et al.* Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within Enterocytozoonidae microsporidia. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(5): 2077–2089
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336
- CHENG D Y, QIU L, SONG Z L, *et al.* Differences between populations and tissues of *Litopenaeus vannamei* infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 83–92 [程东远, 邱亮, 宋增磊, 等. 凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 83–92]
- EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998
- GAO S, PAN L Q, HUANG F, *et al.* Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 2019, 499: 109–118
- HAAAS B J, GEVERS D, EARL A M, *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494–504
- JIANG G, SHEN H, WAN X H, *et al.* Difference analysis of intestinal flora between healthy *Litopenaeus vannamei* and acute hepatopancreatic necrosis syndrome *L. vannamei*. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 35(1): 142–148 [蒋葛, 沈辉, 万夕和, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合症病虾与健康虾肠道优势菌群比较分析. *江苏农业学报*, 2019, 35(1): 142–148]
- JIN R C, JIANG M, SUN S Y, *et al.* Microbial community in the *Litopenaeus vannamei* intestine and its aquaculture environment. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 2037–2054 [金若晨, 江敏, 孙世玉, 等. 凡纳滨对虾养殖环境及肠道微生物群落特征分析. *水产学报*, 2020, 44(12): 2037–2054]
- KHIMMAKTHONG U, SUKKARUN P. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 113: 107–112
- LANDSMAN A, ST-PIERRE B, ROSALES-LEIJA M, *et al.* Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 2019, 7(4): 93
- LI X C, ZHOU J F, FANG W H, *et al.* Development and application of an economical real-time PCR for WSSV detection and quantification in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1554–1562 [李新苍, 周俊芳, 房文红, 等. 实用 WSSV 定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究. *水产学报*, 2012, 36(10): 1554–1562]
- LIBERTUCCI J, YOUNG V B. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nature Microbiology*, 2018, 4(1): 35–45
- LIU Y M, QIU L, CHENG D Y, *et al.* The relationship of body length and weight in the *Litopenaeus vannamei* populations detected *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 96–103]
- LUGLI G A, MILANI C, TURRONI F, *et al.* Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC Genomics*, 2017, 18: 568
- LUNDBERG D S, YOURSTONE S, MIECZKOWSKI P, *et al.* Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 999–1002
- NIE L, ZHOU Q J, QIAO Y, *et al.* Interplay between the gut microbiota and immune responses of ayu (*Plecoglossus altivelis*) during *Vibrio anguillarum* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 68: 479–487
- NING Z J, JIANG H B, LIU Q, *et al.* Genome-wide prediction and analysis of secreted proteins of *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 165–173 [宁梓健, 姜宏波, 刘琦, 等. 虾肝肠胞虫全基因组分泌蛋白的预测分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 165–173]
- RUNGRASSAMEE W, KLANCHUI A, MAIBUNKAEW S, *et al.* Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp

- and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 12–19
- SANTHOSHKUMAR S, SIVAKUMAR S, VIMAL S, *et al.* Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(4): 529–539
- SHEN H, WAN X H, HE P M, *et al.* Bacterial community structure in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis. *Microbiology*, 2015, 42(10): 1922–1928 [沈辉, 万夕和, 何培民, 等. 脊尾白虾肠道微生物菌群结构. *微生物学通报*, 2015, 42(10): 1922–1928]
- SINGH M, SINGH P. *Enterocytozoon hepatopenaei*: A microsporidian in the midst of serious threat to shrimp aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2018, 6(6): 936–939
- WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267
- WANG Y, FANG W H, ZHOU J F, *et al.* Pathogenic and pathological analysis of the muscular microsporidiosis of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 726–733 [王元, 房文红, 周俊芳, 等. 脊尾白虾肌肉微孢子虫病的病原和病理分析. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(5): 726–733]
- WU J F, XIONG J B, WANG X, *et al.* Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(2): 611–621 [吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用. *应用生态学报*, 2016, 27(2): 611–621]
- XIONG J B, WANG K, WU J F, *et al.* Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6911–6919
- XIONG J B, ZHU J L, ZHANG D M. The application of bacterial indicator phylotypes to predict shrimp health status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(19): 8291–8299
- XU W J, XIE J J, SHI H, *et al.* Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture*, 2010, 300(1/2/3/4): 25–31
- YU W N, DAI W F, TAO Z, *et al.* Characterizing the compositional and functional structures of intestinal micro-flora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 399–409 [郁维娜, 戴文芳, 陶震, 等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究. *水产学报*, 2018, 42(3): 399–409]
- ZENG S Z, KHORUAMKID S, KONGPAKDEE W, *et al.* Dissimilarity of microbial diversity of pond water, shrimp intestine and sediment in aquaculture system. *AMB Express*, 2020, 10: 180
- ZHANG C S, LI Z G, LI F H, *et al.* Effects of starvation on survival, growth and development of *Exopalaemon carinicauda* larvae. *Aquaculture Research*, 2015, 46(9): 2289–2299
- ZHENG Y F, YU M, LIU Y, *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 2016, 451: 163–169
- ZHOU L, CHEN C Z, XIE J, *et al.* Intestinal bacterial signatures of the “cotton shrimp-like” disease explain the change of growth performance and immune responses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 92: 629–636
- ZOKAEIFAR H, BABAEI N, SAAD C R, *et al.* Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 68–74

(编辑 马瑾艳)

Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* Infection on the Intestinal Microflora of *Exopalaemon carinicauda*

DUAN Jiancheng¹, HU Jihui¹, SHEN Yuhang¹, DENG Gaowei¹, GAO Wei¹,
MU Hua^{1,2,3}, ZHANG Qingqi⁴, GAO Huan^{1,2,3}①

(1. School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 2. Jiangsu Marine Biological Industry Technology Collaborative Innovation Center, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 3. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing, Jiangsu 210014, China; 4. Lianyungang Ganyu Jiaxin Aquatic Products Development Co., Ltd., Lianyungang, Jiangsu 222100, China)

Abstract *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a highly infectious intracellular parasite that primarily parasitizes the hepatopancreas, intestine, and muscle of shrimp. It can reproduce by consuming ATP from the host cells, resulting in growth retardation or even growth cessation of the host and increasing individual differences within a population. In recent years, we discovered EHP infection in the breeding process of *Exopalaemon carinicauda* culture, which has caused losses to the *E. carinicauda* culture industry. Intestinal microorganisms, which play a very important role in the growth and development of shrimp, can regulate nutritional metabolism, resist pathogen infection, and also have an important impact on the host immune function. Therefore, it is helpful to clarify the pathogenesis of EHP by exploring the differences and functions of the intestinal microflora between healthy and diseased shrimp. To screen potential probiotics for inhibiting or slowing down the spread of EHP, this study analyzed the intestinal microflora structure of shrimp based on 16s rRNA gene sequencing, and further explored the effect of EHP infection on the intestinal microflora of *E. carinicauda*. The results showed that the intestinal microflora of infected shrimp was significantly different from that of healthy individuals, and the structural diversity of the intestinal microflora was significantly lower than that of the healthy shrimp. Proteobacteria, including Desulfovibrionaceae, Vibrionaceae, unidentified Cyanobacteria, Mycoplasmataceae, and unidentified Alphaproteobacteria were the dominant bacteria in diseased shrimp, whereas Firmicutes including Lactobacillaceae, Bifidobacteria, Bacillaceae, and Chitinophagaceae were dominant in healthy shrimp. Infection with EHP significantly increased the potential pathogenic bacteria level in the intestines of the infected shrimp ($P < 0.05$), and increased their susceptibility to other diseases. In addition, through the Tax4Fun function prediction, we found that the primary function of the intestinal microflora in infected shrimp was metabolism to resist EHP infection, whereas the intestinal microflora of healthy shrimp was primarily involved in individual growth and environmental information processing to ensure growth and survival.

Key words *Enterocytozoon hepatopenaei*; *Exopalaemon carinicauda*; Intestinal microflora diversity; Function prediction

① Corresponding author: GAO Huan, E-mail: huanmr@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210306001

http://www.yykxjz.cn/

魏威, 何玉英, 李朝霞, 周雨欣, 李健, 谢拥军. 中国对虾 *ATG5* 基因的克隆及其在 pH、碳酸盐碱度胁迫下的表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 84–94

WEI W, HE Y Y, LI Z X, ZHOU Y X, LI J, XIE Y J. Cloning of *ATG5* gene of *Fenneropenaeus chinensis* and expression analysis under pH and carbonate alkalinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 84–94

中国对虾 *ATG5* 基因的克隆及其在 pH、碳酸盐碱度胁迫下的表达分析*



魏 威^{1,2} 何玉英² 李朝霞^{1①} 周雨欣³ 李 健² 谢拥军⁴

(1. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 山东 青岛 266237; 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. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 4. 河北省水产良种与渔业环境监测保护总站 河北 石家庄 050011)

摘要 采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *ATG5* 基因 cDNA 全长, 命名为 *FcATG5*。利用实时荧光定量技术分析 *FcATG5* 的组织表达及其在 pH 和碳酸盐碱度胁迫下的表达特征, 并利用 RNAi 技术验证其功能。基因分析显示, *FcATG5* cDNA 全长为 2225 bp, 开放阅读框为 810 bp, 编码 269 个氨基酸, 预测其编码的蛋白质分子量为 31.103 kDa, 理论等电点为 5.59, 为疏水性蛋白, 包含 1 个 APG5 自噬相关蛋白结构域, 无跨膜结构, 不包含信号肽。同源性和系统进化分析显示, *FcATG5* 具有高度保守性, 与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 同源性最高(98.14%)。组织表达分析显示, *FcATG5* 在中国对虾各组织中均有表达, 肌肉中表达量最高($P < 0.05$), 血淋巴细胞中最低($P < 0.05$)。pH 胁迫后 48 h, *FcATG5* 在鳃中的表达量最低, 为对照组的 1.68 倍; 胁迫后 96 h 最高, 为对照组的 2.67 倍。碳酸盐碱度胁迫后 12 h, *FcATG5* 在鳃中表达量最高, 为对照组的 2.77 倍; 胁迫后 96 h 最低, 为对照组的 1.30 倍。干扰实验结果显示, pH 和碳酸盐碱度胁迫下, 沉默 *FcATG5* 基因会使中国对虾死亡率显著增高($P < 0.05$), 表明该基因的表达量越高, 越有利于中国对虾存活。实时定量结果表明, *FcATG5* 在 pH、碳酸盐胁迫下的表达量均显著升高($P < 0.05$), 推测自噬可能参与中国对虾应对非生物胁迫的调控。本研究结果对水生动物特别是甲壳动物中细胞自噬研究具有重要的借鉴意义, 有助于推进中国对虾盐碱水养殖的研究进程。

关键词 中国对虾; *FcATG5*; pH 胁迫; 碳酸盐碱度胁迫; RNAi

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0084-11

我国盐碱水的面积高达 4.6×10^7 hm^2 (陈学洲等, 2020), 高 pH 和高碱度是盐碱水最明显的 2 个特征。调查显示, 山东东营盐碱水 pH 为 8.5~9.5, 碳酸盐碱度为 1.4~8.0; 河北沧州盐碱水 pH 为 8.3~9.2, 碳酸

* 国家自然科学基金项目(31772842)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD46)、山东省重点研发计划项目(2019QYTPY022)和中央提前下达渔业成品油价格改革财政补贴项目(326-0501-YZN-Z4HB)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31772842), China Agriculture Research System of MOF and MARA, Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46), Key Research and Development Program of Shandong Province (2019QYTPY022), and Central Government Issued the Financial Subsidy Project of Fishery Product Oil Price Reform in Advance (326-0501-YZN-Z4HB)].

魏 威, E-mail: weiwei19960123@163.com

① 通讯作者: 李朝霞, 教授, E-mail: zhx-l@163.com

收稿日期: 2021-03-06, 收修改稿日期: 2021-04-04

盐碱度为 3.5~13.0 (Ge *et al.*, 2019)。资源丰富的盐碱水既不能用于人畜饮用,也不能用于农田灌溉。因此,盐碱水养殖是盐碱水开发利用的有效途径。pH 值是养殖水体的重要指标,水体 pH 发生变化会引起刺参 (*Oplopanax elatus* Nakai)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 的应激反应,严重影响其生长发育,甚至导致水生动物死亡(韩莎等, 2018; Liu *et al.*, 2020)。盐碱水的 pH 值远高于正常养殖水体(pH 为 7.5~8.5) (韩旭等, 2021), 在养殖过程中产生的残饵和废料也会使水体富营养化,从而导致养殖水体 pH 值升高(Lucia *et al.*, 2013; 李瑞萍等, 2015)。过高的 pH 会腐蚀虾的鳃组织,使其呼吸困难,严重时可导致窒息死亡,同时会使免疫功能下降,直接或间接影响其生长、繁殖和抗氧化等能力(胡硕等, 2019; 赵先银等, 2011; 王芸等, 2013)。水体碱度一般是指水体中能与强酸发生中和反应的物质总量,主要由 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 组成,称为碳酸盐碱度(柳飞等, 2016)。房文红等(2000)研究表明,水体碱度与 pH 影响中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 幼虾的存活率,高碳酸盐碱度会影响中国对虾的生长、发育和繁殖。脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 的抱卵率、孵化率和幼体成活率等会随着碱度的升高而降低(么宗利等, 2010、2012; 柳飞等, 2016)。上述研究表明,盐碱水的高 pH 和高碱度特性是影响水生生物生长存活的主要原因。近年来,凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 等经过多年盐碱水养殖模式和技术的探索,已基本实现盐碱水养殖,大大提高了盐碱水的利用率,创造了较大的经济价值(孙家强, 2018; 冯伟业等, 2020)。因此,研究中国对虾的耐盐碱机制,为提升其对环境的适应性及抗逆性提供理论依据,对早日实现中国对虾盐碱水养殖具有重要意义。

自噬 (autophagy) 是细胞维持正常生理活动及内部稳态的一种代谢活动,其作用机理是通过溶酶体降解来清除自身异常组分或细胞通过降解自身组分来解决外界营养匮乏的问题(Matsushita *et al.*, 2007)。目前,在酵母中已经发现了 40 个自噬相关基因 (autophagy-related gene, *ATG*) (卫亚平, 2016), 众多自噬相关基因中, *ATG5* 被证明是微自噬和巨自噬的重要标志 (Mizushima *et al.*, 1999; 王懿峥等, 2018), 与 *ATG12* 共轭结合形成异源二倍体,后又与 *ATG16* 共价结合,形成类泛素结合系统,共同转运到自噬体膜上 (Matsushita *et al.*, 2007; 陈立德等, 2017), 参与自噬体膜的延伸和扩张以及最终包裹内容物形成自噬体的过程 (Klionsky *et al.*, 2003), 被广泛作为研究自噬行为

的对象 (Simonsen *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2016)。已有研究表明, *ATG5* 在动植物应对逆境胁迫时表达量会明显上调,与野生型相比,过表达番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的耐高温、耐旱和耐高盐等性能均有所提高(陈立德等, 2017; 贾昕, 2018)。在哺乳动物中, *ATG5-ATG12* 共轭物参与小鼠 (*Mus musculus*) 先天抗病毒免疫,促进小鼠的杀菌作用; *ATG5* 参与牦牛 (*Bos grunniens*) 生殖过程中卵母细胞的发育、成熟和早期胚胎的发育 (Jounai *et al.*, 2007; 王靖雷等, 2019)。在鱼类中, *ATG5* 被证明在神经保护和先天免疫中发挥作用,且过表达会促进自噬活动 (Hu *et al.*, 2017; Chu *et al.*, 2019); 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 在哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 攻毒下,不论是干扰 *ATG5*、*ATG12* 单个基因或者 2 个基因同时干扰,其自噬水平均有所下降(刘伟, 2018)。

本课题组在中国对虾转录组中发现,非生物胁迫下自噬相关基因差异表达(未发表),鉴于自噬基因在其他物种中的研究进展,本研究对非生物胁迫下自噬相关基因所发挥的作用进行验证。本研究通过克隆中国对虾 *ATG5* 全长基因,分析其在各组织中的表达特征及其在 pH 胁迫、碳酸盐碱度胁迫下的差异表达情况并验证其功能,为中国对虾在细胞自噬方面的研究提供参考,旨在为提高中国对虾抗逆性和良种选育提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用虾取自山东日照开航水产养殖公司,选择健康无病、规格整齐、活力旺盛的中国对虾进行 pH、碳酸盐碱度胁迫及 siRNA 干扰实验,所用对虾体长为 (11.59±0.96) cm,体重为 (21.29±2.47) g。实验用水为过滤后的地下海水,温度为 20℃~22℃,盐度为 26~28, pH 8.14~8.20。实验前将虾置于养殖池中暂养 3~5 d。暂养期间,池中水深为 30~40 cm,每天换水 1/3,投喂饵料为中国对虾体重的 5%,待其适应环境后开展实验。

1.2 组织采集

选取 9 尾未经处理的健康中国对虾,取其鳃、肝胰腺、眼柄、肌肉、胃、心脏、肠和血淋巴细胞,每 3 尾为 1 组,放入冻存管中,迅速放入液氮保存,用于后续总 RNA 的提取以及组织表达分析。

1.3 实验方法

1.3.1 pH、碳酸盐碱度胁迫实验 根据预实验结

果, pH 胁迫实验共分为 2 组, pH 8.2 (自然海水)为对照组, pH 9.0 为胁迫组, 每组设置 3 个平行, 每个平行放入 30 尾中国对虾, 参照李政道(2018)和哈承旭等(2009)的实验设计, 使用 NaOH、HCl 和 NaHCO₃ 调节水体 pH 值。胁迫实验在 60 L 的整理箱中进行。实验开始前 48 h 调好水体 pH 值, 当水体稳定后, 将虾放入整理箱中开始胁迫实验。pH 胁迫实验开始后第 0、3、6、12、24、48、72、96 h 分别从每个实验组随机挑选 9 尾虾, 取其鳃组织, 迅速放入液氮中保存, 用于后续实验中总 RNA 的提取。实验开始后, 每 3 h 测一次水体 pH 值并校正。

根据预实验结果, 将碳酸盐碱度胁迫实验分为 2 组, 碱度 3.2 (自然海水)为对照组, 碱度 11 为胁迫组, 每组设置 3 个平行, 每个平行放入 30 尾中国对虾。参照柳飞(2016)和房文红等(2000)的实验设计, 碳酸盐碱度胁迫实验使用 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 调节实验水体碱度, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的 HCl 进行微调, 实验在 60 L 的整理箱中进行。实验开始前 48 h 调好水体碱度, 当水体碱度稳定后将虾放入整理箱中开始胁迫实验。碳酸盐胁迫实验开始后第 0、3、6、12、24、48、72、96 小时分别从每个实验组随机取出 9 尾虾, 取其鳃组织, 迅速放入液氮中保存, 用于后续实验中总 RNA 的提取。实验开始后, 每 3 h 测 1 次水体碱度并校正, 采用双指示剂滴定法(酚酞和甲基橙作为指示剂)测定碱度。

1.3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 先将收集的样品进行预处理, 体积较大的, 如肌肉、肝胰腺, 采用液氮研磨法处理, 其他体积较小的样品用低温匀浆机处理。将处理好的样品分装至无 RNA 酶的离心管中, 每管装样品 80~100 mg, 加入 1 mL TransZol Up, 每个组织取 1 管分装好的样品使用总 RNA 提取试剂盒(全式金, 北京)提取总 RNA, 将提取的总 RNA 放入-80℃保存备用。使用超微量紫外分

光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 质量和浓度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用 SMARTer[®] RACE 5'/3' (宝生物, 大连)试剂盒合成中国对虾 3'、5'RACE 模板, 用于基因克隆, -80℃保存。

1.3.3 中国对虾 ATG5 基因克隆 从中国对虾转录组中筛选自噬相关基因 ATG5 的 EST 序列。使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1), 通过 PCR 扩增得到 *FcATG5* 中间片段, 并使用 DNAMAN 软件对其验证。以验证后的序列为模板, 设计 RACE 引物, 进行 RACE 扩增。将 RACE 扩增产物连接到 T1 载体(全式金, 北京)后转化到 DH5 α 化学感受态细胞(全式金, 北京)中, 挑取单克隆菌株进行阳性克隆鉴定, 通过菌液 PCR 产物的凝胶电泳结果, 选出阳性菌液进行测序。使用软件 Contig Express 拼接菌液测序结果, 得到 5'和 3'端扩增序列; 使用在线软件 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找 *FcATG5* 的开放阅读框。

1.3.4 生物信息学分析 利用 NCBI 中的 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)区域, 对 *FcATG5* 核苷酸序列进行序列比对, 使用 Protein Blast 比对 *FcATG5* 与其他物种自噬相关基因 ATG5 的同源性。使用 DNAMAN 软件进行多生物氨基酸序列对比。使用 MEGA 7 软件构建 N-J 进化树。使用 SMART 软件预测蛋白质结构域, 使用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测蛋白质有无跨膜结构, 使用 ExPASy 中 ProtParam tool 预测蛋白质特性, 使用 ExPASy 中 ProtScale 推测蛋白质亲水性, 使用 SignalP 4.1 Server 预测信号肽。

1.3.5 *FcATG5* 基因 siRNA 干扰实验 根据 *FcATG5* 基因 cDNA 序列, 设计 3 个干扰靶点, 分别编号为 ATG5-1、ATG5-2 和 ATG5-3 (表 2), 进行预实验。以注射无意义双链 siRNA-NC 为阴性对照组, 以分别注射 ATG5-1、ATG5-2 和 ATG5-3 作为干扰组, 每组设置 3 个平行, 每个平行放入 10 尾虾, 注射 siRNA 前

表 1 本研究所用引物
Tab.1 The primers used in this research

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
FcATG5-F	CAGAGTTGCTGTTTGC GTG C	PCR
FcATG5-R	TAAAGAGAAGAGCAGAAGGG	PCR
FcATG5-5'	CAAAGGAGTGCCATCGGATTCCAACC	克隆 <i>FcATG5</i> Cloning <i>FcATG5</i>
FcATG5-3'	TGAAGGAGACCGCATAGTGATCCAGGGG	克隆 <i>FcATG5</i> Cloning <i>FcATG5</i>
FcATG5-F1	CGCCCAGACCCCTTACTACCT	定量 Quantitative
FcATG5-R1	TGCCATCGGATTCCAACC	定量 Quantitative
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	定量内参 Quantitative internal
18S-R	G G G G A G G T A G T G A C G A A A A A T	定量内参 Quantitative internal

表 2 本研究所用 siRNA 序列与 NC 序列
Tab.2 The sequences of siRNA and NC used in this research

编号 No.	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
ATG5-1	Forward: GCUGAGAUGUGGUUGGAAUTT Reverse: AUUCCAACCACAUCUCAGCTT	RNA 干扰 RNA interference
ATG5-2	Forward: CCAUUAUUCGGAAGCUUAUTT Reverse: AUAAGCUUCCGAUUAUUGGTT	RNA 干扰 RNA interference
ATG5-3	Forward: CCAUUCUAGCUUGUAGAAATT Reverse: UUUCUACAAGCUAGAAUGGTT	RNA 干扰 RNA interference
NC	Forward: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT Reverse: ACGUGA CACGUUCGGAGAATT	阴性对照 Negative control

称量虾的重量, 根据虾体重来调整注射量(1 $\mu\text{g/g}$), 注射部位为第 2 腹节肌肉, 注射完成后放入装有正常海水的 60 L 整理箱中。注射后 24 h, 每组中随机选取 3 尾虾, 检测干扰后 *FcATG5* 基因在鳃中的表达变化, 选出干扰效果最好的靶点进行正式实验。siRNA 干扰正式实验设置 4 个实验组: 在 pH 9.0、碳酸盐碱度 11.0 胁迫下, 注射无意义双链 siRNA-NC 作为 2 个对照组, 以注射效果最佳的靶点作为 2 个干扰组。实验开始后统计胁迫 48 h 死亡率。

1.3.6 *FcATG5* 基因表达的实时定量分析 利用 Primer Premier 5.0 软件设计实时荧光定量引物 *FcATG5*-F1 和 *FcATG5*-R1(表 1)。使用反转录试剂盒 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (诺唯赞, 南京)将待测样品 RNA 反转录得到 cDNA。使用 ChamQ[™] SYBR[®] Color qPCR master mix 试剂盒(诺唯赞, 南京)和 7500 Real Time PCR System 仪器(ABI, 美国)检测中国对虾 *FcATG5* 各组织表达分布及其在 pH 胁迫、碳酸盐碱度胁迫下的表达。实时荧光定量结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算得出 *FcATG5* 相对表达量, 使用 SPSS 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, 使用 OriginPro 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *FcATG5* 基因序列分析

通过 RACE 技术得到中国对虾 *ATG5* 基因序列, 全长为 2224 bp, 将其命名为 *FcATG5* (GenBank 登录号: MW426527), 开放阅读框为 810 bp, 5'端非编码区 107 bp, 3'端非编码区 307 bp, 编码 269 个氨基酸(图 1)。信号肽预测结果显示, *FcATG5* 不包含信号肽。预测其编码的蛋白分子量为 31.103 kDa, 理论等电点为 5.59, 亲水性平均值为-0.407, 不稳定性指数为 43.43, 表明该基因编码的蛋白为疏水性不稳定蛋白, SMART 软件预测结果显示, 其具有 1 个 APG5 自噬相关蛋白结构域, 不含跨膜结构。

2.2 *FcATG5* 基因同源性分析及系统进化分析

使用 DNAMAN 软件将 *FcATG5* 氨基酸序列与其他物种进行同源比对。结果显示, 中国对虾 *FcATG5* 与凡纳滨对虾的同源性最高, 为 98.14%, 与斑节对虾的同源性为 97.77%, 与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)的同源性分别为 85.50%、81.04%、78.32%(图 2)。

使用软件 MEGA 7.0 构建 Neighbor-Joining 进化树(图 3)。从图 3 可以看出, 进化树分为两大支, 第一支为节肢动物门(Arthropoda), 第二支为脊索动物门(Chordata)。其中, 中国对虾隶属节肢动物门、甲壳纲(Crustacea), 属于第一支, 与斑节对虾、凡纳滨对虾首先聚为一支, 其次为三疣梭子蟹、蓝蟹。

2.3 *FcATG5* 基因组织表达分析

利用实时荧光定量的方法检测 *FcATG5* 在中国对虾不同组织中的表达情况。结果显示, *FcATG5* 基因在中国对虾各个组织中均有表达, 但在不同组织中的表达量不同, 在肌肉中的表达量最高, 其次在胃、眼柄中表达较高, 在血淋巴细胞中表达量最低(图 4)。

2.4 pH、碳酸盐碱度胁迫下 *FcATG5* 基因在中国对虾鳃组织中的表达分析

鳃作为水生动物的呼吸器官, 与养殖水体直接接触, 受水体 pH、碱度等水体主要指标变化影响较大, 也是水生动物调节体内渗透压和维持内部稳态的重要调节器官。因此, 本研究以中国对虾鳃组织为主要研究对象。

pH 胁迫 3 h, *FcATG5* 基因在中国对虾鳃组织中的表达量显著高于对照组($P < 0.05$); 在胁迫后 96 h 内, *FcATG5* 的表达呈现多峰式变化。胁迫后 96 h, *FcATG5* 最高, 为对照组的 2.67 倍; 在 48 h 表达量相对最低, 为对照组的 1.68 倍(图 5)。

```

acgtgggggc tgactgtggc gagccttgtt gttgttgacg aaatttgaca agaggggagca aaatattggg atttattgaa agttagatt gaattcaaaa atcagcc 107
M A E D R E I L R E V W D G R V A V C V Q L A S E D C N T L
ATG GCT GAA GAC AGG GAG ATC TTG CGT GAA GTG TGG GAT GGC AGA GTT GCT GTT TGC GTG CAG CTT GCA AGT GAA GAT TGC AAC ACA CTG 197
S A P D P Y Y Y L M V P R L S Y F P L V T D K V R K H F L R F
AGC GCC CCA GAC CCT TAC TAC CTC ATG GTA CCA AGA CTA TCC TAC TTC CCT CTA GTT ACA GAT AAG GTA CGA AAA CAT TTT CTC CGC TTC 287
I T T E L N D A E M W L E S D G T P L K W H Y P V G V L F D
ATC ACA ACA GAA CTT AAT GAT GCT GAG ATG TGG TTG GAA TCC GAT GGC ACT CCT TTG AAA TGG CAT TAT CCT GTT GGT GTT TTG TTT GAC 377
L H C G G A S L P W N L T A H F S H F P E Q E L I K C S S R
CTT CAT TGT GGT GGC GCT TCC CTA CCT TGG AAC CTC ACA GCC CAC TTC TCC CAC TTC CCA GAG CAG GAG CTC ATC AAG TGC TCT TCC AGA 467
E V V E S H F L S S L K E A D G L K H R G Q I I T N M Q S K
GAG GTT GTA GAG TCC CAT TTC CTT TCA TCC TTA AAA GAA GCT GAT GGT CTG AAG CAC AGA GGG CAG ATC ACC AAT ATG CAA AGC AAG 557
D H K Q L W M G L C N D K F D Q F W A I N R K L L M D S T P E
GAT CAC AAG CAA CTA TGG ATG GFA CTT TGT AAT GAT AAG TTT GAT CAA TTT TGG GCC ATT AAT CGG AAG CTT ATG GAT AGT ACC CCA GAG 647
E G F K H I P R L H S P C Q P P I I Q R R L I R P L S D D G R
GAA GGC TTT AAA CAC ATT CCC TTC CGT CTG CAC TCG CCC TGC CAG CCC CCA ATT CAG AGG CTT ATC AGA CCT CTC TCA GAT GAC GGA AGG 737
K V T L L G D L L Q E F L P D S N N E G D R I V I Q G G I E A P
AAG GTG ACA TTG GGT GAC CTC CTG CAA GAG TTT TTG CCT GAT TCC AAT AAT GAA GGA GAC CGC ATA GTG ATC CAG GGG ATT GAG GCC CCA 827
R E T P L Q W L S E H L S H P L N F L H I C Y V P T G M S *
CGA GAG ACT CCA TTA CAG TGG CTT AGT GAA CAT CTC AGT CAC CCA GAT AAT TTT CTT CAT ATT TGT TAT GTC CCT ACT CAG ATG TCA TGA 917
ccagtgtact tcagtcacat agcttcagga tgtacacttt ttgacatatt tgcctcattg acagtatggt gaggattaca agtgaatggt acaagttttc ttgctgtaat 1027
gcataagaaa aacctgttgt gtatgatctt gcagaaaatg tttgtgagc tgcctttatt aaagttgcc tccataaagc aattcaaatg actggaatgg tattgcatct 1137
gttgtctgt taccattcta gctttagaaa agtgtctgta acatgactct cccctctaaa tttgtgtaa ctcagcatat ttcattgcag gtgaatggtt taccatgcat 1247
ttcatgctta gtttgaataa gcatatataa aattgtatgc atgtgttttt tgggtataaa tgtttttgtg tgtgttgatg aatatctgtg tttagaagaa aaagataaaa 1357
agctatataa gtgaatgaaa gcaataacta tctctgtggt tgcactgtaa gcagtgcaag ttaactcttt tctctcttta ttataactt tcttgttat aaatacaatg 1467
tgaatgtgc taagcattcc cagggaaatgc ttttgttcac atcattattt tatcttattg aaactactgac acttctctgc ttatttacct ttacatggtt tatatatgat 1577
aatttctgaa gtgttcttat ttgttttttg taaaacattt ccagtagaat ctacatagaa tatttatcca ttacccatca aattatcata ggggttttca agttactaaa 1687
aattaaaca cttaaaaatg ttcccattt ccagttgaat taaatgtttt agagaaaaata catatgcaac tacattgaat aatagatttt tatgtccatc aagaagattg 1797
gtatatttgc catacagagt tagtgaataa atgatattga atggcgataa aaaagtcttt ttgaaaatta cataaaatac atattttcaa ttttgattct 1907
acattttgtt tatttaaatg attgagccca tatttgttta tctgaatttg aaatttaatt ttgtataata gattaagtgt ccaactacaa aatctctgtt tataaataac 2017
atgacagatg gctgattttt taagttttta tcttgtttaa ttgtaaaaaa attcagaaaa agtctctattg tacaccagca tgggttttccc ttctgctctt ctctttcaaa 2127
caggaacaag tcattattaa gatgtgatat atttatgtac agaatatgat taatattata tccaagacca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2224

```

图 1 *FcATG5* 基因 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequence and predicted amino acid sequence of *FcATG5* gene

预测的开放阅读框内核苷酸序列用大写字母表示，位于氨基酸序列下方；

起始密码子(ATG)为下方划红线区域，终止密码子(TGA)上方标有星号(*)

Nucleotide sequences in the predicted open reading frame are represented in capital letters below the amino acid sequence. The start codon (ATG) is the red line below, and the stop codon (TGA) is marked with an asterisk (*) above it

<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFITTEILNDAEMWL	72
<i>Penaeus monodon</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFITTEILNDAEMWL	72
<i>Penaeus vannamei</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFITTEILNDAEMWL	72
<i>Callinectes sapidus</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFILISQELQEAEMWL	72
<i>Macrobrachium nipponense</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFITPPDLODAEMWL	72
<i>Portunus trituberculatus</i>	MAEDREILREIVDGRVAVCVQLASEDCNTLSAPDEYYLMVPRLSYFPLVTDKVRKHLRFILISSDLOEAEMWL	72
Consensus	maedreilre wdgrv vcvqlasedcntl sapd yyilmvprlsyfplv dkvrkh lr i l aemw	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGASLPWNLTAFHSHPPEQLIKCSSREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQII	144
<i>Penaeus monodon</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGASLPWNLTAFHSHPPEHELKCSSREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQII	144
<i>Penaeus vannamei</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGASLPWNLTAFHSHPPEQLIKCSSREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQII	144
<i>Callinectes sapidus</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGASLPWALTAFHSHPPEQDLIRCPTRREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQII	144
<i>Macrobrachium nipponense</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGATLPWLTAFHSHPPEKELIRCPTRREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQVI	144
<i>Portunus trituberculatus</i>	ESDGLPLKWHYPVGVLFDLHCGGASLPWALTAFHSHPPEQDLIRCPTRREVVESHFSSSLKEADGLKHRGQII	144
Consensus	e dg plkwhypvgvlfldlhcg lpw tahfshfpe li c revves f sslkeadglkhrqg i	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHSPCCOPPIQRLIRPLSDDGRKVTLCD	216
<i>Penaeus monodon</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHLPCCOPPIQRLIRPLSDDGRKVTLCD	216
<i>Penaeus vannamei</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHLPCCOPPIQRLIRPLSDDGRKVTLCD	216
<i>Callinectes sapidus</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHCPFOAPIQRLIRPLSDDGRKVTLCD	216
<i>Macrobrachium nipponense</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHLYRPPITQKLIKPLSDDGRKVTLCD	216
<i>Portunus trituberculatus</i>	TNMQSKDHKQLWMGLCNDKFDQFWAINRKLMDSTPEEGFKHIFPRLHSPSOAPIQRLIRPLSDDGRKVTLCD	216
Consensus	tnm skdhkqlwmglcndkfdqfwainrklm egfk ipfrlh piq li pl dgr vtl d	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	LLQEFIPDSSNEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLHICYVPTQMS.....	269
<i>Penaeus monodon</i>	LLQEFIPDSSNEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLHICYIPTQMS.....	269
<i>Penaeus vannamei</i>	LLQEFIPDSSNEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLHICYIPTQMS.....	269
<i>Callinectes sapidus</i>	LLMEYLSVLSQEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLTSATFLSSLEENTLSCPFILGIIDSR	285
<i>Macrobrachium nipponense</i>	LLHDAIPDAIMEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLHISYIPQA.....	268
<i>Portunus trituberculatus</i>	LLLEYLSVS.QEGDRVVIQGIAPRETPIQWLSEHLSHPDNFLHICYIP.LQS.....	267
Consensus	ll qef ipdss negdrv vi qgi ap re tp iq w l se h l s h p d n f l h i c y i p t q m s	

图 2 *FcATG5* 基因与多种生物氨基酸序列比对

Fig.2 Aligning of multi-biological amino acid sequence of *FcATG5* gene

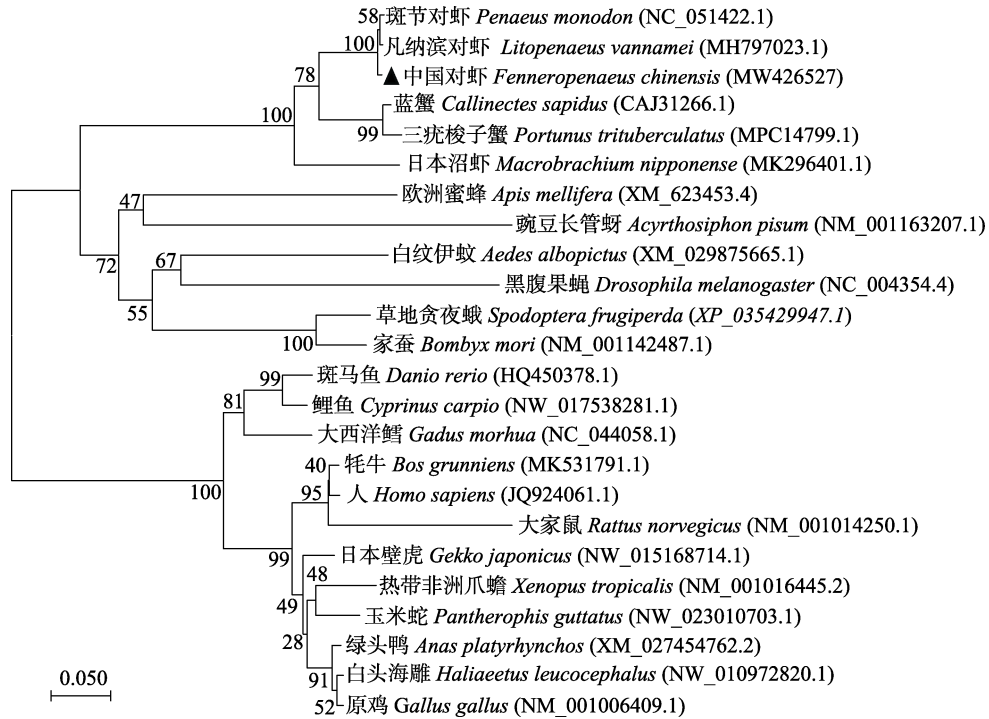


图 3 基于中国对虾 *FcATG5* 氨基酸序列构建的 Neighbor-Joining 进化树

Fig.3 Neighbor-Joining tree constructed from amino acid sequence of *FcATG5* of *F. chinensis*

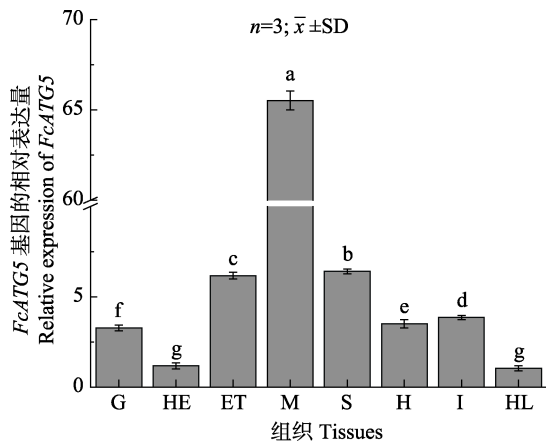


图 4 *FcATG5* 在中国对虾各组织中的表达

Fig.4 Expression of *FCATG5* in the tissues of *F. chinensis*

G: 鳃; HE: 肝胰腺; ET: 眼柄; M: 肌肉; S: 胃;
H: 心脏; I: 肠; HL: 血淋巴细胞;
柱上不同字母代表表达差异显著 ($P < 0.05$)。下同
G: Gill; HE: Hepatopancreas; ET: Eye stalk; M: Muscle;
S: Stomach; H: Heart; I: Intestines; HL: Hemolymph cells.
Different letters on the column represent significant differences ($P < 0.05$). The same as below

与对照组相比, 碳酸盐碱度胁迫下 *FcATG5* 在鳃组织中的表达变化呈显著升高趋势 ($P < 0.05$)。胁迫后 96 h 内, *FcATG5* 的表达基本呈先上调再下调的变化趋势, 在胁迫后 12 h 达到最高, 为对照组的 2.77 倍; 在 96 h 表达量最低, 为对照组的 1.30 倍(图 6)。

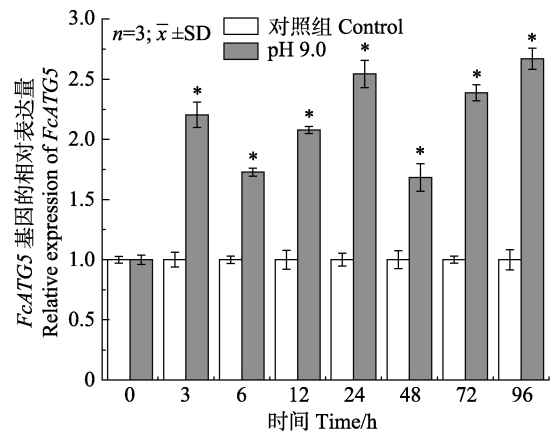


图 5 pH 胁迫下 *FcATG5* 基因在鳃中的相对表达

Fig.5 Relative expression of *FCATG5* gene in gills under high pH stress

*: 与对照相比, 表达差异显著 ($P < 0.05$)。下同
*: Significant difference compared with control ($P < 0.05$). The same as below

2.5 *FcATG5* 基因的功能验证分析

2.5.1 siRNA 干扰靶点筛选 siRNA 干扰后, *FcATG5* 基因在中国对虾鳃中的相对表达量如图 7 所示。与对照组相比, 注射不同干扰试剂 24 h 时, *FcATG5* 基因在鳃中的表达量呈显著降低的趋势 ($P < 0.05$)。注射 *ATG5-1* 24 h 时, 基因表达量为对照组的 0.516 倍; 注射 *ATG5-2* 24 h 时, 基因表达量为

对照组的 0.617 倍；注射 ATG5-3 24 h 时，基因表达量为对照组的 0.174 倍。经比较，ATG5-3 干扰效果最好，干扰效果达到 82.6%，选择干扰靶点 ATG5-3 进行后续实验。

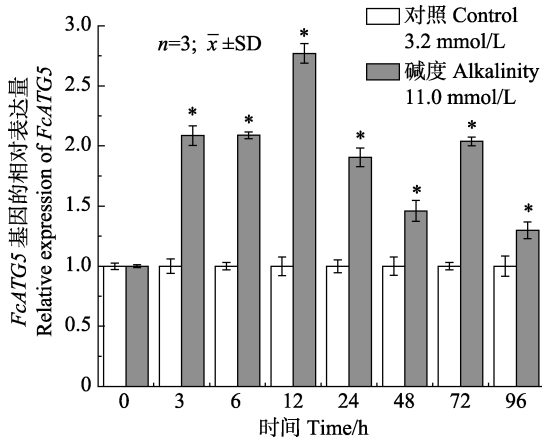


图 6 碳酸盐碱度胁迫下 *FcATG5* 基因在鳃中的表达
Fig.6 Expression of *FCATG5* gene in gills under carbonate alkalinity stress

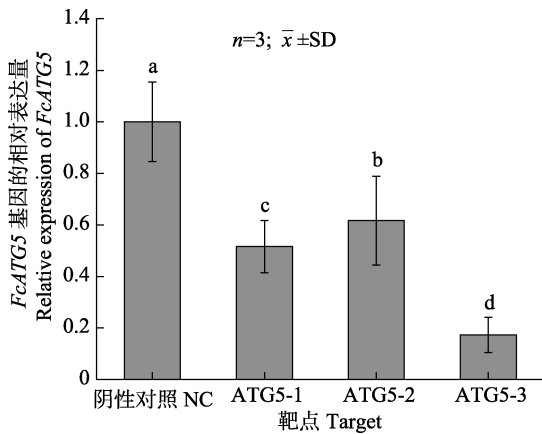


图 7 注射 ATG5-1、ATG5-2 和 ATG5-3 24 h 时 *FcATG5* 基因在鳃中的表达

Fig.7 Expression of *FcATG5* gene in gill after ATG5-1, ATG5-2 and ATG5-3 injection in 24 h

2.5.2 pH、碳酸盐胁迫下干扰 *FcATG5* 基因中国对虾死亡率 向中国对虾注射 *FcATG5* 基因 siRNA 干扰试剂 ATG5-3, 并对其进行 pH 胁迫, 统计其 0~48 h 内的死亡率, 结果如图 8 所示。干扰组在 0~48 h 的累计死亡率(50%)显著高于对照组(33.33%) ($P<0.05$)。其中, 0~12 h 干扰组死亡率为 8.33%, 对照组为 0; 12~24 h 干扰组死亡率为 25%, 对照组为 8.33%。

向中国对虾注射 *FcATG5* 基因 siRNA 干扰试剂 ATG5-3, 并对其进行高碱度胁迫, 统计其 0~48 h 内的死亡率, 结果如图 9 所示。干扰组在 0~48 h 的累计死亡率(59.09%)显著高于对照组(41.18%) ($P<0.05$)。其

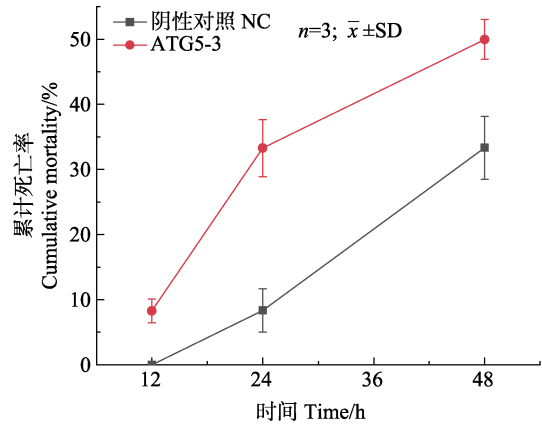


图 8 pH 9.0 胁迫注射干扰的中国对虾累计死亡率
Fig.8 Cumulative mortality of *F. chinensis* after pH stress (pH 9.0) and siRNA interference

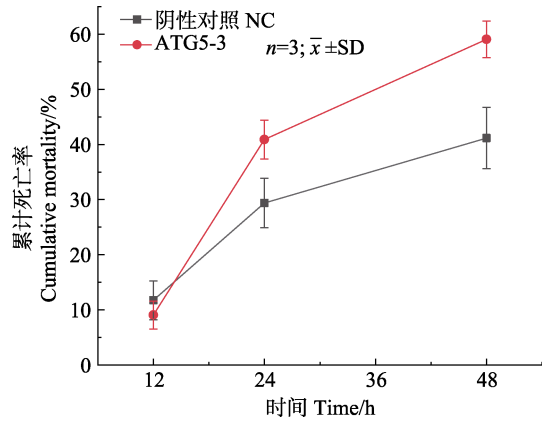


图 9 碳酸盐碱度 11 胁迫注射干扰的中国对虾累计死亡率
Fig.9 Cumulative mortality of *F. chinensis* after carbonate alkalinity (11.0 mmol/L) stress and siRNA interference

中, 0~12 h 干扰组死亡率为 9.09%, 对照组为 11.76%; 12~24 h 干扰组死亡率为 31.82%, 对照组为 17.65%。

3 讨论

本研究运用 RACE 技术首次克隆得到中国对虾 *FcATG5* 基因 cDNA 全长, 并对其进行分析。结果显示, *FcATG5* 基因与其他物种, 如太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)(孙航等, 2015)、斑节对虾(刘伟, 2018)的 *ATG5* 基因的预测结果相同或相似。*FcATG5* 开放阅读框编码的氨基酸序列与凡纳滨对虾等物种具有较高的同源性, 且包含 1 个自噬相关蛋白结构域 APG5, 这表明 *FcATG5* 基因所编码的蛋白具有高度保守性。

中国对虾 *FcATG5* 基因的组织特异性表达分析结果显示, *FcATG5* 基因在各组织中均有表达, 无组织特异性, 但在各组织中表达量差异性显著, 其中, 在肌肉中表达量最高, 在血淋巴细胞中表达最低, 这与

刘伟(2018)的研究结果一致。鳃是水生动物的呼吸器官,与养殖水体直接接触,受水体 pH、碱度等水体主要指标变化影响较大,也是水生动物调节体内渗透压和维持内部稳态的重要调节器官。在 pH 和碳酸盐碱度胁迫下,鳃作为主要的响应器官,在维持机体生理功能中发挥积极调控作用,而细胞自噬是免疫调控的重要部分,在水生动物应对胁迫时发挥重要作用(张小明, 2018; Li, 2018; 何丽等, 2019; 洋雯, 2019)。因此,推测 *FcATG5* 在中国对虾应对 pH、碳酸盐胁迫时发挥重要作用。研究自噬基因 *FcATG5* 在中国对虾应对盐碱胁迫的机理,对于丰富中国对虾应对盐碱胁迫基础性研究尤为重要。

研究表明, *ATG5* 基因不仅能促进细胞自噬的形成,而且可以刺激细胞凋亡,在动物的先天免疫、神经保护、生殖发育等过程中发挥重要作用(Jounai *et al.*, 2007; 王靖雷等, 2019)。*ATG5* 作为细胞自噬的重要标志(Mizushima *et al.*, 1999; 王懿峥等, 2018),根据其表达量的变化可推测细胞自噬水平的变化。本研究结果显示, pH、碳酸盐碱度胁迫下,中国对虾鳃中 *FcATG5* 表达量均有所升高, pH 胁迫后 96 h 达到最高,碳酸盐碱度胁迫后 12 h 达到最高,这与哈维氏弧菌刺激下,斑节对虾中 *ATG5* 表达量上调,在 72 h 达到最高的研究结果相似(刘伟, 2018)。由此推测,鳃作为调节渗透压、维持体内稳态的主要器官,在响应 pH、碳酸盐碱度胁迫时,其细胞自噬活动增强,且分别在胁迫后 96 h 和 12 h 达到最高水平。

RNA 干扰技术是由 dsRNA 介导的基因沉默现象,研究人员通常利用 RNA 干扰技术进行基因功能的探索。已有研究表明,干扰 *ATG5* 会导致细胞自噬水平下降,而对 *ATG5* 进行过表达处理则会促进细胞自噬,这揭示了 *ATG5* 对细胞自噬的调控作用(刘伟, 2018; Chu *et al.*, 2019)。研究表明,沉默癌细胞中 *ATG5* 基因可以提高化疗药物对癌症的治疗效果(Egan *et al.*, 2011; Simonsen *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2016); 对斑马鱼 (*Danio rerio*) 进行 *ATG5* 过表达处理,可以减轻或者逆转帕金森氏病的病理特征(Hu *et al.*, 2017); 沉默斑节对虾中 *ATG5* 会使斑节对虾细胞自噬水平下降(刘伟, 2018)。RNA 干扰结果显示,沉默 *FcATG5* 会使中国对虾死亡率升高,表明在 pH、碳酸盐碱度胁迫下, *FcATG5* 表达量越低,中国对虾对非生物胁迫的耐受力越差,其存活率就越低。推测因为沉默 *FcATG5* 后,其表达量下降,进而抑制了细胞自噬水平,降低了中国对虾的免疫力及抗逆性。这一结果与上述沉默动物或癌细胞中 *ATG5* 的相关研究结果相似。

非生物胁迫下,中国对虾体内积累大量活性氧中

介物(ROS),使得机体受到氧化损伤,导致线粒体核糖体蛋白等受到损伤,产生功能性障碍(Li *et al.*, 2021)。自噬相关基因通过调控细胞自噬过程来清除体内受损伤的细胞器和老化、错误折叠蛋白等,也可通过降解自身组分来解决外界营养匮乏的问题,维持机体内部相对稳态(高婷等, 2018),由此推测, *FcATG5* 通过调控细胞自噬水平来清除由于非生物胁迫而受损伤的线粒体及蛋白质等。此外,自噬通过对葡萄糖的摄取、糖酵解关键酶和线粒体的调控来参与糖代谢过程(杨照国等, 2015)。中国对虾在应对非生物胁迫时机体耗能增加,糖代谢活动增强(He *et al.*, 2019),由此推测,自噬基因可能通过此路径为机体在应对非生物胁迫时供能,从而降低中国对虾应对胁迫时的死亡率。本研究对 *FcATG5* 在非生物胁迫中的作用进行了初步验证,但其对细胞自噬过程的调控机制以及其在自噬通路的调控网络有待进一步研究。

参 考 文 献

- CHEN L D, LI A, LIU Z J, *et al.* Effects of different environmental stresses on the number of autophagosomes and expression of autophagy-related genes in 'Ningyu' strawberry leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(10): 1894-1904 [陈立德, 李傲, 刘众杰, 等. 逆境胁迫对'宁玉'草莓叶片自噬小体数量及其相关基因表达的影响. *园艺学报*, 2017, 44(10): 1894-1904]
- CHEN X Z, LAI Q F, YAO Z L, *et al.* Technical model of green aquaculture in saline-alkali water. *China Fisheries*, 2020(9): 61-63 [陈学洲, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式. *中国水产*, 2020(9): 61-63]
- CHU P F, HE L, YANG C, *et al.* Grass carp *ATG5* and *ATG12* promote autophagy but down-regulate the transcriptional expression levels of IFN-I signaling pathway. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 92: 600-611
- EGAN D, KIM J, SHAW R J, *et al.* The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, 2011, 7(6): 643-644
- FANG W H, WANG H, LAI Q F. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(4): 78-81 [房文红, 王慧, 来琦芳. 碳酸盐碱度、pH 对中国对虾幼虾的致毒效应. *中国水产科学*, 2000, 7(4): 78-81]
- FENG W Y, YAO J, ZHAO Y, *et al.* Experiment on the cultivation of *Litopenaeus vannamei* in saline-alkali water. *Modern Agriculture*, 2020(4): 13-14 [冯伟业, 姚静, 赵悦, 等. 利用盐碱水养殖南美白对虾试验. *现代农业*, 2020(4): 13-14]
- GAO T, WANG Z X, CHEN Z M, *et al.* Oxidative stress and autophagy mediated by reactive oxygen species. *China Animal*

- Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 656–662 [高婷, 王子旭, 陈祝茗, 等. ROS 介导的氧化应激与自噬. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 656–662]
- GE Q Q, LI J, WANG J J, *et al.* Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24(3): 503–515
- HA C X, LIU P, HE Y Y, *et al.* Effects of high pH on immune enzymes of “Huanghai No.1” population of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(2): 303–306 [哈承旭, 刘萍, 何玉英, 等. 高 pH 胁迫对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶的影响. 中国水产科学, 2009, 16(2): 303–306]
- HAN S, HU W, LI C L, *et al.* Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus selenka*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 91–98 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 91–98]
- HAN X, HE Y Y, LI J, *et al.* Correlation between the SNP of NAGase gene and susceptibility to high pH stress in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 124–133 [韩旭, 何玉英, 李健, 等. 中国对虾 NAGase 基因 SNP 标记的筛选及与耐高 pH 性状的关联分析. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 124–133]
- HE L, RUAN J M, LIU Y, *et al.* Cloning of *Beclin1*, an autophagy gene, and its expression under Microcystin-LR stress in grass carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(3): 479–485 [何丽, 阮记明, 刘毅, 等. 草鱼自噬相关基因 *Beclin1* 的克隆及其在 MC-LR 胁迫下的表达特征. 水生生物学报, 2019, 43(3): 479–485]
- HE Y Y, LI Z X, ZHANG H E, *et al.* Genome-wide identification of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) microRNA responsive to low pH stress by deep sequencing. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24(4): 689–695
- HU S, HE Y Y, LI J, *et al.* Expression analysis of the V-ATPase subunit c under the condition of high pH stress in *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1064–1074 [胡硕, 何玉英, 李健, 等. 中国对虾 V-ATPase 亚基基因的克隆及其在高 pH 胁迫下的表达分析. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1064–1074]
- HU Z Y, CHEN B, ZHANG J P, *et al.* Up-regulation of autophagy-related gene 5 (*ATG5*) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson’s disease. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(44): 18062–18074
- JIA X. Functional analysis of apple autophagy-related gens *MdATG5-1* and *MdATG5-2* in response to drought and high temperature stresses. Master’s Thesis of Northwest A&F University, 2018 [贾昕. 苹果自噬相关基因 *MdATG5-1* 和 *MdATG5-2* 在干旱、高温逆境中的功能分析. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2018]
- JOUNAI N, TAKESHITA F, KOBIYAMA K, *et al.* The Atg5–Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(35): 14050–14055
- KLIONSKY D J, CREGG J M, DUNN W A Jr, *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 2003, 5(4): 539–545
- LI R P, ZHANG X X, LIU Z, *et al.* Distribution characteristics and relationships of pH, nutrients, chlorophyll-*a* and three sulfonamides in pond aquaculture water. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(6): 2582–2588 [李瑞萍, 张欣欣, 刘卓, 等. 池塘养殖水体 pH、营养盐、叶绿素 *a* 及 3 种磺胺类抗生素分布特征及其相关性分析. 环境工程学报, 2015, 9(6): 2582–2588]
- LI X P, CHI H, ZHANG J. Beclin-1 is involved in tongue sole *Cynoglossus semilaevis* immune defense against bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 8–12
- LI Z D. The role of Na⁺/H⁺ exchanger and carbonic anhydrase in *Fenneropenaeus chinensis* in response to pH stress. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [李政道. 钠氢交换体和碳酸酐酶在中国对虾响应 pH 胁迫中的功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LI Z X, TANG X Q, LI J, *et al.* Comparative proteomic and transcriptomic analysis reveals high pH-induced expression signatures of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Functional and Integrative Genomics*, 2021, 21(2): 299–311
- LIU F, LI J, LI J T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137–1147 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137–1147]
- LIU F. Effects of carbonate alkalinity stresses on the growth and reproduction of *Exopalaemon carinicauda*. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [柳飞. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生长和繁殖的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- LIU W. Mechanism of miR-7562 mediated ATG5-ATG12 conjugation system in response to *Vibrio harveyi* stress in *Penaeus monodon*. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [刘伟. 斑节对虾 miR-7562 介导下 ATG5-ATG12 共轭系统应答哈维弧菌胁迫的作用机制研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LIU Y, YU R H, ZHANG Z, *et al.* Effects of different pH on embryonic development and larval growth and development of bay scallop. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 108–114
- LUCIA S H, DANIELA U, WU Y, *et al.* Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research*, 2013, 57: 92–104

- MATSUSHITA M, SUZUKI N N, OBARA K, *et al.* Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(9): 6763–6772
- MININA E A, MOSCHOU P N, VETUKURI R R, *et al.* Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(6): 1415–1432
- MIZUSHIMA N, NODA T, OHSUMI Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO Journal*, 1999, 18(14): 3888–3896
- SIMONSEN A, CUMMING R C, BRECH A, *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*, 2008, 4(2): 176–184
- SUN H, MAO M G, JIANG J L, *et al.* Cloning and expression of ATG5 gene in Pacific cod *Gadus macrocephalus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(5): 478–483 [孙航, 毛明光, 蒋洁兰, 等. 太平洋鲑 ATG5 基因的克隆及表达分析. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(5): 478–483]
- SUN J Q. Technique of tilapia sheath and tail white shrimp in saline water pond. *Chinese Fisheries*, 2018(12): 103–105 [孙家强. 盐碱水池塘罗非鱼套养脊尾白虾技术. *中国水产*, 2018(12): 103–105]
- WANG J L, PANG Y Y, MA R, *et al.* Cloning of yak's (*Bos grunniens*) *Atg5* and its expression in the main reproductive organs. *Acta Theriologica Sinica*, 2019, 39(5): 546–555 [王靖雷, 潘阳阳, 马睿, 等. 牦牛 *Atg5* 基因克隆及其在输卵管、卵巢和子宫中的表达定位. *兽类学报*, 2019, 39(5): 546–555]
- WANG Y Z, CHEN Y, YU L. The discovery and research of autophagy. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(3): 229–239 [王懿峥, 陈扬, 俞立. 自噬的前世今生. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(3): 229–239]
- WANG Y, LI J, ZHANG Z, *et al.* Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 43–50]
- WEI J, LONG L Y, YANG K, *et al.* Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nature Immunology*, 2016, 17(3): 277–285
- WEI Y P. Systematic study of ATG genes in the regulation of yeast autophagy. Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2016 [卫亚平. ATG 基因调控酵母自噬的系统研究. 华中科技大学硕士研究生学位论文, 2016]
- YANG W. Functional study on the involvement of Beclin-1, AMPK β and Akirin in antibacterial immunity in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2019 [洋雯. Beclin-1、AMPK β 和 Akirin 参与中华绒螯蟹抗细菌免疫的功能研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- YANG Z G, ZHANG X D, TANG S L, *et al.* Research progress of autophagy on regulation of energy metabolism in tumor cells. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2015, 22(12): 1525–1529 [杨照国, 张小东, 唐世磊, 等. 自噬对肿瘤细胞能量代谢调控的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(12): 1525–1529]
- YAO Z L, WANG H, ZHOU K, *et al.* Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post-larval *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Ecology*, 2010(5): 945–950 [么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响. *生态学杂志*, 2010(5): 945–950]
- YAO Z L, YING C Q, ZHOU K, *et al.* Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 1–12 [么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达. *中国水产科学*, 2012, 19(1): 1–12]
- ZHANG X M. Preliminary study on the cause and mechanism of white spot syndrome virus (WSSV) pathogenicity to Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [张小明. 白斑综合征病毒(WSSV)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)致病的原因及机制初步研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- 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]

(编辑 冯小花)

Cloning of *ATG5* Gene of *Fenneropenaeus chinensis* and Expression Analysis under pH and Carbonate Alkalinity Stress

WEI Wei^{1,2}, HE Yuying², LI Zhaoxia^{1①}, ZHOU Yuxin³, LI Jian², XIE Yongjun⁴

(1. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266237, 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. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Hebei Provincial General Station of Aquatic Products and Fishery Environmental Monitoring and Protection, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract The full-length cDNA of *ATG5* in *Fenneropenaeus chinensis* was cloned using rapid amplification of cDNA end (RACE) technology and named *FcATG5*. The tissue expression of *FcATG5* and its expression characteristics under pH and carbonate alkalinity stress were analyzed using quantitative PCR. The function of *ATG5* was verified using RNAi. Gene analysis showed that the *FcATG5* gene cDNA consisted of 2225 bp with an open reading frame of 810 bp, encoding 269 amino acids, and has a predicted protein molecular weight of 31.103 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.59. It is a hydrophobin, contains an autophagy-related protein domain (APG5), has no transmembrane structure, and does not contain signal peptides. The homology and phylogenetic analysis showed that *FcATG5* was highly conserved and had the highest homology with *Litopenaeus vannamei*, reaching 98.14%. The tissue expression analysis showed that *FcATG5* was expressed in all tissues of *F. chinensis*, with the highest expression in muscle, and the lowest expression in blood lymphocyte ($P<0.05$). The expression level of *FcATG5* in the gill tissue was the highest at 96 h after pH stress, 2.67 times higher than that of the control group, and was the lowest at 48 h, which was 1.68 times higher than that of the control group. The expression level of *FcATG5* in the gill tissue was the highest at 12 h after the carbonate alkalinity stress, 2.77 times higher than that of the control group, and was the lowest at 96 h, which was 1.30 times higher than that of the control group. The results of the interference experiments showed that under pH and carbonate alkalinity stress, silencing the *FcATG5* gene significantly increased the mortality of *F. chinensis* ($P<0.05$), indicating that the higher the expression of this gene, the higher the survival rate of *F. chinensis*. The results of the study showed that the expression of *FcATG5* was significantly increased under pH and carbonate stress ($P<0.05$). It is speculated that autophagy may be involved in the regulation of *F. chinensis* in response to abiotic stress. The results of this study are an important reference for the study of autophagy in aquatic animals, especially crustaceans, and will help advance the research of Chinese shrimp in saline-alkaline aquaculture systems.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; *FcATG5*; pH stress; Carbonate alkalinity stress; RNAi

① Corresponding author: LI Zhaoxia, E-mail: zhx-l@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210407002

http://www.yykxjz.cn/

周建聪, 蔡利, 杨静茹, 林先鑫, 顾志峰, 石耀华, 刘春胜. 温度和氨氮对不同规格红螯螯虾耗氧率与排氮率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 95–102

ZHOU J C, CAI L, YANG J R, LIN X X, GU Z F, SHI Y H, LIU C S. Effects of temperature and ammonia on oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Cherax quadricarinatus* with different sizes. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 95–102

温度和氨氮对不同规格红螯螯虾 耗氧率与排氮率的影响*



周建聪¹ 蔡利¹ 杨静茹¹ 林先鑫¹
顾志峰^{1,2} 石耀华^{1①} 刘春胜^{1,2①}

(1. 海南大学海洋学院 海南 海口 507228;

2. 海南大学南海海洋资源利用国家重点实验室 海南 海口 507228)

摘要 为了揭示温度和氨氮浓度对红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)耗氧率(R_O)与排氮率(R_N)的影响,采用单因素实验设计和密闭流水法分析了不同温度和氨氮浓度条件下,3种规格红螯螯虾(小规格为S组、中规格为M组和大规格为L组) R_O 和 R_N 的变化规律。结果显示,温度对红螯螯虾 R_O 和 R_N 影响显著($P<0.05$),在温度为 $15^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 时, R_O 随温度升高而增加, 35°C 时,红螯螯虾的 R_O 达到最大值;其中,S组的 R_O 为 $0.777\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$,显著大于其他2个组($P<0.05$)。红螯螯虾 R_N 随温度升高呈先上升后下降的趋势, 30°C 时达到最大值;其中,S组的 R_N 为 $0.061\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$,显著大于其他2个组($P<0.05$)。温度对红螯螯虾的氧氮比(O/N)值有显著影响($P<0.05$)。氨氮浓度对红螯螯虾的 R_O 和 R_N 影响显著($P<0.05$),在氨氮浓度为 $0\sim 16\text{ mg}/\text{L}$ 时,二者均随氨氮浓度的上升呈先上升后下降的趋势;当氨氮浓度为 $8\text{ mg}/\text{L}$ 时,红螯螯虾的 R_O 达到最大值,S、M和L组 R_O 值分别为 0.663 、 0.332 和 $0.195\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$;当氨氮浓度为 $12\text{ mg}/\text{L}$ 时, R_N 达到最大值,S、M和L组 R_N 值分别为 0.123 、 0.049 和 $0.034\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$,且显著高于其他处理组($P<0.05$)。氨氮浓度对3种规格红螯螯虾的O/N值均有显著影响($P<0.05$)。不同温度条件下,红螯螯虾 R_O 和 R_N 的 Q_{10} 变化范围分别为 $1.102\sim 3.361$ 和 $0.346\sim 3.417$,且分别在 $25^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 和 $30^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 时达到最小。

关键词 红螯螯虾; 温度; 氨氮; 耗氧率; 排氮率

中图分类号 S966 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0095-08

呼吸排泄是水产动物新陈代谢的基本生理活动之一,亦是水产动物能量学研究的重要组成部分(栗志民等, 2010; 刘建勇等, 2019)。在各代谢参数中,氨氮

($\text{NH}_4^+\text{-N}$)与氧代谢水平是测量呼吸排泄的2个重要指标,可以有效地反映水产动物的代谢规律和生存状况(宋协法等, 2017; 刘春胜等, 2018)。

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900704)和院士团队创新中心项目(HD-YSZX-202011)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900704), and the Talent Development Program of Hainan Province (HD-YSZX-202011)]. 周建聪, E-mail: zhoujcgreat@163.com

① 通讯作者: 石耀华, 教授, E-mail: stone70@126.com; 刘春胜, 副教授, E-mail: lcs5113@163.com

收稿日期: 2021-04-07, 收修改稿日期: 2021-04-18

红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)俗称澳洲淡水龙虾,原产自澳大利亚,体型大,肉质鲜美,是经济价值较高的优良品种(Jones *et al*, 1994; 郑玉珍等, 2000; Vanzquez *et al*, 2007)。近年来,红螯螯虾养殖规模在我国广东、江苏和海南等南方各省逐年增加,年产量已达 3000 t (Yuan *et al*, 2019; 彭刚等, 2020)。在红螯螯虾养殖过程中,经常会出现温度变化以及过量投饵导致的养殖水体氨氮浓度变化等实际问题,严重影响红螯螯虾生产活动(Liane *et al*, 2011、2015)。Cui 等(1988)、闫茂仓等(2007)、李加儿等(2014)和王治平等(2021)研究表明,水产动物生长代谢不仅受自身因素如遗传、个体大小等的影响,还与水温、氨氮水平、盐度等外部环境因素密切相关。目前,国内外已有许多关于虾类[锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)、秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus Vannamei*)]、贝类和鱼类等水生动物呼吸代谢相关的研究(宋协法等, 2009; 刘凯等, 2010; Giacomini *et al*, 2019; 罗嘉俊等, 2020)。而对于红螯螯虾的研究主要集中于繁育、养成和饲料方面(Liu *et al*, 2020; Lu *et al*, 2020; 徐文倩等, 2020),在呼吸排泄方面鲜有报道。本实验采用密闭流水法,研究温度和氨氮浓度对不同规格红螯螯虾耗氧率(Oxygen consumption rate, R_O)和排氨率(Ammonia removal rate, R_N)的影响,旨在分析红螯螯虾呼吸代谢的规律,为红螯螯虾的养殖技术改良提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红螯螯虾取自海南省澄迈县四泰养殖场,选取健康无病害的个体,暂养于海南大学海洋学院实验室养殖系统内。暂养期间,每天早晚投饵2次,投饵后2 h 换水 1/2。养殖水体水温为(30.0±0.5)℃, pH 为 7.81±0.18,溶解氧(DO)为(7.09±0.28) mg/L。3种规格红螯螯虾体长和体重见表1。

表1 红螯螯虾生物学数据

Tab.1 Biological characteristics of *C. quadricarinatus*

组别 Groups	体长 Body length/cm	体重 Body weight/g
小规格 S	4.361±0.151 ^a	1.912±0.152 ^a
中规格 M	8.510±0.223 ^b	13.853±1.251 ^b
大规格 L	14.623±0.591 ^c	62.354±6.282 ^c

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different small letters indicated significant difference at 0.05 level

1.2 实验方法

1.2.1 温度对不同规格红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响

设置 15℃、20℃、25℃、30℃和 35℃共 5 个温度梯度。实验初始水温为(30.0±0.5)℃。各温度组采用冰袋和加热棒调节红螯螯虾暂养水温,每 12 h 升降温度 1℃,达到设定水温,待红螯螯虾适应 2 d 后再进行 R_O 和 R_N 测定。实验前停食 24 h。

1.2.2 氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响

氨氮浓度设置 0、4、8、12 和 16 mg/L 共 5 个水平,并通过在水中加入纯化 NH_4Cl 配制而成;每 12 h 升高 1 mg/L,达到设定氨氮浓度,红螯螯虾适应 2 d 后再进行实验。实验前停食 24 h。

1.3 R_O 和 R_N 的测定

本研究中, R_O 采用 Loligo systems 水生生物呼吸仪测定。将待测红螯螯虾及相应水温/氨氮浓度的水体转移至密闭呼吸器中(内腔体积为 1.6 L);另设一组呼吸器作为对照组,其内部充满相同水温和氨氮浓度的淡水,不放置红螯螯虾。呼吸仪运行 1.5 h,期间水流速度为 5 L/min,自动实时检测水体 DO。实验开始时与结束后分别采集 50 mL 水体,用于氨氮浓度的测定。根据预实验结果,每个呼吸器分别放置小、中和大规格红螯螯虾为 5 只、2 只和 1 只。水体中氨氮浓度使用 DeChem-Tech(德国)全自动化学分析仪测定,方法参照国标法(GB7148-81)。

1.4 指标计算

R_O 、 R_N 、氧氮比(O/N)值和温度系数(Q_{10})计算公式:

$$R_O = [(DO_0 - DO_t) \times V] / (W \times t) \quad (1)$$

$$R_N = [(N_t - N_0) \times V] / (W \times t) \quad (2)$$

$$O/N = R_O / R_N \quad (3)$$

式中, R_O 、 R_N 分别为单位体重耗氧率和排氨率[mg/(g·h)], DO_0 和 DO_t 分别为实验开始和实验结束后水中的 DO 含量(mg/L), V 为呼吸器中水的体积(L), W 为红螯螯虾重量(g), t 为实验持续时间(h), N_0 和 N_t 分别为实验开始和实验结束后水中总氨氮浓度(mg/L)。

温度系数公式:

$$Q_{10} = (R_2 / R_1)^{10 / (T_2 - T_1)} \quad (4)$$

式中, R_1 和 R_2 分别为实验温度 T_1 和 T_2 时红螯螯虾的 R_O 或 R_N [mg/(g·h)]。

1.5 数据分析

实验数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析, $P<0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 温度对不同规格红螯螯虾 R_O 、 R_N 和 O:N 值的影响

从表2可以看出, 温度对不同规格红螯螯虾 R_O 影响显著($P<0.05$)。在温度为 15℃~35℃时, 随着温度的增加, 红螯螯虾各组 R_O 均呈上升的趋势, 且在 35℃时达到最高。在相同温度时, S 组红螯螯虾 R_O 显著高于 M 和 L 组($P<0.05$)。温度对不同规格红螯螯虾 R_N 亦有显著影响($P<0.05$), 均随温度增加呈先上升后下降的趋势。在温度为 30℃时, 3 种规格红螯螯虾

R_N 均达到最高值, S、M 和 L 组红螯螯虾的 R_N 分别为 0.061、0.034 和 0.018 mg/(g·h), 且各组相比差异显著($P<0.05$)。

温度对不同规格红螯螯虾 O/N 值的影响见表 3。从表 3 可以看出, 在温度为 15℃~35℃条件下, 红螯螯虾的 O:N 值为 8.636~20.899。同一规格红螯螯虾在不同温度时, O:N 值呈先下降后升高的趋势, 且各温度条件下, O:N 值存在显著性差异($P<0.05$)。在温度为 20℃时, L 组红螯螯虾 O/N 值最高, 为 20.830, 显著高于其他 2 个组($P<0.05$), 其他温度不同规格红螯螯虾 O:N 值相比均无显著差异($P>0.05$)。

表 2 温度对不同规格红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响

Tab.2 Effects of temperature on the oxygen consumption and ammonia excretion rates in *C. quadricarinatus*

温度 Temperature/°C	耗氧率 Oxygen consumption rate/[mg/(g·h)]			排氮率 Ammonia excretion rate/[mg/(g·h)]		
	小规格 S	中规格 M	大规格 L	小规格 S	中规格 M	大规格 L
15	0.329±0.059 ^{Ab}	0.136±0.020 ^{Bd}	0.084±0.020 ^{Bc}	0.018±0.002 ^{Ac}	0.010±0.001 ^{Bc}	0.005±0.001 ^{Cc}
20	0.386±0.010 ^{Ab}	0.197±0.012 ^{Bcd}	0.153±0.010 ^{Cb}	0.027±0.002 ^{Abc}	0.018±0.002 ^{Bb}	0.007±0.001 ^{Cc}
25	0.500±0.063 ^{Ab}	0.275±0.010 ^{Bbc}	0.163±0.019 ^{Cb}	0.033±0.006 ^{Abc}	0.024±0.005 ^{Ab}	0.011±0.002 ^{Bb}
30	0.525±0.060 ^{Ab}	0.314±0.009 ^{Bb}	0.173±0.021 ^{Cb}	0.061±0.005 ^{Aa}	0.034±0.003 ^{Ba}	0.018±0.002 ^{Ca}
35	0.777±0.150 ^{Aa}	0.420±0.060 ^{Ba}	0.286±0.045 ^{Ba}	0.041±0.013 ^{Ab}	0.020±0.002 ^{Bb}	0.016±0.002 ^{Ba}

注: 不同大写字母表示同温度组 R_O (R_N) 差异显著($P<0.05$); 不同小写字母上标表示同规格组差异显著($P<0.05$), 下同

Note: Different capital letters in the same row indicated significant difference at 0.05 level at the same temperature; different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level at the same size, the same as below

表 3 不同规格红螯螯虾在不同温度下的氧氮比

Tab.3 O/N ratios of different size *C. quadricarinatus* under different temperature levels

温度 Temperature/°C	小规格 S	中规格 M	大规格 L
15	18.432±2.448 ^{Aa}	14.164±1.217 ^{Ab}	16.832±1.888 ^{Aab}
20	14.155±1.217 ^{Bab}	10.733±1.440 ^{Bb}	20.830±2.254 ^{Aa}
25	15.822±4.454 ^{Aab}	11.948±1.737 ^{Ab}	14.252±1.233 ^{Abc}
30	8.636±1.300 ^{Ab}	9.359±0.912 ^{Ab}	9.442±0.485 ^{Ac}
35	19.477±4.890 ^{Aa}	20.899±4.121 ^{Aa}	18.846±3.702 ^{Aab}

2.2 氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 R_O 、 R_N 和 O:N 值的影响

从表 4 可以看出, 氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 R_O 影响显著($P<0.05$)。在氨氮浓度为 0~16 mg/L 时, 随着氨氮浓度的上升, 各组均呈先上升后下降的趋势, 且在氨氮浓度为 8 mg/L 达到最高。在相同氨氮浓度条件下, S 组红螯螯虾 R_O 显著高于与 M 和 L 组($P<0.05$)。氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 R_N 亦有显著影响($P<0.05$), 均随氨氮浓度的升高呈先上升后下降的趋势。在氨氮浓度为 12 mg/L 时, 3 种规格红螯螯虾 R_N 均达到最高值。在该氨氮浓度条件下, S、M 和 L 组红螯螯虾的 R_N 分别为 0.123、0.049 和 0.034 mg/g·h, 且各规格间相比差异显著($P<0.05$)。

氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 O:N 值的影响见

表 5。从表 5 可以看出, 在氨氮浓度为 0~16 mg/L 时, 红螯螯虾的 O:N 值为 3.729~9.442。同一规格红螯螯虾在不同氨氮浓度条件下, O:N 值呈先下降后升高的趋势, 且各组相比差异显著($P<0.05$)。在氨氮浓度为 0~8 mg/L 时, 不同规格红螯螯虾 O:N 值相比无显著差异($P>0.05$), 其他浓度组相比差异显著($P<0.05$)。

2.3 温度对不同规格红螯螯虾 Q_{10} 值的影响

从表 6 可以看出, 在实验温度为 15℃~35℃时, 红螯螯虾 R_O 的 Q_{10} 值为 1.102~3.361, 平均为 1.820。S 组红螯螯虾 R_O 的 Q_{10} 值呈先上升后下降的趋势, M 和 L 组均呈先下降后上升的趋势。红螯螯虾 R_N 的 Q_{10} 值为 0.346~3.417, 平均值为 1.819。3 种规格 R_N 的 Q_{10} 值在 30℃~35℃时均达到最低。

表4 氨氮浓度对不同规格红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响Tab.4 Effect of ammonia on the oxygen consumption and ammonia excretion rates in *C. quadricarinatus*

氨氮浓度 Ammonia concentration/(mg/L)	耗氧率 Oxygen consumption rate/[mg/(g·h)]			排氨率 Ammonia excretion rate/[mg/(g·h)]		
	小规格 S	中规格 M	大规格 L	小规格 S	中规格 M	大规格 L
0	0.525±0.060 ^{Aab}	0.314±0.009 ^{Bab}	0.173±0.021 ^{Cab}	0.061±0.005 ^{Ac}	0.034±0.003 ^{Bb}	0.018±0.002 ^{Cc}
4	0.643±0.048 ^{Aa}	0.319±0.003 ^{Bab}	0.187±0.017 ^{Ca}	0.070±0.006 ^{Ac}	0.035±0.002 ^{Bb}	0.021±0.004 ^{Cd}
8	0.663±0.108 ^{Aa}	0.332±0.006 ^{Ba}	0.195±0.008 ^{Ba}	0.087±0.002 ^{Ab}	0.038±0.002 ^{Bab}	0.025±0.002 ^{Cbc}
12	0.457±0.069 ^{Ab}	0.283±0.048 ^{Bab}	0.146±0.012 ^{Cbc}	0.123±0.005 ^{Aa}	0.049±0.002 ^{Ba}	0.034±0.001 ^{Ca}
16	0.348±0.017 ^{Ab}	0.225±0.064 ^{Bb}	0.133±0.006 ^{Bc}	0.093±0.003 ^{Ab}	0.032±0.010 ^{Bb}	0.029±0.002 ^{Bab}

表5 不同规格红螯螯虾在不同氨氮浓度下的氧氮比(O:N)

Tab.5 O:N ratios of different size *C. quadricarinatus* under different ammonia concentrations

氨氮浓度 Ammonia/(mg/L)	小规格 S	中规格 M	大规格 L
0	8.636±1.300 ^{Aa}	9.359±0.912 ^{Aa}	9.442±0.485 ^{Aa}
4	9.143±0.135 ^{Aa}	9.066±0.543 ^{Aa}	8.869±0.654 ^{Aab}
8	7.614±1.435 ^{Aa}	8.848±0.375 ^{Aa}	7.822±0.695 ^{Ab}
12	3.729±0.687 ^{Bb}	5.754±1.063 ^{Ab}	4.292±0.502 ^{ABc}
16	3.735±0.264 ^{Cb}	6.957±0.066 ^{Ab}	4.540±0.438 ^{Bc}

表6 不同温度下红螯螯虾 R_O 和 R_N 的 Q_{10} 值Tab.6 Q_{10} values of oxygen consumption and ammonia excretion rates under different temperature levels in *C. quadricarinatus*

温度 Temperature/°C	耗氧率 Q_{10} Oxygen consumption rate Q_{10}			排氨率 Q_{10} Ammonia excretion rate Q_{10}		
	小规格 S	中规格 M	大规格 L	小规格 S	中规格 M	大规格 L
15~20	1.377	2.098	3.361	2.250	3.240	1.960
20~25	1.678	1.948	1.135	1.493	1.778	2.469
25~30	1.102	1.304	1.126	3.417	2.007	1.636
30~35	2.190	1.789	2.733	0.452	0.346	0.790

3 讨论

3.1 温度对红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响

温度是影响水生经济动物生长代谢的重要环境因子。众多研究表明,在适宜温度时,水生动物 R_O 和 R_N 随温度的升高而增加(王冲等, 2018)。锦绣龙虾、凡纳滨对虾等虾类均符合这一规律(宋协法等, 2009; 罗嘉俊等, 2020), 其他水生经济动物如钝吻黄盖鲽 (*Pseudopleuronectes yokohamae*) 幼鱼、九孔鲍 (*Haliotis diversicolor*) 等也是如此(崔前进等, 2018; 王崇懿等, 2020)。本研究结果显示,在温度为 15°C~35°C 时,红螯螯虾 R_O 随温度升高而增加; R_N 在 15°C~30°C 范围内不断增加,在 35°C 时逐渐下降。红螯螯虾的最适生长水温为 24°C~32°C (石顺芳等, 2020), 高于 32°C 会对其排泄产生一定的抑制作用,进而使 R_N 降低。 Q_{10} 是反映温度对水生生物代谢影响的指标,本研究中,在温度为 25°C~30°C 时,3 种规格红螯螯虾 R_O

的 Q_{10} 值均最小,说明当温度适宜时,其对红螯螯虾呼吸影响不大(邢道超等, 2017)。而在该温度范围内,S 组红螯螯虾 R_N 的 Q_{10} 值最大,其他 2 个组 R_N 的 Q_{10} 值在其他温度时最高,说明较大规格的红螯螯虾更能适应温度的变化。

3.2 氨氮浓度对红螯螯虾 R_O 和 R_N 的影响

严银龙等(2019)、孙明龙等(2020)和时嘉赓等(2020)研究表明,水产动物 R_N 不仅与饵料、温度和盐度等密切相关,亦受水体中氨氮浓度的影响。当水体环境中氨氮浓度过高时,会导致水生动物代谢紊乱、组织结构受损甚至死亡,如棘胸蛙 (*Paa spinosa*) 蝌蚪在氨氮浓度超过 14.70 mg/L 后,其皮肤供氧效率将会下降;大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 在氨氮浓度超过 4.31 mg/L 后出现呼吸抑制(姜令绪等, 2004; 曾庆婷等, 2016; 牛春格等, 2019; 杨斯琪等, 2019; 孟振等, 2020)。因此,有必要通过探究红螯螯虾在不同氨氮浓度条件下呼吸代谢来确定其最佳氨氮耐受范围。在

实验浓度范围内, 红螯螯虾的 R_O 呈先上升后下降的趋势, 并在浓度超过 12 mg/L 时达到最高, 这一研究结果与潘训彬等(2017)研究结果类似。这是因为当水中氨氮浓度上升时, 水中的氨会通过红螯螯虾的鳃进入其体内, 造成血氨积累, 进而改变了红螯螯虾代谢模式, 促进其排氮; 而当水中非离子氨浓度继续升高至一定阈值时, 又会影响其鳃的排氮, 同时, 也抑制呼吸代谢(冼健安等, 2014; 邹李昶等, 2015)。

3.3 温度、氨氮浓度对红螯螯虾 O:N 值的影响

O:N 值是研究水产动物生长代谢的一个重要参数, 其大小表示该生物体内蛋白质与脂肪、碳水化合物分解代谢的比率(Torres *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2008; 王鹏帅等, 2017; 聂鸿涛等, 2017)。当 O:N 值较小(约为 7 时)时, 表明该生物体内主要以蛋白质代谢为主, 而 O:N 值为 24 时, 则表明该生物体内主要以脂肪和蛋白质混合代谢为主。在温度为 15℃~35℃ 时, 红螯螯虾的 O:N 值为 8.636~20.899, 说明在该温度范围内, 其代谢的能量主要由蛋白质和脂肪提供(胡发文等, 2021)。而在氨氮浓度为 0~8 mg/L 内, 红螯螯虾的 O:N 值为 7.614~9.442, 表明此时红螯螯虾代谢仍通过脂肪和蛋白质供能, 但蛋白质利用比例较高; 当氨氮浓度为 8~16 mg/L 时, 红螯螯虾的 O:N 值为 3.729~6.957, 此时, 红螯螯虾代谢则以蛋白质供能为主(刘鹏远等, 2020; 霍恩泽等, 2021)。

综上所述, 温度和氨氮浓度对不同规格红螯螯虾的 R_O 和 R_N 均影响显著。在养殖过程中, S 组红螯螯虾最适生长温度为 25℃~30℃; 相较于 S 组个体, M 和 L 组红螯螯虾耐高温能力更强, 但也不宜超过 35℃。本实验条件下, 红螯螯虾的氨氮耐受浓度为 8~12 mg/L。在红螯螯虾养殖中, 应该严格控制水温变化, 并且做好日常水质监测, 避免因水体中氨氮浓度过高而影响其生长代谢。

参 考 文 献

- CUI Q J, SHANG S N, CAI Z L, *et al.* Influence of salinity, temperature and body weight on oxygen consumption and ammonia excretion of *Pleuronectes yokohama* juvenile. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(1): 64–72 [崔前进, 尚胜男, 蔡忠璐, 等. 盐度、温度和体质量对钝吻黄盖鲽幼鱼排氮率和耗氧率的影响. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(1): 64–72]
- CUI Y, WOOTTON R J. The metabolic rate of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.) (Pisces: Cyprinidae), in relation to ration, body size and temperature. *Functional Ecology*, 1988, 2(2): 157–161
- GIACOMIN M, DAL P G, EOM J, *et al.* The effects of salinity and hypoxia exposure on oxygen consumption, ventilation, diffusive water exchange and ionoregulation in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2019, 232: 47–59
- HU F W, WANG X L, GAO F X, *et al.* Influence of temperature, salinity, and anesthetics on the oxygen consumption and ammonia excretion rates in fat greenling (*Hexagrammos otakii*) juveniles. *Marine Sciences*, 2021, 45(1): 54–61 [胡发文, 王晓龙, 高凤祥, 等. 温度、盐度和两种麻醉剂对大泷六线鱼幼鱼耗氧率、排氮率的影响. *海洋科学*, 2021, 45(1): 54–61]
- HUO E Z, ZHANG W W, LI J Q, *et al.* Effects of acute salinity changes on energy budgets of oysters *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea gigas*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 132–138 [霍恩泽, 张雯雯, 李加琦, 等. 盐度骤降对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 132–138]
- JIANG L X, PAN L Q, XIAO G Q. Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(6): 537–541 [姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 537–541]
- JONES C M, MEDLEY P B, AVAULT J W. A global perspective of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: Production, economics and marketing. *Journal of World Aquaculture Society*, 1994, 25(4): 6–13
- LI J E, CAO S H, OU Y J, *et al.* Influence of temperature, salinity, and pH on oxygen consumption rate, ammonia excretion rate, and suffocation point in juvenile *Mugil cephalus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 954–962 [李加儿, 曹守花, 区又君, 等. 温度、盐度和 pH 对鲮鱼幼鱼耗氧率、排氮率以及窒息点的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 954–962]
- LI Z M, LIU Z G, XIE L, *et al.* Effect of body weight and temperature on oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Chlamys nobilis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(1): 99–105 [栗志民, 刘志刚, 谢丽, 等. 体重和温度对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)耗氧率和排氮率的影响. *海洋与湖沼*, 2010, 41(1): 99–105]
- LIANE S, LAURA S, LÓPEZ G. Compensatory growth in juveniles of freshwater red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* reared at three different temperatures: Hyperphagia and food efficiency as primary mechanisms. *PLoS One*, 2015, 10(9): 1–19
- LIANE S, NATALIA S C, FERNANDO C D, *et al.* Effect of intermittent feeding on growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 2011, 319(1): 98–104
- LIU C S, LIU X X, WANG H, *et al.* Effects of light intensity and spectra on metabolism of ammonia, active phosphates, and

- oxygen consumption in *Tridacna crocea*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2): 313–318 [刘春胜, 刘小霞, 汪浩, 等. 光照强度和光色对番红砗磲(*Tridacna crocea*) 氮氮、活性磷酸盐及氧代谢的影响. *海洋与湖沼*, 2018, 49(2): 313–318]
- LIU F, GENG C, QU Y K, *et al.* The feeding of dietary *Codonopsis pilosula* polysaccharide enhances the immune responses, the expression of immune-related genes and the growth performance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 103: 321–331
- LIU J Y, CHEN Y Y, CAO F J, *et al.* Effects of salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of different size in *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(5): 129–134 [刘建勇, 陈园媛, 曹伏君, 等. 盐度对不同规格九孔鲍耗氧量和排氮率的影响. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(5): 129–134]
- LIU K, XU D P, DUAN J R, *et al.* Effects of water temperature and body mass on oxygen consumption and ammonia excretion of artificially domesticated *Exopalaemon modestus* offspring in Taihu Lake. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 957–962 [刘凯, 徐东坡, 段金荣, 等. 体质量和水温对太湖秀丽白虾人工驯养子代耗氧率和排氮率的影响. *生态学杂志*, 2010, 29(5): 957–962]
- LIU P Y, ZHANG C X, ZHAO B L, *et al.* Effects of salinity stress on the oxygen consumption and ammonia excretion rates of the invasive fresh snail *Pomacea canaliculate*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2020, 28(7): 1072–1078 [刘鹏远, 张春霞, 赵本良, 等. 盐胁迫对福寿螺耗氧率和排氮率的影响. *中国生态农业学报(中英文)*, 2020, 28(7): 1072–1078]
- LU X, PENG D, CHEN X R, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth, muscle composition, digestive enzymes activities, hemolymph biochemical indices and ovary development of pre-adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture Reports*, 2020, 18
- LUO J J, LIANG H F, ZHUO H B, *et al.* Study on the oxygen consumption rate and suffocation threshold of Juvenile *Panulirus ornatus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(17): 112–114 [罗嘉俊, 梁华芳, 卓宏标, 等. 锦绣龙虾幼虾耗氧率和窒息点研究. *安徽农业科学*, 2020, 48(17): 112–114]
- 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]
- NIE H T, XING N N, WANG H L, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion in Cockle *Clinocardium californiense*. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 658–661 [聂鸿涛, 邢宁宁, 王海伦, 等. 温度和盐度对加州扁鸟蛤耗氧率和排氮率的影响. *水产科学*, 2017, 36(5): 658–661]
- NIU C G, YANG C, SHEN T Y, *et al.* Acute effect of ammonia toxicity attack on mortality, ammonia excretion rate, oxygen consumption and suffocation point on *Paa spinosa* tadpoles in aquatic economy. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(1): 188–196 [牛春格, 杨程, 申屠琰, 等. 氨氮急性攻毒对水产经济动物棘胸蛙(*Paa spinosa*)蝌蚪死亡率、排氮率、耗氧率及窒息点的影响. *海洋与湖沼*, 2019, 50(1): 188–196]
- PAN X B, ZHANG X X, LU Y P, *et al.* Acute toxicity of ammonia and nitrite on juvenile and subadult red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Biosafety*, 2017, 26(4): 316–322 [潘训彬, 张秀霞, 鲁耀鹏, 等. 氨氮和亚硝酸盐对红螯螯虾幼虾和亚成虾的急性毒性. *生物安全学报*, 2017, 26(4): 316–322]
- PENG G, XU Y, ZHANG Y, *et al.* Genetic diversity analysis of successive generations of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* in different breeding areas in China. *Fisheries Science*, 2020, 39(4): 615–619 [彭刚, 徐宇, 张燕, 等. 红螯螯虾累代繁养群体的遗传多样性分析. *水产科学*, 2020, 39(4): 615–619]
- SHI J G, FENG Y W, JIANG X, *et al.* Effects of water temperature and macroalga species on feeding, respiration and ammonia excretion of Sea Urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Fisheries Science*, 2020, 39(1): 72–78 [时嘉赓, 冯艳微, 姜绪, 等. 水温和藻类对马粪海胆摄食、呼吸及排氮率的影响. *水产科学*, 2020, 39(1): 72–78]
- SHI S F, ZHENG M T, TAN J, *et al.* Characteristics and pond ecological aquaculture technique of *Cherax quadricarinatus*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(1): 203–204, 207 [石顺芳, 郑梦婷, 谭进, 等. 红螯螯虾的特征特性及池塘生态养殖技术. *现代农业科技*, 2020(1): 203–204, 207]
- SHI Y J, LISA J, FENG H, *et al.* Optimizing reproductive performance and embryonic development of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* by manipulating water temperature. *Aquaculture*, 2019, 510: 32–42
- SONG X F, CHENG Y W, XING D C, *et al.* Influences of temperature and weight on oxygen consumption rate and ammonium excretion of *Oplegnathus punctatus* and their circadian rhythms. *Periodical of Ocean University of China (Nature Science)*, 2017, 47(9): 21–29 [宋协法, 程亚伟, 邢道超, 等. 温度、体重对斑石鲷耗氧率、排氮率的影响及昼夜节律变化. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(9): 21–29]
- SONG X F, LIU P, GE C Z. Interactive effects of temperature and salinity on oxygen consumption, ammonia-nitrogen excretion and phosphate excretion in *Litopenaeus vannamei*. *Fishery Modernization*, 2009, 36(2): 1–6 [宋协法, 刘鹏, 葛长宇. 温度、盐度交互作用对凡纳滨对虾耗氧和氨氮、磷排泄的影响. *渔业现代化*, 2009, 36(2): 1–6]
- SUN M L, BAI Z Y, FU B C, *et al.* Diurnal variation in oxygen consumption and ammonia excretion and feeding rhythm of

- freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* under different alga concentrations. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(6): 56–60 [孙明龙, 白志毅, 傅百成, 等. 三角帆蚌耗氧率和排氨率的昼夜变化及不同饵料浓度下的摄食节律. *水产学杂志*, 2020, 33(6): 56–60]
- TORRES G, GIMENEZ L, ANGER K. Effects of reduced salinity on the biochemical composition (*lipid, protein*) of zoeal decapod crustacean larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 277: 43–60
- VANZQUEZ F J, LOPEZ-GRECO L S. Intersex females in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Revista de Biología Tropical*, 2007, 55(2): 25–32
- WANG C, SUN T Q, WANG Y Q, *et al.* Influences of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Scapharca subcrenata*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(1): 110–115 [王冲, 孙同秋, 王玉清, 等. 温度和盐度对毛蚶耗氧率和排氨率的影响. *海洋湖沼通报*, 2018(1): 110–115]
- WANG C Y, HU B H, LIU J Y, *et al.* Effects of temperature and body weight on oxygen consumption and ammonia excretion rates of variously colored abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(3): 387–391 [王崇懿, 胡宝华, 刘建勇, 等. 温度、体质量对九孔鲍耗氧率和排氨率的影响. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(3): 387–391]
- WANG P S, JIANG X M, HAN Q X, *et al.* Effects of salinity and temperature on the oxygen consumption, ammonia excretion rates and suffocation threshold of different sizes of juvenile *Sepia pharaonis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 1027–1035 [王鹏帅, 蒋霞敏, 韩庆喜, 等. 盐度和温度对不同规格虎斑乌贼幼体的耗氧率、排氨率和窒息点的影响. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 1027–1035]
- WANG Z P, LI B, QIN L, *et al.* Metabolic characteristics and adaptability of a new variety of sea cucumber “Shenyou No.1” under different salinities. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 108–116 [王治平, 李彬, 秦蕾, 等. 刺参“参优1号”新品种在不同盐度下的代谢特征和适应性研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 108–116]
- XIAN J A, QIAN K, GUO H, *et al.* Research progress in toxic effects of ammonia-N on shrimp. *Feed Industry*, 2014, 35(22): 52–58 [冼健安, 钱坤, 郭慧, 等. 氨氮对虾类毒性影响的研究进展. *饲料工业*, 2014, 35(22): 52–58]
- XING D C, SONG X F, PENG L, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of juvenile *Epinephelus groupers*. *Fishery Modernization*, 2017, 44(3): 7–14 [邢道超, 宋协法, 彭磊, 等. 温度与盐度对云龙石斑鱼幼鱼耗氧率和排氨率的影响. *渔业现代化*, 2017, 44(3): 7–14]
- XU W Q, YE J Y. Initial effects of compound microbial preparation on water quality of framing system and intestinal microbial community of high-density cultured red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Microbiology*, 2020, 40(5): 58–66 [徐文倩, 叶姜瑜. 复合菌剂 M5 对红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)高密度养殖系统水质及其肠道微生物群落影响的初步研究. *微生物学杂志*, 2020, 40(5): 58–66]
- YAN M C, SHAN L Z, SHAO X B, *et al.* Influences of temperature and weight on respiration and excretion of *Miichthys miiuy* juvenile. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 26(1): 44–49 [闫茂仓, 单乐州, 邵鑫斌, 等. 温度及体重对鲢鱼幼鱼耗氧率和排氨率的影响. *热带海洋学报*, 2007, 26(1): 44–49]
- YAN Y L, YUAN X C, SHI Y H, *et al.* Effects of salinity on growth, oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of juvenile marbled rockfish *Sebastes marmoratus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 545–551 [严银龙, 袁新程, 施永海, 等. 盐度对褐菖鲉幼鱼生长、耗氧率和排氨率的影响. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(4): 545–551]
- YANG S Q, ZHENG H W, SUN Y, *et al.* Effects of ammonia exposure, temperature, and body weight on oxygen consumption rate and asphyxiation point of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(6): 1328–1333 [杨斯琪, 郑洪武, 孙颖, 等. 氨氮、温度和体重大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)幼鱼耗氧率和窒息点的影响. *海洋与湖沼*, 2019, 50(6): 1328–1333]
- YUAN J L, GUO J L, WANG H Y, *et al.* Acute toxicity of cypermethrin on the juvenile of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Chemosphere*, 2019, 237, 124468
- ZENG Q T, YU H N, LIN X T, *et al.* Effects of ammonia-nitrogen on locomotor performance and the energy budget of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23 (1): 198–206 [曾庆婷, 于赫男, 林小涛, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾运动行为与能量分配模式变化. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 198–206]
- ZHENG Y Z, FU P S. The biological characteristics and breeding technology of *Cherax quadricarinatus*. *Inland Fisheries*, 2000(4):36–37 [郑玉珍, 付佩胜. 红螯螯虾的生物学特性及养殖技术. *内陆水产*, 2000(4): 36–37]
- ZHENG Z, JIN C, LI M, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile *miiuy* croaker, *Miichthys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture International*, 2008, 16(6): 581–589
- ZOU L C, REN S Y, WANG Z Z, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on mortality, oxygen consumption, and suffocation point in freshwater shrimp *Macrobrachium nipponensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 206–211 [邹李昶, 任夙艺, 王志铮, 等. 氨氮急性胁迫对日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)死亡率、耗氧率及窒息点的影响. *海洋与湖沼*, 2015, 46(1): 206–211]

Effects of Temperature and Ammonia on Oxygen Consumption and Ammonia Excretion Rates of *Cherax quadricarinatus* with Different Sizes

ZHOU Jiancong¹, CAI Li¹, YANG Jingru¹, LIN Xianxin¹,
GU Zhifeng^{1,2}, SHI Yaohua^{1①}, LIU Chunsheng^{1,2①}

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou, Hainan 507228, China; 2. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou, Hainan 507228, China)

Abstract To determine the influence of temperature and ammonia on the oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), a single factor experimental design and closed flow method were used to analyze the influence of temperature and ammonia concentration on the oxygen consumption and ammonia excretion rates of crayfish of three sizes (S, M, and L representing small, medium, and large crayfish, respectively). The results were as follows. Temperature had significant effects on the oxygen consumption and ammonia excretion rates of crayfish. The oxygen consumption rate increased with the increase in temperature (15°C~35°C), and at 35°C, the oxygen consumption rate reached the maximum, wherein the rate of the S group was 0.777 mg/(g·h), significantly higher than that of the other two size classes. The ammonia excretion rate of the crayfish increased first and then decreased with increasing temperature, and reached a maximum at 30°C; among the size classes, the ammonia excretion rate of the S group was 0.061 mg/(g·h) and was significantly higher than the other two sizes. Temperature had a significant effect on the oxygen/nitrogen ratio of the crayfish. 2 The level of ammonia significantly affected the oxygen consumption and ammonia excretion rates of the crayfish. The oxygen consumption and ammonia excretion rates increased with an increase in the ammonia concentration, and then decreased. The oxygen consumption rate reached a maximum at an ammonia concentration of 8 mg/L, which was 0.663, 0.332, and 0.195 mg/(g·h) in the S, M, and L groups, respectively, whereas the ammonia excretion rate reached a maximum at an ammonia concentration of 12 mg/L, which was 0.123, 0.049, and 0.034 mg/(g·h) in the S, M, and L groups, respectively, and was significantly higher than those of the other groups. Furthermore, the ammonia concentration had a significant effect on the oxygen/nitrogen ratio of the crayfish. The Q_{10} values for the oxygen consumption and ammonia excretion rates ranged from 1.102~3.361 and 0.346~3.417, and at the minimum values were at 25°C~30°C and 30°C~35°C, respectively.

Key words *Cherax quadricarinatus*; Temperature; Ammonia; Oxygen consumption rate; Ammonia excretion rate

① Corresponding author: SHI Yaohua, E-mail: stone70@126.com; LIU Chunsheng, E-mail: lcs5113@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210322001

http://www.yykxjz.cn/

莫梦松, 蔡楠, 李来好, 王旭峰, 王强, 关婉琪, 赵东豪. 罗氏沼虾成虾中氨基脲的分布特征. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 103-109

MO M S, CAI N, LI L H, WANG X F, WANG Q, GUAN W Q, ZHAO D H. Distribution characteristics of semicarbazone in adult *Macrobrachium rosenbergii*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 103-109

罗氏沼虾成虾中氨基脲的分布特征*

莫梦松^{1,2} 蔡楠² 李来好^{2①} 王旭峰²
王强² 关婉琪² 赵东豪^{2①}

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所
农业农村部水产品加工重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室 广东 广州 510300)

摘要 从未使用呋喃西林的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖场采集商品规格虾样品, 分离壳、肌肉、肌肉表皮层、内脏和复眼等组织测定氨基脲(semicarbazide, SEM), 探究其在商品规格罗氏沼虾不同组织中的本底含量, 为质量安全监管提供技术支撑。结果显示, 罗氏沼虾各组织中 SEM 平均含量为(12.90±2.47) μg/kg, 其中, 外骨骼(复眼、外壳和肢足)中的平均含量分别为(33.29±3.06)、(29.00±5.67)和(28.10±7.08) μg/kg, 占总量的 77.9%。肌肉中 SEM 含量最低, 平均值为(1.83±0.24) μg/kg。不同组织中 SEM 含量从高到低依次为复眼>外壳>肢足>肠>鳃>肌肉表皮层>肝>生殖腺>肌肉。鉴于目前的技术手段还难以区分罗氏沼虾体内 SEM 的来源是内源性还是外源性, 因此, 建议监管部门在开展罗氏沼虾中呋喃西林残留量的监控时, 考虑减去 SEM 的本底含量, 以避免误判情形的发生。

关键词 罗氏沼虾; 氨基脲; 呋喃西林; 分布特征

中图分类号 O657.63 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0103-07

氨基脲(semicarbazide, SEM)又名氨基甲酰肼, 是一种有机合成原料, 作为药物合成的中间体, 可用于生产呋喃西林等药物。呋喃西林具有广谱抗菌作用, 对大多数革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、某些真菌和原虫有杀灭作用(陈杖榴, 2002)。但该药物被认为有潜在的致癌和致突变作用, 中国、日本和欧盟等国家或地区已经禁止在养殖业中使用这些药物(Park *et al*, 2017; Shendy *et al*, 2016)。呋喃西林在用药数小时内迅速代谢为 5-硝基-2-糖醛(5-nitro-2-furaldehyde, NF)和 SEM (Wang *et al*, 2019), 其中, SEM 可与组织结

合, 在动物体内持续停留数周, 甚至数月(Li *et al*, 2010; Tang *et al*, 2018; 赵东豪等, 2012), 常作为呋喃西林的残留标志物(Zhang *et al*, 2016)。欧盟规定动物源性产品中 SEM 的最低限量要求为 1 μg/kg (Shendy *et al*, 2016; Wang *et al*, 2019)。

针对 SEM 的检测方法较多(Du *et al*, 2014; Li *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2016), 其中, 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)由于具备灵敏度和准确度高的优点, 是目前检测动物源性食品中 SEM 残留的首要推荐方法。该方法的流程: 对动物源性组织酸解游离出

* 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2021SD20)和广州市科技计划项目(201904010391)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2021SD20), and the Guangzhou Science and Technology Project (201904010391)]. 莫梦松, E-mail: 1297260525@qq.com

① 通讯作者: 李来好, 研究员, E-mail: laihao@163.com; 赵东豪, 副研究员, E-mail: donghaozhao@126.com

收稿日期: 2021-03-22, 收修改稿日期: 2021-04-28

的 SEM 进行衍生化反应,再经富集净化浓缩处理后上机测定(Wang *et al.*, 2019; 于慧娟等, 2012)。然而, SEM 衍生物也可能来源于偶氮二甲酰胺和尿素反应,这些化学物质通常用于食品保存(Calle *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2017)。此外, SEM 在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和河蟹(*Eriocheir sinensis*)等甲壳类水产品中经常检出,且外壳中 SEM 含量要高于肌肉(McCracken *et al.*, 2013; 王鼎南等, 2016),表明甲壳类动物体内 SEM 来源广泛,难以准确区分内源性产生、食源性引入或非法使用呋喃西林所致等,且 SEM 在甲壳类动物体内的组织分布特征不明确,缺少相关文献资料,对监管提出了新的要求。

本研究以未使用呋喃西林的罗氏沼虾为研究对象,采集商品规格样品,分离不同组织测定 SEM 含量,结合同时采集的饲料、水体、底泥及混养的鲫鱼(*Carassius auratus*)样品的检测结果,研究 SEM 在罗氏沼虾体内的组织分布特征,掌握其本底含量水平,在进行罗氏沼虾中呋喃西林代谢物的残留检测时,为区分其究竟是内源性产生还是外源性有目的使用提供科学依据,为避免质量安全监管误判情形的发生提供理论参考,具有重要的现实意义。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

罗氏沼虾采自广东省养殖规模较大的罗氏沼虾养殖合作社,在合作社内挑选了不同区域的 6 家养殖场,每家养殖场抽取上市前商品规格的雌虾和雄虾各 3 kg,同时,采集池塘底泥、养殖水、饲料及混养的鲫鱼等样品。罗氏沼虾雌虾与雄虾的平均体重分别为(21.00±2.21) g 和(48.00±10.20) g,平均生物学体长分别为(9.93±0.31) cm 和(11.90±0.47) cm。

将采集的样品进行组织解剖,取肌肉、外壳(背壳和头胸壳)、肌肉表皮层、肝、复眼(眼球和眼柄)、生殖腺(精囊或卵巢)、鳃、肠和肢足(大小触角,大颚、第 1 小颚和第 2 小颚,第 1~3 颚足,第 1~3 步足,第 1~2 腹足及尾扇等,即除背壳和头胸壳外的所有外部肢足)等组织样品。将肌肉等样品制成肉糜,外壳和肢足部分(湿样)均制成小颗粒,肌肉表皮层是指肌肉与外壳接触部分剔除肌肉后的纤维薄膜,饲料为某虾用配合饲料和某南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)配合饲料 2 种,为合作社养殖罗氏沼虾用饲料。所有制备好的样品-20℃保存,备用。

1.2 化学品与试剂

甲醇、乙腈和乙酸乙酯均为色谱纯(Sigma, 美国);色谱纯 2-硝基苯甲醛、甲酸和氨水(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);色谱纯乙酸铵、二甲基亚砷和氢氧化钠(上海麦克林生化科技有限公司);分析纯磷酸氢二钾(国药集团化学试剂有限公司);37%发烟盐酸(Merck, 德国);60 mg/3 mL HLB 固相萃取柱(Waters, 美国);0.22 μm 有机相滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。

呋喃西林标准品(纯度为 99.0%)和 SEM 标准品(纯度为 99.85%) (Dr. Ehrenstorfer, 德国);SEM 内标物标准品(纯度为 99.8%) (Sigma, 美国)。水为超纯水。

1.3 仪器设备

液相色谱为 Waters ACQUITY UPLC I-Class, 配有样品管理器、二元溶剂泵和柱温箱。质谱为 Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪, 配电泳喷雾(ESI)离子源, 使用仪器提供的 MassLynx 4.1 软件对数据进行处理;高效液相色谱 HPLC, Waters 2695 配 2998PDA 检测器;Anke DL-600B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);ZHWY-200D 型多轨道恒温振荡器(上海智城分析仪器公司);MS3 basic 型旋涡振荡器(IKA, 德国);DTA-3 型超声清洗仪(广州凯江仪器有限公司);N-EVAP12 氮吹仪(Organomation 公司, 美国);JJ300 型电子天平(常熟双杰测试仪器厂);XS204 型万分之一电子天平(Mettler, 瑞士);FW100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.4 检测方法

罗氏沼虾和鲫鱼等生物样品的前处理参考农业部 783 号公告-1-2006, 并进行了优化, 具体如下: 将 HCl 的体积由 5 mL 增加至 10 mL, 浓度由 0.2 mol/L 提高至 0.5 mol/L。经乙酸乙酯萃取的样品, 于 40℃ 下氮气吹干, 残渣用 2 mL 10% 甲醇溶液复溶, 再经 5 mL 正己烷脱脂后过柱。先将 HLB 小柱用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化, 然后, 将复溶液以 1 mL/min 速率上样, 弃流出液, 3 mL 40% 甲醇溶液淋洗后, 挤干小柱, 再用 3 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 40℃ 下氮气吹至近干, 用初始比例的流动相定容至 1 mL, 过 0.22 μm 有机相滤膜, 待测。仪器检测方法参考实验室之前建立的方法(赵东豪等, 2016)。

池塘底泥和养殖水体中呋喃西林及 SEM 的检测, 分别参考王强等(2016)和索纹纹等(2013)的方法; 饲料中呋喃西林及 SEM 的检测, 参考农业部 1486 号公告-8-2010 及 Islam 等(2014)的方法。

2 结果与分析

2.1 酸解条件的优化

前处理过程参考农业部 783 号公告-1-2006, 该标准主要针对的是水产品可食性部分中硝基呋喃类代谢物残留测定。2 g 样品采用 5 mL 0.2 mol/L HCl 水解, 目的在于破坏代谢物与蛋白质的结合, 便于其以游离态与 2-硝基苯甲醛衍生化。但由于该研究中涉及外壳/肢足等, 其骨质结构中含有的 CaCO_3 会与 HCl 发生反应, 导致体系中 HCl 浓度下降, pH 升高, 会影响衍生化反应的效果, 导致回收率降低(于慧娟等, 2012)。为提高酸解效率, 方便后续的样品处理, 该研究将 HCl 溶液的体积由 5 mL 增至 10 mL。同时, 采集外骨骼和经呋喃西林药浴后的罗氏沼虾肌肉, 对比 10 mL 不同浓度的 HCl 溶液对两类样品的水解效果, 测得的 SEM 含量见图 1。当 HCl 溶液的浓度高于 0.5 mol/L 时, 肌肉和外骨骼样品中 SEM 含量均不再明显提高, 故所有测定 SEM 含量的样品, 均用 10 mL 0.5 mol/L HCl 溶液水解。

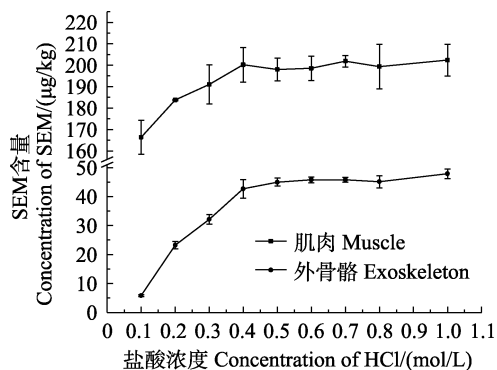


图 1 外骨骼和肌肉经不同浓度 HCl 溶液水解后测得的 SEM 含量(n=5)

Fig.1 SEM concentrations in exoskeleton and muscle after acid hydrolysis with different concentrations of HCl (n=5)

2.2 固相萃取条件的优化

该研究涉及的样品种类比较多, 为减少不同种类生物样品基质对 SEM 含量测定的影响, 所有样品经酸解、衍生化、提取和浓缩后, 再用 HLB 小柱净化处理。配制不同比例的甲醇-水溶液进行梯度洗脱实验, 以获得最佳的净化效果。结果显示, 3 mL 40% 甲醇溶液复溶的样品上柱后, 当 3 mL 淋洗液中甲醇的比例为 40% 以下时, SEM 不会随柱漏穿; 当甲醇的比例增加至 50% 时, 回收的淋洗液中即可检测到少量目标物。为尽可能多地洗去杂质, 且不损失目标物,

确定淋洗液为 3 mL 40% 甲醇溶液。从图 2 可以看出, 将 SEM 从 HLB 小柱上完全洗脱需要 3 mL 甲醇, 故确定其为固相萃取时的洗脱液。优化后的方法适合罗氏沼虾、鲫鱼等多种组织样品中 SEM 衍生物的萃取。

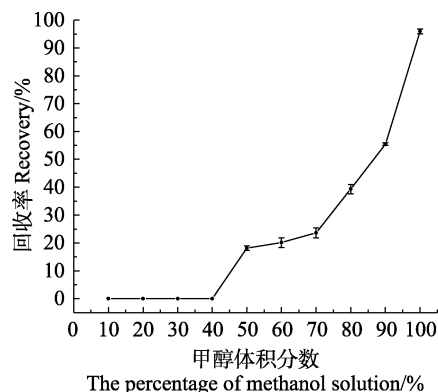


图 2 SEM 在 60 mg/3 mL 的 HLB 小柱上的洗脱曲线(n=5)
Fig.2 Elution curve of SEM performed on HLB cartridge (60 mg/3 mL) (n=5)

2.3 方法质量控制

该研究需要检测的样品除了罗氏沼虾的不同组织外, 还包括底泥、养殖水、饲料及混养的鲫鱼等, 不同样品采用不同的检测方法。为便于比较, 在表 1 中列出不同检测方法检测过程中的质量控制结果, 包括线性范围、加标回收率和相对标准偏差(RSD), 并分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)计算各方法的检出限和定量限。从表 1 可以看出, 使用的检测方法均能满足质量控制的要求, 加标回收率在 70%~120% 范围内, RSD<15%, 可以用于多种样品的检测。

2.4 罗氏沼虾样品检测结果

罗氏沼虾所有组织样品均检出不同含量的 SEM (图 3), 不同组织中 SEM 含量从高到低为复眼>外壳>肢足>肠>鳃>肌肉表皮层>肝>生殖腺>肌肉。不同组织样品 SEM 的平均含量为 $(12.90 \pm 2.47) \mu\text{g}/\text{kg}$, 其中, 复眼中 SEM 含量最高, 达到 $(33.29 \pm 3.06) \mu\text{g}/\text{kg}$; 其次是外壳的 $(29.00 \pm 5.67) \mu\text{g}/\text{kg}$ 和肢足的 $(28.10 \pm 7.08) \mu\text{g}/\text{kg}$; 肌肉中 SEM 平均含量最低, 为 $(1.83 \pm 0.24) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。复眼中 SEM 含量是肌肉的 18.20 倍, 外壳和肢足则分别是肌肉的 15.85 倍和 15.35 倍。复眼、外壳和肢足都可以看成是罗氏沼虾的外骨骼部分(杜娟等, 2018; 王克行, 2002), 三者合计占罗氏沼虾 SEM 总含量的 77.9%。即使是 SEM 含量最低的肌肉样品, 也超过欧盟的限量要求 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 仅以 SEM 的检测结果判断罗氏沼虾使用了呋喃西林, 极易导致误判情形的发生。

表1 方法质量控制
Tab.1 Method quality control

样品 Sample	线性范围 Linear range /($\mu\text{g/L}$)	相关系数 Correlation coefficient (r)	回收率 Recovery /%	相对标准偏差 Relative standard deviation/%	检出限 Limit of detection /($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)	定量限 Limit of quantitation /($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)
生物样品 Biological sample	0.10~100	>0.999	82.4~107.0	0.678~8.670	0.25	0.50
底泥 Sediment	2~2.0 $\times 10^3$	>0.999	96.1~102.0	0.921~8.530	0.25	0.50
养殖水 Culture water	2~2.0 $\times 10^3$	>0.999	86.1~105.0	0.850~9.130	0.25	0.50
饲料 Feed	50~2.0 $\times 10^4$	>0.998	78.8~80.4	1.240~5.820	300.00	1.0 $\times 10^3$

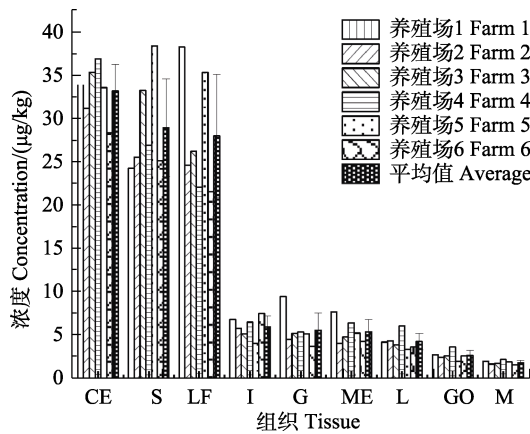


图3 罗氏沼虾成虾中不同组织的 SEM 含量
Fig.3 SEM concentrations in different tissues of adult *M. rosenbergii*

CE: 复眼; S: 外壳; LF: 肢足; I: 肠; G: 鳃;
ME: 肌肉表皮层; L: 肝; GO: 生殖腺; M: 肌肉
CE: Compound eyes; S: Shell; LF: Limbs and feet;
I: Intestine; G: Gills; ME: Muscle epidermis; L: Liver;
GO: Gonad; M: Muscle

由图3可见,外骨骼(复眼、外壳和肢足)中 SEM 含量最高,肌肉中含量最低,肌肉表皮层的含量高于肌肉,外骨骼是罗氏沼虾最易富集 SEM 的组织,而肌肉表皮层作为外骨骼和肌肉间的纤维膜,SEM 平均含量为(5.41 \pm 1.40) $\mu\text{g/kg}$,是肌肉中含量的 2.96 倍。当罗氏沼虾去壳后,部分表皮层(合成新的外骨骼)留在壳上,部分留在肉上,会导致虾肌肉表皮层和肌肉的自然 SEM 水平不同。在表皮层中发现的 SEM 浓度会比在肌肉中发现的浓度高出 3 倍以上(McCracken *et al.*, 2013)。因此,当开展罗氏沼虾中呋喃西林的残留检测时,制样过程中应小心分离肌肉表皮层,仅取肌肉部分。

2.5 罗氏沼虾中 SEM 的性别分析

雌虾和雄虾不同组织中的 SEM 含量见图 4。雌

虾的外骨骼、肠和鳃等组织中 SEM 含量明显高于雄虾,而雄虾肌肉表皮层、肝、生殖腺和肌肉中 SEM 含量则略高于雌虾。与其他组织相比,外骨骼中 SEM 的含量呈现出更明显的性别分化现象。精囊和卵巢中 SEM 含量分别为(2.77 \pm 0.72) $\mu\text{g/kg}$ 和(2.55 \pm 0.92) $\mu\text{g/kg}$ 。在所有样品中,发现 4 份受精卵样品(母虾抱籽),其 SEM 的平均含量为(1.17 \pm 0.06) $\mu\text{g/kg}$ 。van Poucke 等(2011)将罗氏沼虾从受精卵孵化,杜绝呋喃西林药源,用配方饲料将罗氏沼虾喂养至成虾,从外壳样品中测得 SEM 的含量为 25 $\mu\text{g/kg}$,同样证明 SEM 很可能在罗氏沼虾中天然存在。

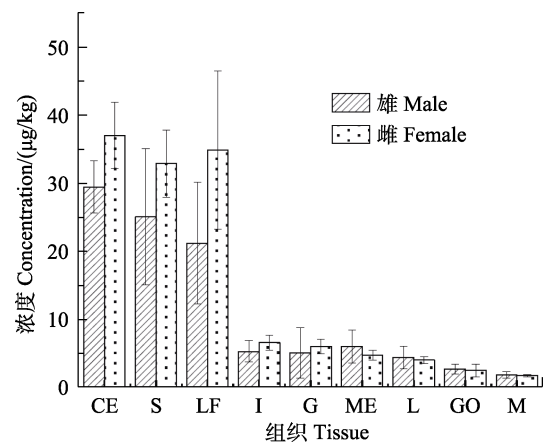


图4 雌、雄罗氏沼虾 SEM 含量对比
Fig.4 Comparison of SEM concentrations in female and male *M. rosenbergii*

2.6 环境及投入品样品的检测结果

底泥、养殖水等环境样品及喂养罗氏沼虾的饲料中均未检出呋喃西林,但从底泥中测得的 SEM 平均含量为(0.42 \pm 0.02) $\mu\text{g/kg}$ 。研究表明,虾养殖场或海域的沉积物和水样中残留有较高水平的 SEM (Islam *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2016)。事实上,SEM 来源广泛,首先,养殖水因限排政策一直

是循环利用的, 养殖水和底泥中 SEM 可来源于罗氏沼虾代谢或者死亡后分解所致; 其次, 养殖过程中使用投入品可能带入 SEM, 包括杀菌剂、水质改良剂和非吠喃西林药品等; 再次, 用作虾塘增肥原料的畜禽粪便可能有 SEM 残留(Islam *et al.*, 2014)。

值得注意的是, 鲫鱼作为混养水产品, 在鱼肉、肝和籽中均未检出 SEM。相关研究表明, 鱼、虾等使用吠喃西林后, 会快速代谢产生 SEM, 在 60~90 d 消除至检出限以下(李东利等, 2015; 刘书贵等, 2013; 刘永涛等, 2013; 赵东豪等, 2012)。SEM 在底泥中消除更加缓慢(索纹纹等, 2013), 当底泥中 SEM 稍高于检出限浓度时, 鱼不会对 SEM 明显富集。此外, 野生罗氏沼虾的肉中也能测出痕量的 SEM (Islam *et al.*, 2014), 说明罗氏沼虾很可能自然产生 SEM。

2.7 罗氏沼虾内源性 SEM 对吠喃西林残留检测的影响

罗氏沼虾体内可自然产生 SEM, 且其化学结构、理化性质等与使用吠喃西林代谢后产生的 SEM 完全相同。仅依靠化学手段, 目前, 还难以区分罗氏沼虾体内 SEM 的内源性与外源性。按现行的标准方法测定, 易造成未使用吠喃西林却被判定 SEM 不合格的情形。结合该研究的调查结果, 商品规格罗氏沼虾肌肉中内源性 SEM 的本底含量为(1.83±0.24) μg/kg, 可在进行吠喃西林的残留检测时, 考虑 SEM 的本底含量因素, 将判定限提高至 5.00 μg/kg, 以避免误判。但该研究涉及的样品数量和代表性均有限, 研究结果尚需更多的实验数据进行验证。

3 结论

该研究优化了农业部 783 号公告-1-2006 检测方法, 使之适合罗氏沼虾多种组织的 SEM 检测, 调查了未使用吠喃西林的罗氏沼虾不同组织中 SEM 的含量。所有样品均检出 SEM, 其中, 复眼中含量最高, 而肌肉中含量最低, 罗氏沼虾体内可自然产生 SEM。通过调查罗氏沼虾不同组织中 SEM 的本底含量, 研究其分布特征, 在进行吠喃西林的残留检测时, 考虑减去 SEM 的本底含量因素, 避免误判情形的发生。

参 考 文 献

CALLE M, ANKLAM E. Semicarbazide: Occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(4): 968–977

CHEN Z L. *Veterinary pharmacology* (2). Beijing: China Agriculture Press, 2002, 314 [陈杖榴. 兽医药理学(2). 北

京: 中国农业出版社, 2002, 314]

DU J, ZHANG J F, ZHENG Z F, *et al.* Changes in the ultrastructure of the carapace during the molt cycle of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 301–307 [杜娟, 张俊芳, 郑征帆, 等. 日本沼虾蜕皮过程中头胸甲外骨骼超微结构的改变. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 301–307]

DU N N, CHEN M M, SHENG L Q, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1327: 90–96

ISLAM M J, LISA A A, REZA A H M M, *et al.* Source identification and entry pathways of banned antibiotics nitrofurans and chloramphenicol in shrimp value chain of Bangladesh. *Eurasian Journal of Biosciences*, 2014(8): 71–83

KWON J K. Semicarbazide: Natural occurrence and uncertain evidence of its formation from food processing. *Food Control*, 2017, 72: 268–275

LI D L, LI J, CHANG Z Q, *et al.* The elimination rules of nitrofurazone metabolites and its effects on activities of metabolic enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 87–94 [李东利, 李健, 常志强, 等. 吠喃西林代谢产物在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 体内的消除规律及其对代谢酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 87–94]

LI J, LIU J, ZHANG H C, *et al.* Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 678(1): 1–6

LI Z H, LI Z M, XU D K. Simultaneous detection of four nitrofurans metabolites in honey by using a visualized microarray screen assay. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1813–1821

LIU S G, WU S H, ZHENG G M, *et al.* Studies on the residue and degradation rules of nitrofurazone metabolites in hybrid snakehead [*Channa maculate* (♀)×*Channa argus* (♂)]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34(2): 2481–253 [刘书贵, 吴仕辉, 郑光明, 等. 吠喃西林代谢物在杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)体内的残留消除规律研究. *华南农业大学学报*, 2013, 34(2): 248–253]

LIU Y T, AI X H, SUO W W, *et al.* Tissue distribution and elimination rules of the metabolite of nitrofurazone SEM residues in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) cultured in cage. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Sciences)*, 2013, 42(1): 72–76 [刘永涛, 艾晓辉, 索纹纹, 等. 网箱养殖条件下吠喃西林代谢物 SEM 在斑点叉尾鲷体内组织分布及消除规律研究. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2013, 42(1): 72–76]

MCCRACKEN R, HANNA B, ENNIS D, *et al.* The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi

- fresh-water shrimp. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1562–1567
- PARK M S, KIM K T, KANG J S. Development of an analytical method for detecting nitrofurans in bee pollen by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1046: 172–176
- SHENDY A H, AL-GHOBASHY M A, GAD ALLA S A, *et al.* Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, 2016, 190: 982–989
- SUO W W, LIU Y T, AI X H, *et al.* Elimination rules of the semicarbazide in environment and assessment of semicarbazide in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(4): 681–688 [索纹纹, 刘永涛, 艾晓辉, 等. 环境中氨基脒消解规律及对斑点叉尾鮰残留评估. *农业环境科学学报*, 2013, 32(4): 681–688]
- TANG T, WEI F D, WANG X, *et al.* Determination of semicarbazide in fish by molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1076: 8–14
- TIAN X H, XU Y J, SONG X K, *et al.* Temporal and spatial distribution of semicarbazide in western Laizhou Bay. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 112(1/2): 393–398
- VAN POUCKE C, DETAVERNIER C, WILLE M, *et al.* Investigation into the possible natural occurrence of semicarbazide in *Macrobrachium rosenbergii* prawns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(5): 2107–2112
- WANG D N, ZHOU F, LI S Y, *et al.* Background value survey and source analysis of semicarbazide in shellfish. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(6): 6–11 [王鼎南, 周凡, 李诗言, 等. 甲壳类水产品中呋喃西林代谢物氨基脒的本底调查及来源分析. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 6–11]
- WANG K X. Principle and technology of shrimp healthy culture. Beijing: Science Press, 2002, 447 [王克行. 虾类健康养殖原理与技术. 北京: 科学出版社, 2002, 447]
- WANG Q, WANG X F, JIANG Y Y, *et al.* Determination of 5-nitro-2-furaldehyde as marker residue for nitrofurazone treatment in farmed shrimps and with addressing the use of a novel internal standard. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 19243
- WANG Q, WANG X F, ZHAO D H, *et al.* Determination of four nitrofurans in water and sediment using ultra performance liquid chromatography. *Food Science*, 2016, 37(16): 249–253 [王强, 王旭峰, 赵东豪, 等. 超高效液相色谱法测定水体和沉积物中 4 种硝基呋喃类抗生素. *食品科学*, 2016, 37(16): 249–253]
- YU H J, LI B, CAI Y Q, *et al.* Determination of semicarbazide content in crustaceans by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(10): 1530–1535 [于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基脒的含量. *分析化学*, 2012, 40(10): 1530–1535]
- ZHANG Y B, QIAO H O, CHEN C, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2016, 192: 612–617
- ZHAO D H, LI Z G, LI L D, *et al.* Assessment of nitrofurazone and furazolidone residues in shrimp seedling. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(3): 54–58 [赵东豪, 黎智广, 李刘冬, 等. 虾苗使用呋喃西林和呋喃唑酮的残留评估. *南方水产科学*, 2012, 8(3): 54–58]
- ZHAO D H, WANG X F, WANG Q, *et al.* Influence of solvent on nitrofurans metabolites response by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(6): 108–114 [赵东豪, 王旭峰, 王强, 等. 液相色谱串联电喷雾质谱检测中溶剂对硝基呋喃类代谢物响应的影响. *南方水产科学*, 2016, 12(6): 108–114]

(编辑 冯小花)

Distribution Characteristics of Semicarbazone in Adult *Macrobrachium rosenbergii*

MO Mengsong^{1,2}, CAI Nan², LI Laihao^{2①}, WANG Xufeng², WANG Qiang²,
GUAN Wanqi², ZHAO Donghao^{2①}

(1. School of Food and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Aquatic Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou, Guangdong 510300, China)

Abstract As the most stable metabolite of nitrofurazone (NFZ), semicarbazide (SEM) can be determined after the administration of NFZ in aquatic animals within a few hours. Because of extensive tissue distribution and a long residual period, SEM is used as the exclusive marker for NFZ. However, SEM is naturally present in the shells of crustaceans, such as crayfish, shrimp, prawns, and soft-shell crabs. To avoid false-positive results induced by SEM alone and to precisely identify the illegal use of NFZ, further investigations on the distribution characteristics of SEM in crustaceans is essential. In the present study, samples of shell, muscle, muscle epidermis, internal organs, and compound eye were collected from *Macrobrachium rosenbergii* shrimp farms that were not exposed to nitrofurazone, and SEM was determined in order to investigate the background concentrations in different tissues of the commercial shrimp. Samples were evaluated in accordance with Announcement No.783-1-2006 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. As multiple tissue samples, including compound eye, outer shell, limbs, feet, intestine, gill, muscle epidermis, liver, gonad, and muscle were assessed, the method was suitable for monitoring the background concentration of SEM in different tissues of *M. rosenbergii*. The average concentration of SEM across all tissues was (12.90 ± 2.47) $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average concentrations of SEM in compound eyes, shells, and limbs were (33.29 ± 3.06) , (29.00 ± 5.67) , and (28.10 ± 7.08) $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The lowest concentration of SEM was found in muscle samples, with an average value of (1.83 ± 0.24) $\mu\text{g}/\text{kg}$. The concentration of SEM in commercial *M. rosenbergii* tissues could be ordered as compound eye > outer shell > limbs and feet > intestine > gill > muscle epidermis > liver > gonad > muscle. Considering that it was difficult to distinguish the source of SEM in *M. rosenbergii*, the background concentration of SEM should be deducted when determining NFZ residues in this species.

Key words *Macrobrachium rosenbergii*; Semicarbazide; Nitrofurazone; Distribution characteristics

① Corresponding author: LI Laihao, E-mail: laihao@163.com; ZHAO Donghao, E-mail: donghaozhao@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210420003

http://www.yykxjz.cn/

朱文君, 袁晟译, 李健, 常志强. 菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面反硝化和厌氧氨氧化反应速率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 110–117

ZHU W J, YUAN S Y, LI J, CHANG Z Q. Effects of *Ruditapes philippinarum* on denitrification and anaerobic ammonia oxidation rates of the sediment/water interface in seawater aquaculture pond. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 110–117

菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面反硝化和厌氧氨氧化反应速率的影响*

朱文君^{1,2} 袁晟译^{1,2} 李 健² 常志强^{2①}

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

摘要 养殖尾水氮含量过高等富营养化问题是影响当前我国池塘养殖产业健康可持续发展的重要因素,反硝化和厌氧氨氧化是自然水生态系统中重要的氮循环过程,是沉积物氮素营养迁出的主要途径,埋栖型贝类通过滤水和蠕动等生命活动不仅能净化水质,还可以使沉积物颗粒混合并改变沉积物/水界面的物质交换。本研究于 2020 年 9、10、11、12 月采集菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)养殖池塘贝类区域(有贝区)和对照区域(无贝区)的沉积物表层样品,进行泥浆培养实验,利用氮稳定同位素示踪技术检测其反硝化和厌氧氨氧化反应速率,并分析了其与间隙水理化参数的相关性。结果显示,菲律宾蛤仔养殖池塘有贝区 10 月和 11 月样品检测到厌氧氨氧化反应,并有反硝化—厌氧氨氧化耦合反应;有贝区 9—12 月沉积物反硝化反应速率均高于无贝区,有贝区 9 月的反硝化反应速率最高(0.005 8 $\mu\text{mol}/\text{kg}\cdot\text{h}$);水体温度与沉积物反硝化反应速率呈极显著正相关($P<0.01$),氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)浓度与厌氧氨氧化反应速率呈极显著正相关($P<0.01$)。研究表明,海水池塘养殖生态系统中也存在厌氧氨氧化过程,养殖菲律宾蛤仔等埋栖型贝类有利于池塘沉积物/水界面的反硝化和厌氧氨氧化反应,有效地促进池塘沉积物脱氮过程,研究结果不仅丰富了海水养殖生态系统氮循环理论,也为开展尾水生物净化工作提供了新思路。

关键词 菲律宾蛤仔;反硝化;厌氧氨氧化;沉积物

中图分类号 S967.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0110-08

近年来,我国海水池塘养殖产业发展迅速,养殖规模逐渐扩大,产量日益增长(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020),同时,近岸海水富营养化问题也引起人们普遍关注(陆尚明等, 2020),陆源 N、P

过量排放被认为是造成海水富营养化的主要原因(施沁璇等, 2021)。虾、蟹养殖池塘中放养菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)等埋栖型滩涂贝类的多营养层次综合养

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项课题(2019YFD0900403)、国家自然科学基金面上项目(31873039)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-48)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900403), the National Natural Science Foundation of China (31873039), and China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48)]. 朱文君, E-mail: zhuwj53123@163.com

① 通讯作者:常志强,研究员, E-mail: changzq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-20, 收修改稿日期: 2021-06-07

殖(IMTA)可获得较好的经济和生态效益(Chang *et al.*, 2020)。其中, 贝类不仅能通过自身滤水作用净化水质(董世鹏等, 2020), 其扰动作用还可以使沉积物颗粒混合, 改变沉积物/水界面物质交换(杜永芬等, 2004), 改善沉积物微生物群落结构(Lukwambe *et al.*, 2018)。

本研究以人工构建的菲律宾蛤仔养殖池塘为研究对象, 采用稳定同位素示踪方法, 通过沉积物泥浆培养实验和氮稳定同位素检测, 以期深入揭示菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面发生的反硝化(Denitrification)和厌氧氨氧化作用(Anaerobic ammonia oxidation)的影响。研究结果将有助于全面了解海水池塘 IMTA 系统氮素营养的迁移转化过程, 并为海水养殖尾水的生物净化处理技术研发提供参考数据。

1 材料与方 法

1.1 实验地点

本研究在山东省日照市东港区涛雒镇的日照开航水产有限公司(35°19'18"N; 119°24'40"E)进行。实验池塘总面积约 0.4 hm², 池塘内修建长为 60 m、顶宽为 1.5 m、水深为 0.5 m 的贝台 10 个, 贝台之间由深沟相隔, 沟底水深为 1.0~1.2 m。2020 年 4 月初, 实验池塘中的 9 个贝台放养规格为 4000~6000 粒/kg 的菲律宾蛤仔, 设有贝区, 另一个贝台不放养任何贝类, 作为对照区域(无贝区)。

1.2 实验方法

分别于 9、10、11、12 月选择有贝区的 6 个贝台, 于各贝台中心点处采用玻璃采泥器采集沉积物表层(10 cm)样品, 分别编号为 B1、B2、B3、B4、B5、B6。现场将样品 B1 与 B2、B3 与 B4、B5 与 B6 进行两两混合, 得到 3 份有贝区样品, 另外, 选择无贝区中心点和两端点处采集无贝区样品共 3 份, 分别编号 C1、C2 和 C3。沉积物样品收集间隙水后, 现场进行泥浆培养实验。

1.3 间隙水水质检测

温度采用 YSI 多参数便携式水质检测仪进行检测, 亚硝酸盐(NO₂⁻)、硅酸盐(SiO₄²⁻-Si)、氨氮(NH₄⁺-N)、硝酸盐(NO₃⁻)和总磷(TP)等理化参数指标采用营养盐自动分析仪(Skalar SAN^{plus} Analyzer, 荷兰)

检测, 叶绿素 *a* 浓度的测量参照《叶绿素的测定(分光光度法) SL88-1994》的方法。

1.4 泥浆培养实验

每个月有贝区和无贝区沉积物样品均分别取 60 g 置于 250 mL 烧杯里, 加 100 mL 池塘沉积物上覆水, 采用无菌玻璃棒搅拌使其形成匀浆形式, 后在厌氧条件下, 使用 He 吹 30 min。取 36 个 12 mL 顶空进样瓶(Labco Exetainer, Lampeter, 英国), 分为 E_ctrl、E_amox 和 E_denit 3 个实验组, 每组 24 个。其中, E_ctrl 为控制组, 添加 ¹⁵NH₄⁺ (99%¹⁵N), 用于判断体系中是否达到厌氧状态, 以及本底的 ¹⁴NO₃⁻ 是否已经消耗完。E_amox 为验证组, 添加 ¹⁵NH₄⁺ (99%¹⁵N)+¹⁴NO₃⁻, 用于确定厌氧氨氧化的存在。E_denit 为计算组, 添加 ¹⁵NO₃⁻ (99.19%¹⁵N), 用于计算反硝化反应速率及厌氧氨氧化反应速率(表 1)。分别取 4 mL 泥浆样品加入顶空进样瓶, 采用 He 吹 30 min, 以便排尽瓶中空气。所有顶空进样瓶先在避光条件下旋转培养 5 d(180 r/min), 使其充分达到厌氧状态, 并消耗尽沉积物本底中的 ¹⁴NO₃⁻。各实验组分别加入 ¹⁵NO₃⁻、¹⁵NH₄⁺、¹⁵NH₄⁺、¹⁴NO₃⁻ 标准溶液并使最终浓度达到 100 μmol/L, 在添加 ¹⁵N 标记物后的第 0、3、6、9 小时, 每个实验组分别取 3 个平行样品, 加入 200 μL 的 ZnCl₂ 溶液(7 mol/L) 终止反应, 共取得 36 个样品, 样品均于 4℃ 低温保存以测定 ²⁹N₂、³⁰N₂ 含量(张满平, 2017)。根据公式(1)和公式(2)分别计算厌氧氨氧化和反硝化速率(Thamdrup *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2002)。

$$A_{\text{total}} = \frac{P_{29} + 2 \times (1 - F_N^{-1}) \times P_{30}}{F_N} \quad (1)$$

$$D_{\text{total}} = P_{30} \times F_N^{-2} \quad (2)$$

式中, A_{total} 为厌氧氨氧化速率[μmol/(kg·h)]; D_{total} 为反硝化速率[μmol/(kg·h)]; F_N 为实验组 E_denit 中 ¹⁵NO₃⁻ 占总 NO₃⁻ 的百分比; P_{29} 和 P_{30} 分别是实验组 E_denit 中 ²⁹N₂ 和 ³⁰N₂ 的生成速率[μmol/(kg·h)]。

1.5 ¹⁵N 同位素测定

泥浆培养终止后, 离心进样瓶, 取 1 mL 顶空气体至 He (99.999%)吹扫后的 Labco 真空采样瓶中, 置于 GasBench II 样品盘中, 使用稳定同位素质谱仪(GasBench II - 253plus, 美国)测定 ²⁹N₂、³⁰N₂ 的生成量。

表 1 ^{15}N 泥浆培养试验分组
Tab.1 ^{15}N slurry incubation experiment groups

实验组 Groups	同位素药品 Isotope medicine	添加同位素 Tracer added	最终浓度 Final concentration/($\mu\text{mol/L}$)	测定相 Isotopes measured
E_ctrl	$^{15}\text{N NH}_4\text{Cl}$	$^{15}\text{NH}_4^+$	100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$
E_amox	$^{15}\text{N NH}_4\text{Cl}+^{14}\text{N NO}_3^-$	$^{15}\text{NH}_4^++^{14}\text{NO}_3^-$	100+100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$
E_denit	$^{15}\text{N NO}_3^-$	$^{15}\text{NO}_3^-$	100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$

1.6 数据统计与处理

采用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据整理和计算, 采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

2 结果

2.1 沉积物间隙水理化指标

沉积物间隙水理化指标分析结果见表 2。从表 2 可以看出, 整个养殖期间, 有贝区和无贝区间隙水

理化指标存在明显差异。其中, 有贝区叶绿素 a 、 NO_2^- 、 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$ 和 NO_3^- 含量在各月均低于无贝区。有贝区的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 和 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$ 含量在养殖期间总体呈逐渐下降的趋势。有贝区 TP 含量在 10 月有所下降, 11 月最高, 12 月又降至最低水平, 而无贝区 TP 含量在养殖过程中趋于稳定。

2.2 反硝化与厌氧氨氧化反应速率

2.2.1 有贝区 有贝区 $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ 生成量见图 1。从图 1 可以看出, E_ctrl 实验组 4 个月中 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 均未累积, 表明达到厌氧条件且没有发生硝化、反硝化的耦合反应, 沉积物本底中的 $^{14}\text{NO}_3^-$ 完全消耗完。

表 2 沉积物间隙水理化指标
Tab.2 Physicochemical parameters of porewater at sampling sites

月 Month	样品 Samples	温度 Temperature / $^{\circ}\text{C}$	叶绿素 a Chl- a /(mg/L)	亚硝酸盐 NO_2^- /($\mu\text{g/L}$)	硅酸盐 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$ /($\mu\text{g/L}$)	氨氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ /(mg/L)	硝酸盐 NO_3^- /($\mu\text{g/L}$)	总磷 TP /($\mu\text{g/L}$)
9 月 Sep.	YB	23.9	1.6	49.7	2 134.6	3.2	455.8	8.8
	WB	24.1	1.9	60.2	3 203.1	2.6	600.5	10.1
10 月 Oct.	YB	16.8	1.5	17.0	1 965.0	3.0	173.4	5.4
	WB	16.9	2.4	79.3	3 005.4	3.1	197.7	10.3
11 月 Nov.	YB	8.8	0.3	15.0	784.5	2.9	127.3	13.1
	WB	8.7	0.6	24.9	2 071.9	3.6	315.6	11.0
12 月 Dec.	YB	8.1	0.2	12.3	366.7	1.9	32.3	1.3
	WB	7.9	0.3	28.3	1 772.4	2.3	314.0	10.3

注: YB 为有贝区, WB 为无贝区

Note: YB represents area with clams, and WB represents area without clams

E_amox 处理组中, 9 月, $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ 均未累积, 表明达到厌氧条件且不存在厌氧氨氧化反应; 10 月, $^{30}\text{N}_2$ 有所累积, 表明达到所需厌氧条件, $^{29}\text{N}_2$ 有所累积, 表明存在厌氧氨氧化反应; 11 月, $^{29}\text{N}_2$ 检测到累积, 表明存在厌氧氨氧化反应; 12 月, $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ 均未累积, 表明达到厌氧条件且不存在厌氧氨氧化反应。

E_denit 处理组中, 9 月, $^{29}\text{N}_2$ 未累积, 而 $^{30}\text{N}_2$ 生成速率逐渐上升, 表明不存在厌氧氨氧化反应但

存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化速率为 $0.0058 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$; 10 月, $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 均有累积且 $^{30}\text{N}_2$ 生成速率大于 $^{29}\text{N}_2$, 表明存在厌氧氨氧化和反硝化反应, 且反硝化速率大于厌氧氨氧化速率, 经计算可知, 反硝化速率为 $0.0039 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 厌氧氨氧化反应为 $0.00092 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$; 11 月, $^{29}\text{N}_2$ 有所累积, 表明存在厌氧氨氧化反应, 经计算可知, 厌氧氨氧化反应速率为 $0.00093 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 而 $^{30}\text{N}_2$ 有所累积, 表明存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化

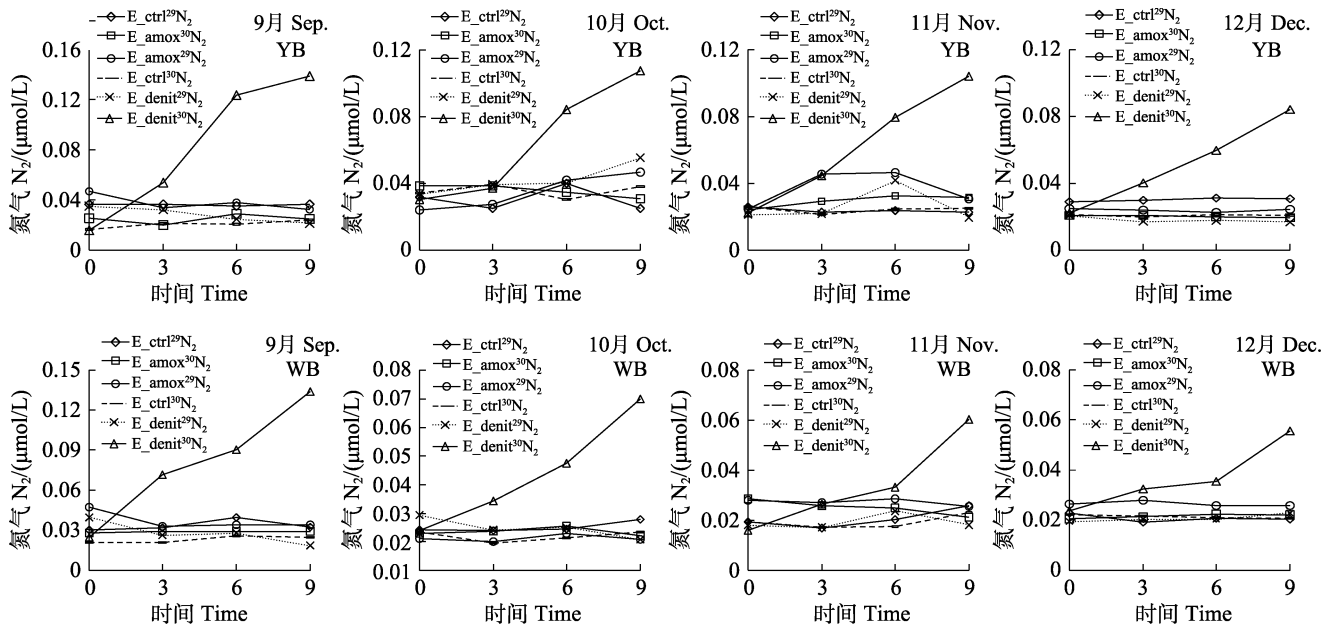


图 1 有贝区(YB)与无贝区(WB)样品的 ²⁹N₂、³⁰N₂ 生成量
Fig.1 The amount of ²⁹N₂ and ³⁰N₂ in samples obtained in the area with (YB) or without (WB) clams

反应速率为 0.003 9 μmol/(kg·h); 12 月, ²⁹N₂ 未累积而 ³⁰N₂ 逐渐累积, 表明仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.002 8 μmol/(kg·h)。

2.2.2 无贝区 无贝区 ²⁹N₂、³⁰N₂ 生成量见图 1。从图 1 可以看出, E_ctrl 处理组中, 4 个月样品的 ²⁹N₂ 和 ³⁰N₂ 均未累积, 表明达到厌氧条件且样品本底中的 ¹⁴NO₃ 完全消耗完, 无贝区没有发生硝化、反硝化的耦合反应。E_amox 处理组中, 9—12 月样品的 ²⁹N₂ 和 ³⁰N₂ 均未累积, 表明达到厌氧条件, 但不存在厌氧氨氧化反应; E_denit 处理组中, 9 月, ²⁹N₂ 未累积而 ³⁰N₂ 逐渐累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应, 但存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.004 8 μmol/(kg·h); 10 月, ³⁰N₂

逐渐累积而 ²⁹N₂ 未累积, 表明存在反硝化反应但没有厌氧氨氧化反应, 经计算可知, 反硝化速率为 0.002 1 μmol/(kg·h); 11 月, ²⁹N₂ 未检测到累积, ³⁰N₂ 有所累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应, 仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.001 9 μmol/(kg·h); 12 月, ²⁹N₂ 未累积而 ³⁰N₂ 有所累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应而仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.001 4 μmol/(kg·h)。

2.3 反硝化和厌氧氨氧化反应速率影响因素

有贝区沉积物厌氧氨氧化反应速率、反硝化反应速率与间隙水理化参数相关性分析结果见表 3。从表 3 可以看出, 整个养殖过程中, 池塘沉积物/

表 3 沉积物的氮循环反应速率与环境因子相关性分析
Tab.3 Correlation analysis between nitrogen cycling reaction rates of sediment and environmental factors

项目 Items	温度 Temperature/°C		叶绿素 a Chl-a /(mg/L)		亚硝酸盐 NO ₂ ⁻ /(μg/L)		氨氮 NH ₄ ⁺ -N /(mg/L)		硝酸盐 NO ₃ ⁻ /(μg/L)		总磷 TP/(μg/L)	
	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
	有贝区 Area with clams	0.9**	-0.3	0.6*	0.1	0.9**	-0.5*	0.8**	0.9**	0.9**	-0.3	0.5*
无贝区 Area without clams	0.9**	—	0.5*	—	0.4	—	-0.2	—	0.9**	—	-0.5*	—

注: D: 反硝化反应速率; A: 厌氧氨氧化反应速率; *表示显著差异(P<0.05); **表示极显著差异(P<0.01)

Note: D: Denitrification rates; A: Anammox rates; * indicates a significant correlation at the P<0.05 level; ** indicates a significant correlation at the P<0.01 level

水界面的反硝化反应速率与间隙水温度、 NO_2^- 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NO_3^- 含量相比具有极显著差异($P<0.01$),与叶绿素 a 浓度、TP 含量相比呈显著相关($P<0.05$)。厌氧氨氧化反应速率与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量相比具有极显著差异($P<0.01$),与 TP、 NO_2^- 含量相比存在显著差异($P<0.05$),与温度、叶绿素 a 浓度、 NO_3^- 含量相比无显著差异($P>0.05$)。

无贝区沉积物反硝化反应速率与间隙水理化参数相关性分析结果见表 3。从表 3 可以看出,无贝区沉积物/水界面的反硝化反应速率与间隙水温度、 NO_3^- 含量相比具有极显著差异($P<0.01$),与叶绿素 a 、TP 含量相比显著差异($P<0.05$),与 NO_2^- 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量相比差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

水生态系统的沉积物/水界面氮循环过程主要包括硝化(Nitrification)、反硝化、厌氧氨氧化等。硝化是硝化细菌在有氧条件下将铵盐(NH_4^+)转化为 NO_2^- 和 NO_3^- 的过程,能有效去除有机物(程海华等,2016)。反硝化作用是反硝化细菌在厌氧条件下,将 NO_3^- 还原生成 N_2O 和 N_2 的过程,而厌氧氨氧化则是厌氧氨氧化细菌在厌氧条件下,将 NO_2^- 和 NH_4^+ 转化为 N_2 的过程。目前,关于水生态系统氮循环过程的研究主要以硝化和反硝化反应为主,涉及海洋(张日钊等,2020)、陆地河流(叶萌,2017)、湖泊(江海洋,2017)、水库(黄亚琦,2020)、稻田(Dien *et al.*, 2019)等生态系统,长期以来,反硝化过程一直被认为是水生态系统氮迁出的唯一途径。据 Tanaka 等(2004)和 Middleburg 等(1996)对海洋沉积物氮迁出的研究结果显示,反硝化可去除海洋中 67%~80%的含氮化合物,而其他一些关于河口海湾区氮迁出的研究表明,反硝化可清除 20%~60%的陆源氮负荷(Barnes *et al.*, 1999)。自 Mulder 等(1995)首次在生物脱氮流化床反应器中发现,厌氧氨氧化反应以来,它作为氮迁出的全新途径颠覆了人们对氮循环的传统认识,成为环境科学等领域的研究热点。

Thamdrup 等(2002)最早报道了自然生态系统中的厌氧氨氧化反应,并认为波罗的海—北海过渡带沉积物氮迁出中高达 67%是由厌氧氨氧化反应完成的。此后,在其他大陆边缘的海底沉积物(Fernandes *et al.*, 2016)、河口区域沉积物(Meyer

et al.,2005)以及缺氧海水区域(Kuypers *et al.*, 2003)等海洋生态系统中发现厌氧氨氧化反应的报道大量增多,海洋生态系统沉积物依靠厌氧氨氧化菌驱动氮迁出的途径也很快被人们接受(Fernandes *et al.*, 2016)。近年来,我国科学家在湿地生态系统水陆交错带(Zhu *et al.*, 2013)、水稻田土壤(Zhu *et al.*, 2011)和淡水鱼养殖池塘(Shen *et al.*, 2016)等陆地水生生态系统中也陆续发现了厌氧氨氧化反应参与沉积物氮迁出的过程,但有关海水养殖池塘系统中是否存在厌氧氨氧化反应尚未见报道。本研究发现,菲律宾蛤仔养殖池塘有贝区沉积物/水界面存在厌氧氨氧化反应,进一步丰富了人们对水生态系统氮循环的认识,这可能是由于放养菲律宾蛤仔导致其周边间隙水含氧量下降,同时,菲律宾蛤仔能直接排泄 NH_4^+ (邓可,2011),为厌氧氨氧化反应提供了反应底物。厌氧氨氧化反应不稳定,受环境因素影响较多(王刚,2017)。本研究中,有贝区也仅在 10 月和 11 月这一贝类生长较快的时期出现厌氧氨氧化反应,而且反应速率明显低于反硝化反应。

稻虾综合养殖池塘相关研究发现,由于进水口的富营养化,使稻虾净水机制中养分含量高,导致反硝化反应速率增加(Dien *et al.*, 2019)。本研究中,有贝区样品的反硝化速率高于无贝区,可能由于贝类的代谢导致贝类沉积物中有机质含量增高,同时,贝类的代谢活动导致有机质的增加,沉积物中微生物的代谢导致溶解氧(DO)含量的下降,为反硝化反应提供更多有利环境。在有贝区与无贝区反硝化速率的检测中发现,9 月反硝化反应速率达到最大值,可能是因为 9 月菲律宾蛤仔养殖池塘中温度较其他采样时间温度高。李瑶(2017)研究表明,温度越高反硝化反应速率越大,温度的增加可促进反硝化反应活动,另外,本研究发现,9 月 NO_3^- 浓度最高,大量的 NO_3^- 含量可为反硝化反应提供反应底物,促进反硝化反应的发生。

此外,由于菲律宾蛤仔在沉积物中扰动的灌溉作用,使含氧的上覆水进入沉积物中,促使沉积物中间隙水的 O_2 含量增加,促进硝化反应,为反硝化反应提供更多反应底物(NO_2^- 、 NO_3^-)。同时, O_2 含量的增加会抑制反硝化反应,而这又与沉积物中含氮有机物的含量有关,含量较高时,有机质的氧分解会迅速耗尽沉积物中间隙水的 DO,形成厌氧环境,虽然,有利于反硝化反应的发生,但也可能因为硝

化反应的终止而失去反应底物。另外,反硝化反应和厌氧氨氧化反应在进行时会共同利用亚硝氮(朱泽沅等,2016),因此,在反应过程中也存在耦合现象。

本研究发现,有贝区、无贝区沉积物反硝化反应速率与温度具有极显著性相关($P < 0.01$),温度高则反硝化反应速率大,这与李瑶(2017)研究结果相一致。有贝区厌氧氨氧化反应速率与 NH_4^+ 呈现出极显著性相关($P < 0.01$),这可能是由于 NH_4^+ -N作为厌氧氨氧化反应发生的底物, NH_4^+ -N浓度的增加可促使厌氧氨氧化反应的进行。有贝区与无贝区反硝化反应速率与叶绿素 a 浓度均表现出显著性相关($P < 0.05$),叶绿素 a 浓度高则表示水体中存在大量藻类,藻类可为反硝化菌提供底物(赵峰等,2021),促进反硝化细菌的增加,因此,可能会导致池塘沉积物反硝化速率有所增加。 P 是水体中初级生产力因子,在沉积物中会与 Fe^{3+} 结合形成 Fe 结合 P ,菲律宾蛤仔的生物扰动可能会促进上覆水中的 DO 进入沉积物,把更多的 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 而结合固定更多的 P ;厌氧环境则有利于 P 的析出,因为在缺少其他氧化还原物质时, Fe^{3+} 会被用于氧化有机质的电子受体,从而解脱结合的 P 。在菲律宾蛤仔养殖池塘中, TP 浓度是厌氧氨氧化反应以及反硝化反应的影响因素之一。此外,本研究中,有贝区反硝化反应对 NH_4^+ -N、 NO_3^- 、 NO_2^- 浓度以及无贝区与 NO_3^- 浓度均表现出相关性。虽然 NH_4^+ -N与反硝化反应存在正相关看似不合理,这可能由于硝化反应的发生为反硝化反应提供了 NO_3^- 和 NO_2^- 底物,使这一现象存在。厌氧氨氧化反应和 NO_2^- 和 NH_4^+ -N浓度具有相关性,符合厌氧氨氧化反应的反应过程。

综上所述,海水池塘中养殖菲律宾蛤仔对于沉积物/水界面的氮循环过程产生了明显影响,本研究结果不仅丰富了水生态系统氮循环理论,也为开展海水养殖尾水生物净化工作提供了新思路。

参 考 文 献

- BARNES J, OWENS N J P. Denitrification and Nitrous Oxide Concentrations in the Humber Estuary, UK, and Adjacent Coastal Zones. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 37(3/4/5/6/7): 247–260
- 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 [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]
- 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. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2544–2558
- CHENG H H, ZHU J X, QU K M, *et al.* Effect of different organic carbon sources and C/N on the bio-filter purification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 127–134 [程海华, 朱建新, 曲克明, 等. 不同有机碳源及C/N对生物滤池净化效果的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 127–134]
- DALSGAARD T, THAMDRUP B. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3802–3808
- DENG K. Nutrient exchange fluxes and biological disturbances at sediment-water interface in typical coastal areas of my country. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [邓可. 我国典型近岸海域沉积物—水界面营养盐交换通量及生物扰动的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- DIEN L D, SANG N V, Faggotter, S J, *et al.* Seasonal nutrient cycling in integrated rice-shrimp ponds. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 149: 110647
- DONG S P, LIN F, JIANG W W, *et al.* Estimation of carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay based on spatial and temporal distribution of chlorophyll a . *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 100–107 [董世鹏, 蔺凡, 姜妮妮, 等. 基于叶绿素 a 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 100–107]
- DU Y F, ZHANG Z N. The effect of bioturbation of Philippine clams on the vertical distribution of sediment particle. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2004, 34(6): 988–992 [杜永芬, 张志南. 菲律宾蛤仔的生物扰动对沉积物颗粒垂直分布的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(6): 988–992]
- FERNANDES S O, JAVANAUD C, MICHOTÉY V D, *et al.* Coupling of bacterial nitrification with denitrification and anammox supports N removal in intertidal sediments (Arcachon Bay, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2016, 179: 39–50
- JIANG H Y. Study on nitrogen and carbon cycles in lakes in the middle and late period of algal bloom outbreak. Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2017 [江海洋. 藻华暴发中后期湖泊氮素、碳素循环研究. 扬州大学博士研究生学位论文, 2017]
- HUANG Y Q. Study on vertical distribution characteristics and flux of N_2O dissolved concentrations in the large and large reservoirs of Lancang River. Master's Thesis of Xi'an University of Technology, 2020 [黄亚琦. 澜沧江深大水

- 氧化亚氮溶存浓度的垂向分布特征及通量研究. 西安理工大学硕士研究生学位论文, 2020]
- KUYPERS M M M, SLIEKERS A O, LAVIK G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, 422: 608–611
- LI Y. Study on the effects of temperature on denitrification and carbon releasing in constructed wetland filled with Bark. Doctoral Dissertation of Wuhan University of Technology. 2017 [李瑶. 温度对树皮填料人工湿地反硝化和释碳的影响研究. 武汉理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- LUKWAMBE B, YANG W, ZHENG Y, *et al.* Bioturbation by the razor clam (*Sinonovacula constricta*) on the microbial community and enzymatic activities in the sediment of an ecological aquaculture wastewater treatment system. *The Science of the total environment*, 2018, 643: 1098–1107
- LU S M, LU G Y, ZHANG L, *et al.* Comparison and analysis of water quality between industrialized ecological pond farming and traditional pond farming. *Journal of Aquaculture*. 2020, 41(8): 7–12, 25 [陆尚明, 芦光宇, 张莉, 等. 池塘工业化生态养殖与传统池塘养殖水质比较分析. *水产养殖*, 2020, 41(8): 7–12, 25]
- MEYER R L, RISGAARD-PETERSEN N, ALLEN D E. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6142–6149
- MIDDELBURG J J, SOETAERT K, HERMAN P M J, *et al.* Denitrification in marine sediments: A model study. *Global Biogeochemical Cycles*, 1996, 10(4): 661–673.
- MULDER A, VANDEGRAAF A A, ROBERTSON L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16: 177–183
- SHEN L, WU H, GAO Z, *et al.* Evidence for anaerobic ammonium oxidation process in fresh water sediments of aquaculture ponds. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23: 1344–1352
- SHI Q X, HAO G J, YE T, *et al.* Research on eutrophication and its driving factors in reservoirs of the Quzhou area. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 18–28 [施沁璇, 郝贵杰, 叶霆, 等. 衢州地区渔业水域水库水体富营养化水平及驱动因子研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 18–28]
- TANAKA T, GUO LD, DEAL C, *et al.* N deficiency in a well-oxygenated cold bottom water over the Bering Sea shelf influence of sedimentary denitrification. *Continental Shelf Research*, 2004, 24: 1271–1283
- THAMDRUP B, DALSGAARD T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1312–1318
- WANG G. Nitrogen removal of sludge liquor based on simultaneous partial nitrification/anammox/denitrification (SNAD) process. Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2017 [王刚. 基于同时亚硝化/厌氧氨氧化/反硝化(SNAD)技术的污泥消化液脱氮工艺研究. 大连理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- YE M. Study of influence factors on ammonia Nitrogen removal in Wenzhou typical rivers. Doctoral Dissertation of Lanzhou University of Technology, 2017 [叶萌. 温州典型河道水中氨氮去除的影响因素研究. 兰州理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG M P. Spatial and temporal distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation bacteria in mangrove wetland. Master's Thesis of Xiamen University, 2017 [张满平. 红树林湿地亚硝酸盐型厌氧氨氧化和厌氧甲烷氧化微生物时空分布. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG R Z, Li F R, YUAN Q Q, *et al.* Marine nitrogen cycle and prediction based on genome-scale metabolic network model. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(6): 1130–1147 [张日钊, 李斐然, 袁倩倩, 等. 海洋氮循环过程及基于基因组代谢网络模型的预测. *微生物学报*, 2020, 60(6): 1130–1147]
- ZHAO F, XU H, ZHAN X, *et al.* Spatial differences and influencing factors of denitrification and anammox rates in spring and summer in Lake Taihu. *Environmental Science*, 2021, 42(5): 2296–2302 [赵峰, 许海, 詹旭, 等. 太湖春夏两季反硝化与厌氧氨氧化速率的空间差异及其影响因素. *环境科学*, 2021, 45(5): 2296–2302]
- ZHU G, WANG S, WANG W, *et al.* Hots pots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nature Geoscience*, 2013, 6: 103–107
- ZHU G, WANG S, WANG Y, *et al.* Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME Journal*, 2011, 5: 1905–1912
- ZHU Z Y, YU D S, Li J. Influence of C/N on nitrogen removal performance and kinetics characteristics of ANAMMOX/denitrification synergistic interaction. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(6): 2813–2818 [朱泽沅, 于德爽, 李津. C/N 比对 ANAMMOX 与反硝化协同脱氮性能影响及其动力学. *环境工程学报*, 2016, 10(6): 2813–2818]

Effects of *Ruditapes philippinarum* on Denitrification and Anaerobic Ammonia Oxidation Rates of the Sediment/Water Interface in Seawater Aquaculture Pond

ZHU Wenjun^{1,2}, YUAN Shengyi^{1,2}, LI Jian², CHANG Zhiqiang^{2①}

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

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

Abstract The eutrophication problem caused by various reasons such as excessive nitrogen level in aquaculture wastewater are the most critical obstacle to the sustainability of aquaculture industry in China at present. Denitrification and anaerobic ammonium oxidation (Anammox) are important nitrogen cycling processes in natural water ecosystems, which are the main nitrogen removal pathways in the sediments. Clams could not only purify aquaculture water column by their water-filtering activities and wriggle behaviors, but also change the material transportation which occurs in the sediment/water interface. In the present study, the slurry incubation experiments using the sediment samples collected at the area with or without Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in a biological wastewater treatment pond in Sept., Oct., Nov. and Dec., 2020 have been performed to investigate the potential denitrification and anammox activity rate, and the relationship between the denitrification or anammox activity rate and the porewater physicochemical parameters have also been analyzed. The results showed that the anammox was found in the sediment of clam culture area in Oct. and Nov., and the denitrification-anammox coupling were also found. The denitrification activity rate of sediments with clam culture in the four months were higher than that of sediments without clam, and the highest rate (0.005 8 $\mu\text{mol}/\text{kg}\cdot\text{h}$) was found in the sample of Sept. There was a significant positive correlation ($P<0.01$) between the denitrification activity rate and porewater temperature in clam culture area, and between the porewater NH_4^+ level and anammox activity rate. The anammox has been found in the seawater aquaculture pond. The clam promoted denitrification and anammox processes in sediment/water interface which showed a vital role in nitrogen removal in sediment in the present study. The results will not only enrich the nitrogen cycling theory of aquaculture ecosystem, but also provided insights to establishing new biological wastewater treatment measures.

Key words *Ruditapes philippinarum*; Denitrification; Anaerobic ammonia oxidation; Sediment

① Corresponding author: CHANG Zhiqiang, E-mail: changzq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210407001

http://www.yykxjz.cn/

刘宇岩, 李凤辉, 边力, 朱文静, 陈四清, 曲江波, 常青, 刘长琳, 葛建龙. 中华蛸 *vasa* 基因的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 118–128

LIU Y Y, LI F H, BIAN L, ZHU W J, CHEN S Q, QU J B, CHANG Q, LIU C L, GE J L. Cloning and expression of the *vasa* gene in the *Octopus sinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 118–128

中华蛸 *vasa* 基因的克隆及表达分析*

刘宇岩^{1,2} 李凤辉² 边力² 朱文静² 陈四清^{2①}
曲江波³ 常青² 刘长琳² 葛建龙²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
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. 烟台开发区天源水产有限公司 山东 烟台 264006)

摘要 *vasa* 基因编码的蛋白是 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) 蛋白家族成员, 对真核生物生殖细胞的形成具有关键作用。本研究使用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了中华蛸(*Octopus sinensis*) *vasa* 基因全长, 共 2438 bp, 其中, 开放阅读框长 2067 bp, 编码 688 个氨基酸, 5'-UTR 长 128 bp, 3'-UTR 长 244 bp (包含 A 尾巴)。基于 ExPASy、Signal 4.1、TMHMM、SMART 等在线软件对 *Os-vasa* 基因的蛋白质结构进行预测, 得出其氨基酸分子量为 76 580.53 Da, 理论等电点为 5.89。无信号肽, 跨膜区域没有明显的信号, 因此, 推测其为胞内蛋白, 不属于膜蛋白。该蛋白具有 DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域, 而且有 9 个 DEAD-box 家族蛋白的典型保守区域, 表明所得 cDNA 属于 *vasa* 基因家族。使用 qRT-PCR 对中华蛸各时期胚胎、初孵幼体及 2 个发育时期的卵巢及雌雄不同组织的表达模式进行分析。结果显示, *Os-vasa* 基因在性腺中特异性表达, 且在卵巢中的表达大于精巢, 未成熟和成熟卵巢中均有 *vasa* mRNA 表达, 且未成熟期表达量较高。因此, 推测 *Os-vasa* 基因可能在卵巢发育过程和功能维持等方面起到重要作用。在中华蛸早期胚胎发育阶段, 均能检测到 *Os-vasa* 基因转录本, 前 10 d 微弱表达, 从第 13 天开始, 表达量逐渐上升, 至第 19 天达到最高。在初孵幼体阶段, *Os-vasa* 分别在第 8 天和第 20 天出现最低和最高表达量。本研究结果可为中华蛸原始生殖细胞起源、迁移和分化提供理论资料, 有助于加深对中华蛸卵巢发育和卵子发生过程的理解。

关键词 中华蛸; *vasa*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0118-11

vasa 基因编码的蛋白是 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) 蛋白家族成员, 该蛋白参与多种细胞进程, 如细胞 RNA 转录调节, RNA 剪切、修饰和代谢, 核内 mRNA 的运输及降解等(Dehghani *et al*, 2015)。

Schüpbach 等(1986)首次在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现 *vasa* 的存在, 证明其属母源基因, 是生殖质的前体, 在生殖细胞分化中发挥作用(Hay *et al*, 1988)。原始生殖细胞(PGCs)是由细胞分化

* 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和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020GH02)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020GH02)]. 刘宇岩, E-mail: 157107719@qq.com

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

收稿日期: 2021-04-07, 收修改稿日期: 2021-04-29

而来,发育早期从体细胞中掉落,随后经过一系列复杂的趋化因子作用发生转移,至生殖脊时精卵结合促使原始性腺形成。随后通过一系列的分裂增殖与分化过程,在性成熟阶段由卵巢和精巢分泌成熟的配子(胡翔, 2015)。近年来,一些分子标记的发现帮助了PGCs的鉴定,硬骨鱼PGCs的第1个分子标记是 *vasa* 基因(Olsen *et al*, 1997)。*vasa* 基因具有高度保守性,继在果蝇体内被克隆后,在无脊椎动物和脊椎动物相继展开研究,如家蚕(*Bombyx mori*) (Cao *et al*, 2012)、鸡(*Gallus gallus*) (Tsunekawa *et al*, 2000)和小鼠(*Mus musculus*) (Reunov *et al*, 2015)等。*vasa* 基因作为母源性基因,在生殖细胞中特异性表达,因此,可能在生殖发育的调控过程中发挥作用。目前,已在多种鱼类成功克隆 *vasa* 序列并得到其同源基因,如斑马鱼(*Danio rerio*) (Krøvel *et al*, 2004)、青鳉(*Oryzias latipes*) (Herpin *et al*, 2007)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*) (Wu *et al*, 2011)和七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*) (林睿涓等, 2017)等,并深入研究了 *vasa* 在早期性腺分化及发育过程中发挥的作用。但未见有关中华蛸(*Octopus sinensis*) *vasa* 基因的报道。

中华蛸属于八腕目(Octopoda)、蛸科(Octopodidae)、蛸属,在浙江、福建和广东等近海区域广泛分布。中华蛸喜穴居,肉质鲜美,蛋白质含量丰富且营养均衡(郑小东等, 2011),生鲜即食,加工后晒干也可,能食部分占比很高(92%以上),颇受人们喜爱。中华蛸作为我国重要的经济海产类,已开展了对其人工养殖及繁育的研究(蔡厚才等, 2009; 郑小东等, 2011),但目前对中华蛸繁育机制的研究仍处于探索阶段。中华蛸卵母细胞发育不同步,属分批产卵,给规模化苗种繁育增加了困难,工厂化养殖仍需努力。*vasa* 是生殖细胞的分子标记物,开展 *vasa* 基因克隆和表达研究,可为中华蛸人工繁育和养殖提供理论依据。本研究以中华蛸为对象,运用cDNA末端快速扩增技术(RACE)克隆中华蛸 *vasa* 基因,并使用荧光定量PCR技术(qRT-PCR)对其早期发育阶段及各器官组织的表达状况进行检测,旨在完善中华蛸分子生物学和生殖调控方面的知识,为其生殖细胞的分化、早期性别鉴定及性别决定机制提供数据支撑,为实现工厂化繁育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验样品制备

实验用中华蛸亲体在浙江南麂岛海域捕获,经长途运输至山东省烟台市牟平区天源水产有限公司进

行人工培育,养殖水温为23.2℃~25.6℃,盐度为30~32,日换水量100%~200%。分别取活力旺盛、体质量为1.0~1.5 kg的雌雄成体中华蛸各3尾,观察其右侧第3条腕确认雌雄,经MgCl₂ (浓度为20 g/L)麻醉后迅速解剖,分别取其卵巢、精巢、鳃、心脏、肾脏、肝胰腺、大脑、视腺和皮肤。所用受精卵、孵化出膜后幼体均由成体中华蛸自然产卵、人工培育而来。培育水温为23.8℃~26.0℃,溶氧>5.0 mg/L,受精卵孵化27 d得到初孵幼体。幼体孵出后,移入专用水泥池(6 m×2 m×1.5 m)。根据幼体密度和大小投喂合适密度的卤虫(*Artemia*),并连续充气确保氧气充足,前3 d使用静水培育,第4天使用流水,换水量为50%~70%,并进行吸底、排污。收集不同发育时间的受精卵(5、10、13、16、19、21、24和27 d)、孵化出膜后幼体(2、5、8、11、14、17、20、23和26 d)及未成熟、成熟期的卵巢若干,未成熟期体重为(182.31±20.29) g,性腺指数(GSI)为(0.55±0.22)%,卵母细胞直径在80~100 μm之间;成熟期体重为(1326±100) g, GSI为(5.19±0.81)%,卵母细胞直径在400~500 μm之间。所有样品均快速装入含有RNA保存液的2.0 mL无酶管中,并在4℃冰箱放置12 h,保证保存液完全渗入组织。样品带回后贴上标签,转入-80℃冰箱,防止RNA降解,用于后续基因克隆和表达分析。

1.2 主要试剂

SMARTTM RACE cDNA amplification 试剂盒、PrimeScriptTM RT reagent with gDNA eraser 反转录试剂盒、DNA Marker、Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM V 2.0)大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α菌株感受态细胞和pMDTM 18T vector cloning 试剂盒均购自TaKaRa公司,SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒购自艾克瑞生物,动物组织总RNA提取试剂盒(DP431)购自天根生化科技有限公司,ChamQTM SYBR Color qPCR master mix 试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 总RNA提取及cDNA第一链合成

本实验总RNA的提取使用动物RNA提取试剂盒(DP431),并参照其说明书提取中华蛸胚胎、孵化出膜后幼体各个时期和成体不同组织的总RNA。根据目的片段的长短采用不同浓度(1%~2%)的琼脂糖制成凝胶,点样后检测RNA的质量(条带是否清晰),使用NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)微量分光光度计检测RNA的纯度及浓度(用量1 μL)。5'RACE、3'RACE模板链的制备按照SMARTTM RACE cDNA amplification kit说明进行。

1.4 *vasa* 基因核心序列克隆

从本实验室构建的中华蛸转录组数据的注释信息, 筛选比对得到 *vasa* 基因的部分 cDNA 序列。通过 Primer 5.0 软件设计 3 对引物扩增核心序列(表 1), 以中华蛸成熟卵巢组织 cDNA 为模板分别进行扩增。20 μL 反应体系: 10 μL Premix *Taq*TM (LA *Taq*TM V2.0), 正向引物 *Os-vasa* F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , 反向引物 *Os-vasa* R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , cDNA 模板 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 6.4 μL 补齐。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物扩增完成后, 在电泳板中检测扩增条带, 切胶仪(DUT-48 超薄型)下观察合适的条带, 并用 SteadyPure DNA 回收 DNA。纯化后的 DNA 连接到 pMD18-T vector 中, 连接体系: pMD18-T vector 1 μL , Solution I 5 μL 及 DNA 纯化产物 4 μL , 并置于 PCR 反应仪中反应 3 h (16 $^{\circ}\text{C}$)。之后转入冰上融化的 DH5 α 感受态细胞过夜培养, 筛选阳性单克隆并进行菌落 PCR 鉴定, 将含有目的基因的菌液测序(华大基因)。

1.5 *vasa* 基因全长克隆

测序后, 经拼接比对确认为核心序列, 设计 RACE 特异性引物 *Os-vasa* 5'GSP-1、*Os-vasa* 5'GSP-2、*Os-vasa* 3'GSP-1 和 *Os-vasa* 3'GSP-2, 使用巢式 PCR 进行 3'和 5' RACE 扩增, 5'端扩增: 5'RACE cDNA 为模板, 先用 5'GSP-1 与 RACE 通用引物 UPM-long 组合完成第 1 次反应; 接着用第 1 次反应获取的目的液稀释后为模板, 5'GSP-2 与 RACE 通用引物 UPM-short 或 NUP 组合完成第 2 次反应。3'端扩增: 3'RACE cDNA 为模板, 3'GSP-1 与 RACE 通用引物 UPM-long 组合完成第 1 次反应; 用第 1 次反应获取的目的液稀释后为模板, *Os-vasa* 3'GSP-2 与 RACE 通用引物 UPM-short 或 NUP 组合进行第 2 轮扩增。

PCR 反应体系(20 μL): 10 μL Premix *Taq*TM (LA *Taq*TM V 2.0), 3'或 5'特异性引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , UPM (或 NUP) 0.8 μL , RACE-cDNA 模板(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 6.4 μL 补齐。反应程序流程: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 3'和 5'特异性引物退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 反应 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。获取的产物检测后进行回收、纯化, 之后连接转化培养, 挑阳性菌株测序(华大基因公司)。

1.6 *vasa* 基因序列分析

测序完成的片段使用 Contig Express 9.1 软件进

行拼接、验证, 并用 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对, 确认实验得到的 cDNA 是 DEAD-box 家族的 *vasa* 基因。使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/Orf.cgi>)在线软件推导 *vasa* 基因的开放阅读框, 利用 ExpPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/)网站分析分子量、理论等电点, 利用 Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽, 使用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜区分析, 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测结构和功能结构域。将 *Os-vasa* 与其他已知物种的 *vasa* 氨基酸序列使用 NCBI 进行同源蛋白比对, 并使用 DNAMAN 对同源蛋白多重比较, 利用 MEGA 5.2 软件使用邻近法(neighbor-joining)构建系统进化树(Koichiro *et al.*, 2011)。

1.7 实时荧光定量 PCR

取不同发育时间的胚胎、孵化出膜后幼体、2 个时期的卵巢和不同组织的总 RNA, 反转录为 cDNA。将每个样品浓度加无菌无酶水补齐至 50 ng/ μL , 根据 *Os-vasa* 基因的核心序列, 利用 Primer 5.0 设计 2 对荧光定量特异性引物 *Os-vasa*-RT-F/R, 以 β -actin 为内参基因, 使用 StepOneTM Real-time PCR system (IBM, 美国), 配制 20 μL 反应体系: ChamQTM SYBR color qPCR master mix (2 \times) 10 μL , ROX reference dye I (50 \times) 0.4 μL , *Os-vasa*-RT-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , *Os-vasa*-RT-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , cDNA 模板 (50 ng/ μL) 2 μL , ddH₂O 6.8 μL 补齐。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (预变性); (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s) 40 个循环。所有检测样本设 3 个生物学重复, 并设置 3 个技术重复, 反应结束后查看熔解曲线是否正常。根据所测数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法算出 *Os-vasa* 基因相对表达丰度, 求其平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE), 使用 SPSS 17.0 软件对表达量进行方差检验, $P < 0.05$ 被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *Os-vasa* 基因序列分析

中华蛸 *vasa* 基因全长为 2438 bp, 命名为 *Os-vasa* 其 ORF 长度为 2067 bp, 预测蛋白有 688 个氨基酸, 5'-UTR 长 128 bp, 3'-UTR 长 244 bp (包含 A 尾巴), 理论等电点为 5.89, 氨基酸分子量 76 580.53 Da, 无信号肽, 跨膜区域没有明显的信号, 推测其为胞内

表 1 本研究所用引物名称和序列
Tab.1 Names and sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>Os-vasa</i> F1	CCCCACGAAAAGGAGCACG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R1	GGTGGTGGAGGGGGGATGT	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> F2	ATGGCACGGGGAAGAGGTC	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R2	GGAGGGGGGATGTATGGAG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> F3	GATTGTTGCCCTACTCGTG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R3	TCAATCACTTGTCTTGGGGG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> 5'GSP-1	CTGGTGGTGGAGGGGGGATGTATGG	RACE
<i>Os-vasa</i> 5'GSP-2	TGATTACTGTCACCTTGGTCTCTTCTA	RACE
<i>Os-vasa</i> 3'GSP-1	GCATTGGCAGAACTGGTCGGTGTGGT	RACE
<i>Os-vasa</i> 3'GSP-2	CAAATGGCACATACAATAGTGGACG	RACE
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	菌落 PCR Colony PCR
M13-R	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	菌落 PCR Colony PCR
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物 RACE universal primer
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
β -actin-F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	qRT-PCR
β -actin-R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	qRT-PCR
<i>Os-vasa</i> -RT-F	TACAAGTCTGGGGATGCTGG	qRT-PCR
<i>Os-vasa</i> -RT-R	ACTCTCGTCTTCTGGTGGTG	qRT-PCR

蛋白, 不属于膜蛋白。具有 *vasa* 基因的 DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域, 且包含 DEAD-box 家族蛋白的典型特点: 9 个保守区域, 分别为 AQTGSGKT(I)、PVLTLQLQ (Q)、PTRELA (I a)、TPGRI (I b)、DEAD (II)、SAT (III)、RGLD (V)、LVFVE (IV) 和 HRIGRTGR(VI)。另外, 预测的氨基酸序列 N 端有多个 RG 重复序列, C 末端存在 *vasa* 基因常见的保守结构色氨酸(W)残基和酸性氨基酸残基(EEEE), 序列中存在多个 GG 重复序列(图 1)。

2.2 氨基酸序列多物种比对及系统进化树构建

通过在线软件 NCBI blastx 和 DNAMAN 软件, 将中华蛸 *Os-vasa* 氨基酸序列与其他物种的 *vasa* 基因编码的氨基酸进行比对。结果发现, 该氨基酸序列与加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*) 同源性最高(98%), 其次是虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)(68.74%)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)(67.36%)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)(66.12%)、青螺(*Lottia gigantea*)(65.15%)、海兔(*Aplysia californica*)(63%)和紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)(62%), 与人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)同源性较低, 分别为 54%和 53%。另外, DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域的氨基酸序列保守性较高(图 2)。

为了分析 *vasa* 基因在不同物种中的进化关系, 利用 MEGA 5.2 软件对中华蛸及其他 13 个物种的 DEAD-box 蛋白序列构建系统进化树(图 3), 结果显示, 无脊椎动物和软体动物, 脊椎动物各聚一支, 其中, 中华蛸先与加州双斑蛸、虎斑乌贼聚为一支, 这表明它们的亲缘关系较近, *vasa* 基因在头足类中可能较为保守, 独立形成分支后再与软体动物的腹足纲(Gastropoda)和瓣鳃纲(Lamellibranchia)聚为一支。*Os-vasa* 在系统进化树中呈现的结果与中华蛸在生物学分类中的地位基本一致。

2.3 *vasa* 在不同发育时期及不同组织中的表达分析

在胚胎时期的 qRT-PCR 检测结果如图 4 所示, *Os-vasa* 基因在发育前 10 d 微弱表达, 从第 13 天开始, 表达量逐渐上升, 至第 19 天达到最高, 之后表达量又开始下降, 一直到孵化出膜。在仔蛸阶段, 从出膜到 17 日龄, *Os-vasa* 基因表达量都维持在较低水平, 8 日龄几乎检测不到表达信号, 从 20~23 日龄期间的表达量较高, 且在 20 日龄表达量最高, 后期阶段(26 和 29 日龄)又维持在较低水平(图 5)。

中华蛸雌性个体和雄性个体各组织的 qRT-PCR 检测结果如图 6 所示, *Os-vasa* 基因无论在雌性还是雄性个体性腺组织的表达量均较高, 在其他组织中

表达量均很低，并且在卵巢中的表达量高于精巢。

取未成熟的卵巢和成熟期的卵巢进行 qRT-PCR 检测，结果显示(图 7)，未成熟卵巢表达量显著高于成熟卵巢(P<0.05)，未成熟期的表达量是成熟期的 15.6 倍左右。

3 讨论

本研究从实验室构建的中华蛭性腺转录组注释中筛选得到 *vasa* 基因的部分片段，并通过 NCBI 进

行比对确认，使用 RACE 技术首次克隆了 *vasa* 基因 cDNA 序列，并以 *Os-vasa* 命名。其全长为 2438 bp，共编码 688 个氨基酸，理论等电点为 5.89，氨基酸分子质量为 76 580.53 Da。*vasa* 蛋白属于 DEAD-box 蛋白家族，Ia-Ib 和 II~VI 这 9 个保守区域是 DEAD-box 家族蛋白共有的特点(Tanner *et al*, 2001)，在大部分 DEAD-box 蛋白家族成员中保守性表达。本研究得到的 *Os-vasa* 基因同样发现了这 9 个保守基序的存在，每个保守基序都行使着特殊的生理功能，其中，Q

```

1  AAGCAGTGGTATCAACGCGAGTACATGGGATCCGCGGTGAAAGTCTTTTAAACCACTCTGACCTGCGACGTTTTGCATTCAGCGTTTTCCCCACGAAAAGGAGCACG
115  TGCATTCGCGCAAGATGGCACGGGAAGAGTTCGAGGACTTGCTTTCTTAGACTTCAATGAAAATGACAAAAGTTACCAAACTTCAATCCGCCTCTCTCTGCCCAGTTTGA
      M A R G R G R G R G L A F L D F N E N D K V T K H S I P P P S S G Q F D
229  TGACGAGTGTGGGACGATGACTATTCTGTAATAACAATGTCACCAATGGTAACTGTGATAACAGCAGCAGCCCTTATCAAATGCTACTTTTACAATAATGTCCAGTGAA
      D E C W D D D Y S V N N N V T N G N C D N S S S P L S N A T F Y N N V P V N
343  TAGTCACTCTGATTCAGTACCAAAAAATTTGGAGGCCAGACCAACAGAGAAACAGCCTGGTGTAGAGGTTTCAGAAAACCTGAAATGCTGGGACGAGGAGACTCACCTAG
      S H S D S V P K K F W R P D Q Q R K Q P G C R G F R N L N A G T R R D S P S
457  TCCATCAATCAATAATTCAGAGGAAGATTGGAACCTGTGATGCTGAACAAGAAAACAAATACCATAGTCGAAAAGGAGTCCAAATTCAGTCTAGAAGACAGCAAGTGACAGTAA
      P S I N N S E E D W N S D A E Q E N K Y H S R K E S K F S S R R D Q G D S N
571  TCAAAGTAGACCAGGTAATGGTCTGCTACAAGTCTGGGGATGCTGGTGTGTAATGAAGGAATGCATTCGATTAATGTCAAGTTCATATAAAGTTCAGATCCATTTGACAA
      Q S R P G N G A R Y K S G D A G C N V R N A S R F N V S S Y K R S D P F D K
685  AGTGCCTGACCATATGACATTAGGAGATGCTCAAGGTGGTGAAGTCCATACATCCCCCTCCACCAGAAAGACGAGAGTGAATCTTTCAGTCCATTCACCGGGATCAAA
      V P D H M T L G D A Q GG E A P Y I P P P P P E D E S A I F Q S I P T G I N
799  TTTTCTAAGTATGATGATATTCCAGTCGAGATTTCTGGGCGAGCTGCCAAGCGGTTTAGTTGATTTTGAAGACGCGCAATCCAGCAAAAAGATAATGGAAAACATCTATCG
      F S K Y D D I P V E I S G R A A P S G L V D F E D A Q F Q Q K I M E N I Y R
913  TGCCAAATTTGAAAAACCAACTCCAATCCAGAAAAATGCCATTCCAATATACAAGCTGGTCTGATCTAATGGCCTGTGCCAGACTGGCTCTGGTAAAACAGCTGCCTCTCT
      A K F E K P T P I Q K N A I P I I Q A G R D L M A C A Q T G S G K T A A F L
1027  ATTGCCAGTATTAACATTGTTGTTTACAAGAGGTGTGAAAAGATGTGAACAAAATCTCCACAATACCCTGAAATTTTGAATTTGCCCTACTCGTGAACCTGGCTGTACAGAT
      L P V L T L L L Q R G V K R C E Q N L P Q Y P E I L I V A P T R E L A V Q I
1141  ATTCATGGCACTCGCAAAATTTGCCATGGGACAAGCATACGATCTGCTGTGTCTATGGTGGTACATCAGTTTCAAGCCAGATAAGAAATATTTCTGTGGAGTTCATGTGTT
      F M D T R K F A Y G T S I R S A V V Y GG T S V S S Q I R N I S C G V H V L
1255  AGTTGGAACCTCCAGGTCGCTACTTGTATTATTTCAGAAAAATACAGTGAATATATCTCAAGTGAACATTTTCATCTGGATGAAGCAGATCGAATGTTAGATATGGGATTTGA
      V G T P G R I L D F I Q K N T V N I S Q V K H F I L D E A D R M L D M G F E
1369  GCCAGATATAAGGAGTGGTGGATGATCATGGAATGCCAGCAAAAACCAAGACAGACATTTGATGTTCAAGTGTACATTTCCAGACAAAATCAAGAAATAGCTGCTGATTT
      P D I R R L V D D H G M P A K T Q R Q T L M F S A T F P D K I Q E L A A D F
1483  TCTTAATGATATTTGTTTCTCACCATTGGCTTGGTGGTGGTGCATGTTCTGATGTGGAACAGATTCTCTTAAAAGTATCAAGCCAGGAAAAAGAGAGAAATTTGTCAGTTT
      L N D Y L F L T I G L V GG A C S D V E Q I L L K V S R Q E K R E K L C S F
1597  TTTAGATGAATTTGGTTCAGATAAAACCCCTAGTCTTTGTGGAACAAAAGAGGAATGCAGACTTTTGGCATCTACCTCTCACAAAATGATTACAAAACAACAGTATTCATGG
      L D E F G S D K T L V F V E Q K R N A D F L A S Y L S Q N D Y K T T S I H G
1711  AGACCGTCTTCAACGAGAAAGAGAAGAGCCTTACAAGATTCAAGACAGGAAGAATACCAGTGTAAATGCAACTTCAGTGGCAGCTCGAGACTTGATATTCCTAATGTCAG
      D R L Q R E R E A L Q D F K T G R I P V L I A T S V A A R G L D I P N V S
1825  CCAAGTTGTAACACTAGCCTTCCAGCTCTGTGATGAATATGTCACCCGATTTGGCAGAAGTGGTGGTGGTAAATACAGGTGTCGCATCAGCTTTTATCTCCGATTC
      Q V V N Y D L P S S V D E Y V H R I G R T G R C G N T G R A I S F Y S S D S
1939  AGACTCGAGTCTGGCAAAAGCCTTGACAAAGATATTGAGTGTGCTCAACAAAATGCCCTGTTGGTTAGAGGAAGAAGCAAAAATGGTAGGCCCTTCAATGGCAGATACAA
      D S S L A K A L T K I L S D A Q Q N V P V W L E E E A K M V G L S N G T Y N
2053  TAGTGGACGTTTTGGTGGCCGGATCGGAGGAGAATTAGGAGCTGTGCACCAAGAAATGGTAAATGATGGTGGTGGTGGCAACCTATAAGCAGTGGAGCAGCCCAAGACAAGT
      S G R F GG R D R R R I R S C A E M V N D G C G W Q P I S S G A P P R Q V
2167  GATTGAAGAGGAAGAGTGTGGGAATAATTACTTTCCAAGTGTGATGATCATTCCATACAAAAGTTTTCTATTTTTTCATTCAAAGACTATTTTCACTTGATCTGTTGGGTG
      I E E E E L W E *
2281  TTGATCCTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTAAAAATTTTCAATTTGGGAGAAAACAAGATCTGTGTAATAGTTAATGTTTTTTTATAATTGCTTATTTGCTTTAAATAA
2395  ATTTGATTTTGGAGTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

```

图 1 *Os-vasa* 基因 cDNA 序列全长和编码的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *Os-vasa*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 均用灰色阴影标出；PolyA 用双下划线标出；GG 重复序列、酸性氨基酸和色氨酸用方框标出；DExDc 和 HELICc 2 个功能域用下划线标出；阴影加方框部分是 *Os-vasa* 保守基序 Start codon (ATG) and stop codon (TAA) are marked with gray shadow, and PolyA is marked with double underline; Nucleotide with a frame represents GG repeat sequence, acidic amino acid and tryptophan; Open reading fragment; DExDc and HELICc functional domains are underlined; Sequences in gray background and frame represents the *Os-vasa* conserved motifs

motif 框在 ATP 的结合与水解过程中发挥重要作用, 谷氨酰胺残基加上 N 可以参与氢键的形成, 与功能性区域 I 也有关联, 例如, 相互配合促使 ATP、RNA 两两结合(Rocak *et al*, 2004)。motif I ~ III 又可以相互作用形成一个 ATP 水解的作用口袋(Caruthers *et al*, 2002)。motif I a 和 motif I b 则主要参与 RNA 的结合过程, motif IV、V 和 VI 参与 ATP 酶和解旋酶的活性调节(Cordin *et al*, 2006)。经编码氨基酸的多序列比

对, 在保守基序区域, 物种间呈现高度保守性, 仅有少数氨基酸残基存在差异, 表明 *vasa* 基因在进化过程中较为保守。另外, 在 *Os-vasa* 基因中发现了一些 *vasa* 基因的普遍性特征, 例如, 存在多个 GG 重复序列, 氨基酸 C 末端存在酸性氨基酸残基, 终止密码子前端有 1 个色氨酸残基。GG 基序参与蛋白因子 eIF4A 的相互作用(Rogers *et al*, 2002), C 末端的酸性氨基酸残基常与 RNA 结合过程有关(Fabioaux *et al*, 2004)。

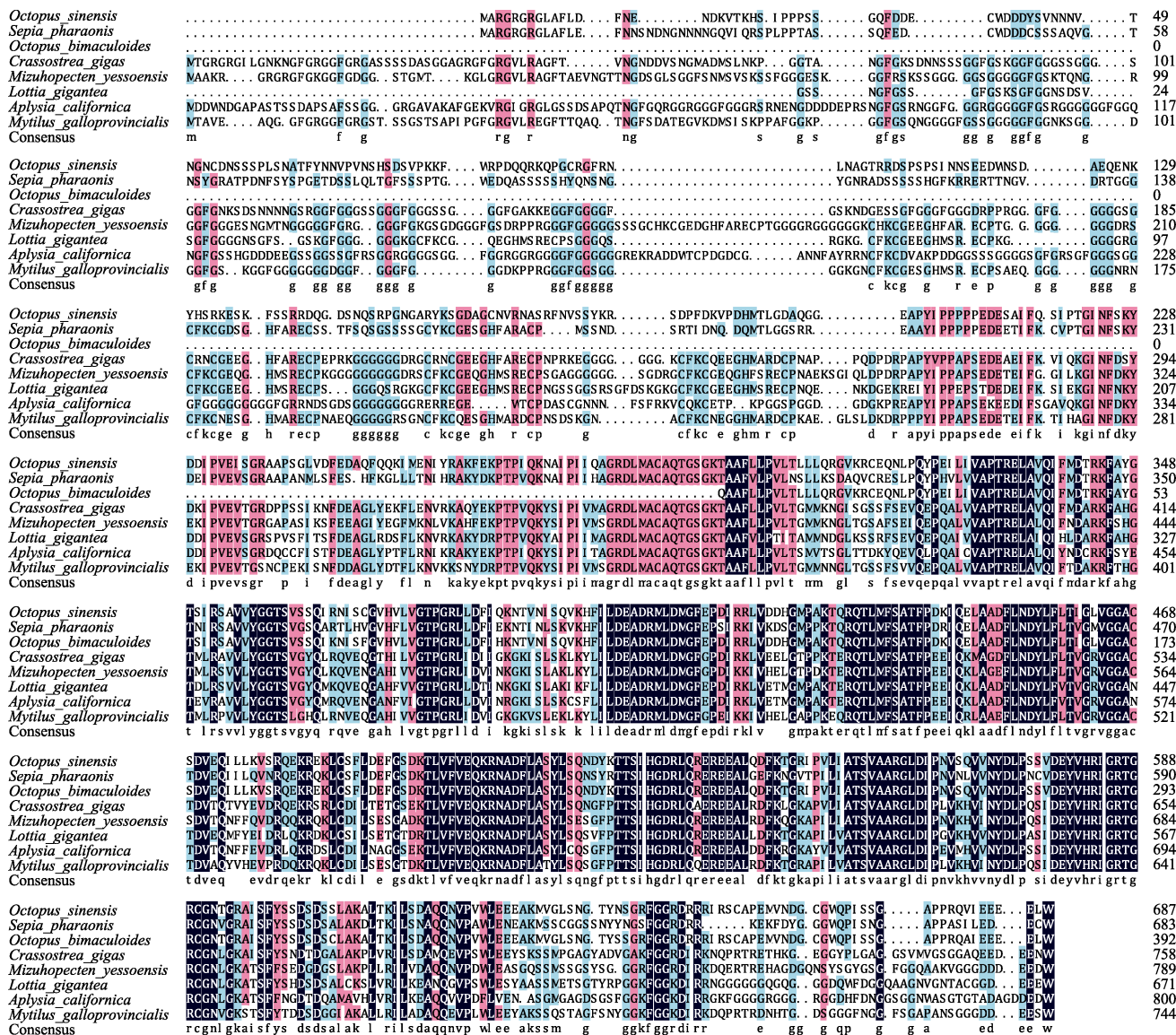


图 2 中华蛸 *Os-vasa* 编码氨基酸序列与其他物种同源序列比对

Fig.2 Homologous amino acid sequences alignment of *Os-vasa* with other species

阴影部分表示氨基酸同源, 左边为物种名称, 右边为比对到的氨基酸位置。

各物种蛋白 NCBI 登录号: 加州双斑蛸(KOF70288.1)、虎斑乌贼(CAE1321294.1)、太平洋牡蛎(XP_034310873.1)、
 虾夷扇贝(XP_021370694.1)、青螺(XP_009057808.1)、海兔(XP_005113588.2)、紫贻贝(BAJ15435.1)

The shaded area indicates amino acid homology species. Species NCBI Login No: *Octopus bimaculoides* (KOF70288.1), *Sepia pharaonis* (CAE1321294.1), *Crassostrea gigas* (XP_034310873.1), *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021370694.1), *Lottia gigantea* (XP_009057808.1), *Aplysia californica* (XP_005113588.2), *Mytilus galloprovincialis* (BAJ15435.1)

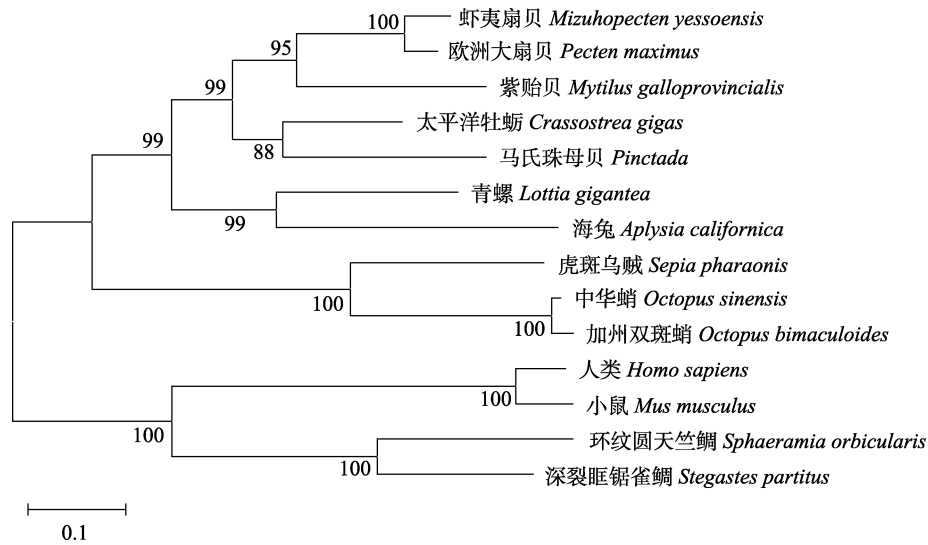
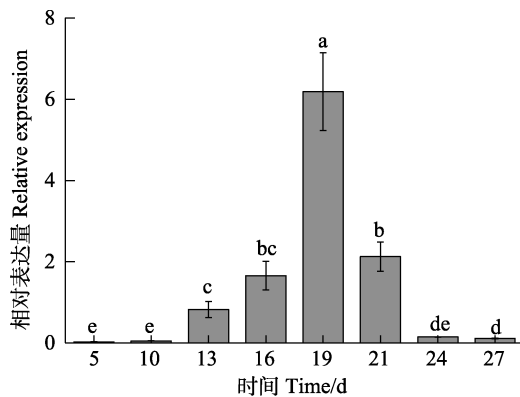


图3 不同物种 vasa 蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of vasa protein from different species

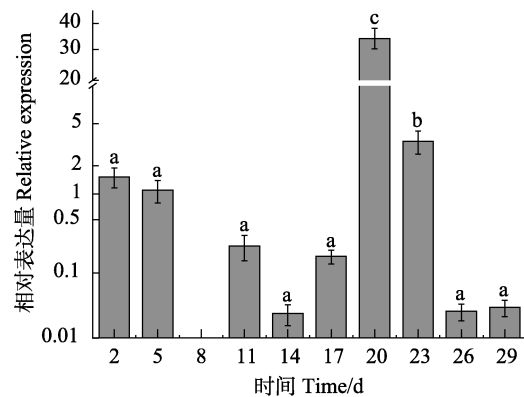
所用到的物种 *vasa* 基因序列登录号: 虾夷扇贝(XP_021370694.1)、欧洲大扇贝(XP_033738811.1)、紫贻贝(BAJ15435.1)、太平洋牡蛎(XP_034310873.1)、马氏珠母贝(BAM75192.1)、青螺(XP_009057808.1)、海兔(XP_005113588.2)、虎斑乌贼(CAE1321294.1)、加州双斑蛸(KOF70288.1)、人类(CAB70750.1)、小鼠(NP_034159.1)、环纹圆天竺鲷(XP_030008903.1)、深裂眶锯雀鲷(XP_008278033.1)

The Accession number of *vasa* gene sequence were used: *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021370694.1), *Pecten maximus* (XP_033738811.1), *Mytilus galloprovincialis* (BAJ15435.1), *Crassostrea gigas* (XP_034310873.1), *Pinctada fucata* (BAM75192.1), *Lottia gigantea* (XP_009057808.1), *Aplysia californica* (XP_005113588.2), *Sepia pharaonis* (CAE1321294.1), *Octopus bimaculoides* (KOF70288.1), *Homo sapiens* (CAB70750.1), *Mus musculus* (NP_034159.1), *Sphaeramia orbicularis* (XP_030008903.1), *Stegastes partitus* (XP_008278033.1)

图4 *Os-vasa* mRNA 在胚胎发育时期的相对表达量Fig.4 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at different development stages of the embryo

柱上不同字母代表具有显著差异($P < 0.05$), 下同
Bar with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same as below

RGG 重复区也具有相似性, 在昆虫和脊索动物中普遍存在且大多数位于 *vasa* 蛋白的 N 端, 但并不普遍存在于所有 *vasa* 蛋白, 例如, 在马氏珠母贝(*Pinctada fucata*) (刘雅等, 2017)、刺参(*Apostichopus japonicus*) (隋娟等, 2008)的 *vasa* 蛋白的 N 端未发现 RGG 重复区

图5 *Os-vasa* mRNA 在不同发育时期仔蛸中的相对表达量Fig.5 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at the different stages of the larvae

的存在, 本研究结果也是如此, 说明这些序列并不是不可或缺的, 其行使的功能具有可替代性。功能结构域结果显示, *Os-vasa* 基因具有 DEADc 和 HELICc 2 个结构域, 这些都是 *vasa* 蛋白家族特有的, 表明所得 cDNA 属于 *vasa* 基因家族且高度保守。

中华蛸 *Os-vasa* 氨基酸序列与其他物种 *vasa* 基因编码的氨基酸比对结果显示, 与加州双斑蛸相似度高, 达 98%。系统进化树结果显示, 中华蛸 *Os-vasa*

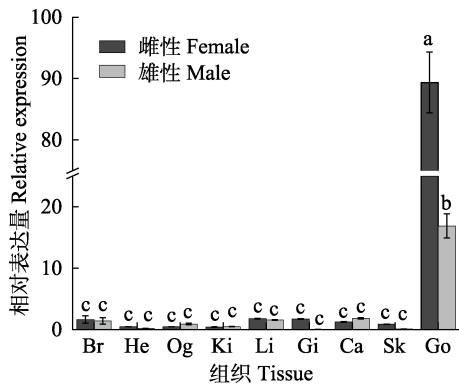


图 6 *Os-vasa* mRNA 在雌雄中华蛸不同组织中的表达

Fig.6 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA in different tissues of female and male *O. sinensis*

Br: 大脑; He: 心脏; Og: 视腺; Ki: 肾; Li: 肝胰腺;
Gi: 鳃; Ca: 胴肌; Sk: 皮肤; Go: 性腺
Br: Brain; He: Heart; Og: Optic gland; Ki: Kidney;
Li: Liver; Gi: Gill; Ca: Carcass; Sk: Skin; Go: Gonad

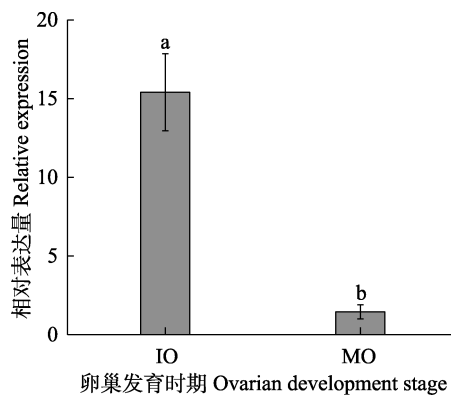


图 7 *Os-vasa* mRNA 在卵巢发育不同时期的表达
Fig.7 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at different stage of ovarian development of *O. sinensis*

IO: 未成熟卵巢; MO: 成熟卵巢
IO: Immature ovary; MO: Mature ovary

蛋白先与加州双斑蛸、虎斑乌贼聚为一支, 预示中华蛸 *Os-vasa* 基因在生物体中发挥的功能与头足类中其他物种高度相似, 然后再与软体动物中腹足纲和瓣鳃纲聚为一支, 与脊椎动物则亲缘关系较远。*Os-vasa* 在系统进化树中的分子学进化地位与中华蛸的生物分类地位是相符的。

Os-vasa 基因组织 qRT-PCR 结果显示, 其在中华蛸卵巢和精巢中高表达, 而在中华蛸其他组织中表达量较低, 甚至检测不到表达信号, 差异极显著 ($P < 0.01$)。这一结果和多数报道的物种 *vasa* mRNA 表达模式一致, 如栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (邵明瑜等, 2007)、马氏珠母贝、太平洋蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus orientalis*) (Nagasawa *et al*, 2009)。研究表明, 通过

RNAi 技术使用 *vasa* dsRNA 处理太平洋牡蛎性腺会导致 *vasa* mRNA 沉默, 性腺 *vasa* mRNA 表达水平明显降低, *vasa* 蛋白表达量也随之降低或者不表达, 且大部分太平洋牡蛎不育 (Fabioux *et al*, 2009)。*vasa* 基因在生殖细胞的特异性表达模式表明其参与调控生殖细胞发育过程并发挥重要作用。也有研究发现, *vasa* 除在性腺组织中表达外, 在其他组织也有表达, 例如, 在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (Hay *et al*, 1988) 的心脏组织, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Wu *et al*, 2014) 的脑和心脏组织, 在小鼠 (Zamboni *et al*, 1983) 的肾和肾上腺组织都检测到 *vasa* 基因的表达。*vasa* 基因不仅参与生殖细胞发育, 还可能通过调节有关 mRNAs 的转录参与体细胞的分化 (Ikenishi *et al*, 2000)。*vasa* 基因具体行使的功能随着生物体的进化演变而存在差异, 仍需要大量的研究工作来阐明。

Özhan-Kizil 等 (2009) 研究表明, *vasa* mRNA 在夏威夷钩虾 (*Parhyale hawaiiensis*) 的 1~16-细胞期均能检测到, 且 32-细胞期前均定位在生殖细胞中; 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 最早从 2-细胞期开始能检测到 *vasa* mRNA 的表达, 且在后期表达没有消失, 但有减弱趋势, 出膜后表达信号消失 (周倩如, 2007)。在模式生物斑马鱼中, *vasa* mRNA 表达信号贯穿整个胚胎发育时期, 在胚胎发育早期存在于各个细胞中, 并随着胚胎的发育逐渐在生殖质区域聚集, *vasa* mRNA 是斑马鱼生殖质的重要组成成分 (周倩如等, 2007)。本研究中, *vasa* mRNA 在发育 10 d 前微弱表达, 从第 13 天开始表达量逐渐上升, 至 19 d 达到最高, 之后表达量又开始下降。在斑马鱼、栉孔扇贝中, *vasa* mRNA 具有母源性特征遗传, 在生殖过程中, 随着配子发生传递给下一代, 分配到原始生殖质中, 即早期 *vasa* mRNA 是由母系基因组传递给胚胎的 (徐红艳等, 2010)。中华蛸可能在第 13 天细胞发生了分化, 体细胞分化为原始生殖细胞 (PGCs), 原始生殖细胞逐渐积累并在第 19 天达到顶峰。随后从 21 d 到出膜阶段, 各个组织器官逐渐发育形成, 是体细胞分裂生殖的时期, 体细胞数量大增, 而生殖细胞的数量所占的比例减少, 因此, *vasa* mRNA 表达逐渐降低。这一表达结果和七彩神仙鱼相似 (林睿涓等, 2017), 推测中华蛸的原始生殖细胞在 13 d 时形成。*Os-vasa* 基因在不同发育时期仔蛸中的表达结果显示, 从出膜到 17 日龄, 基因表达量都维持在较低水平, 8 日龄几乎检测不到表达信号, 这可能因为随着受精过程的发生, 母源性的 *vasa* mRNA 被激活以维持合子早期发育所需, 随着发育的进行, 母源性 mRNA 逐渐被消耗, 仔蛸完成正常的生命活动则需依

赖于自身基因组合成转录产物(许莉佳等, 2012); 随着发育的推进, PGCs 将穿过胚胎各组织(体细胞组织)在性原基聚集, 并结合周围的体细胞, 形成完整的初始生殖腺, 进而分化为卵巢或精巢(朱新平等, 2017)。七彩神仙鱼出膜后 30 日龄和 40 日龄 *vasa* 的表达量较高, 认为 PGCs 在分子水平可能已经开始分化(林睿涓等, 2017)。本研究结果与其相似, 出膜后第 20 天和第 23 天 *vasa* mRNA 表达量较高, 之后又维持稳定, 推测第 20 天和第 23 天中华蛸的 PGCs 在分子水平可能已经开始分化, 但这时期的高表达与性腺分化是否有关, 仍需进一步在组织学水平进行鉴定。

未成熟的卵巢和成熟期的卵巢 RT-qPCR 检测结果显示, 中华蛸未成熟和成熟卵巢均有 *vasa* mRNA 表达, 并且未成熟期表达量较高。斑马鱼卵母细胞原位杂交结果显示, 在卵母细胞的各阶段, *vasa* mRNA 表达量存在差异, 在 II 期卵母细胞表达量最高, 且定位到细胞质中, 在第 III 期开始下降并在后期表达量趋于稳定(项方, 2004)。对中华鳖(*Trionyx sinensis*)卵子发生的 4 个时期进行荧光原位杂交, 在初级卵母细胞和最早期生长期卵母细胞检测出高表达信号, 并认为与细胞进行 RNA 和蛋白质的储存有关, 从生长期后表达信号逐渐减弱(朱新平等, 2017)。革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)在性腺发育阶段 qRT-PCR 相关实验表明, 与成熟卵母细胞(III 期和 IV 期卵母细胞)相比, 未成熟卵母细胞(I 期和 II 期)的 *vasa* 转录本较高(Raghuvver *et al.*, 2010)。在罗非鱼(*Oreochromis spp*)(Kobayashi *et al.*, 2000)和银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(Xu *et al.*, 2005)的研究中也有同样发现。中华蛸 *vasa* mRNA 在雌性生殖细胞的表达图谱与它们较为类似, 未成熟期表达量较高, 可能与此时期卵母细胞中 RNA、蛋白质等物质大量积累有关; 而在成熟期表达量减弱, 这可能与转录产物的扩散使成熟卵细胞卵黄蛋白原的含量增加有关, 而且随着卵母细胞体积的增大, *Os-vasa* mRNA 相对密度减少。*vasa* mRNA 在卵巢发育各时期的差异性表达表明, *vasa* mRNA 与卵子发生密切相关。

4 结 论

本研究克隆了中华蛸 *vasa* 基因 cDNA 的全长序列, 并以 *Os-vasa* 命名, 对中华蛸胚胎发育、初孵幼体、卵巢的不同时期与中华蛸不同组织进行了表达分析。结果显示, 中华蛸 *Os-vasa* 基因全长为 2438 bp, 其 ORF 长为 2067 bp, 编码 688 个氨基酸。氨基酸同源性序列分析表明, 中华蛸 *Os-vasa* 与加州双斑蛸同源性最高。基因表达结果显示, *Os-vasa* 基因主要在

性腺中表达, 且在卵巢的表达量高于精巢; *vasa* 基因在中华蛸胚胎发育时期和出膜后 29 d 均有表达, 胚胎期第 19 天表达量较高, 出膜后第 20 天和第 23 天表达量较高; 中华蛸未成熟和成熟卵巢均有 *vasa* mRNA 表达, 且未成熟期表达量较高。本研究结果可为中华蛸的性分化、生殖细胞分子标记及发育研究提供参考。

参 考 文 献

- CAI H C, ZHUANG D G, YE P, *et al.* Experiment on stock culturing, spawning and hatching of *Octopus vulgaris*. *Marine Fisheries*, 2009, 31(1): 58–65 [蔡厚才, 庄定根, 叶鹏, 等. 真蛸亲体培育、产卵及孵化试验. *海洋渔业*, 2009, 31(1): 58–65]
- CAO G L, ZHANG Y Y, XUE R Y, *et al.* Alternative splicing, expression patterns and promoter characters of *vasa*-like gene from the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 5967–5976
- CARUTHERS J M, MCKAY D B. Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(1): 123–133
- CORDIN O, BANROQUES J, TANNER N K, *et al.* The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 2006, 367: 17–37
- DEGHANI M, LASKO P. In vivo mapping of the functional regions of the DEAD-box helicase *Vasa*. *Biology Open*, 2015, 4: 450–462
- FABIOUX C, CORPOREAU C, QUILLIEN V, *et al.* In vivo RNA interference in oyster-*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276(9): 2566–2573
- FABIOUX C, POUVREAU S, ROUX F L. The oyster *vasa*-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897–904
- HAY B, JAN L Y, JAN Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell*, 1988, 55(4): 577–587
- HERPIN A, ROHR S, RIEDEL D, *et al.* Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology*, 2007, 7(1): 3
- HU X. The effect of atrazine on ICR mice's oocyte development ability. Master's Thesis of Shanghai Ocean University of Shandong Normal University, 2015 [胡翔. 阿特拉津对 ICR 小鼠卵母细胞发育潜能的影响. 山东师范大学硕士学位论文, 2015]
- IKENISHI K, TANAKA T S. Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: The presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Development, Growth and Differentiation*, 2000, 42(2): 95–103

- KOBAYASHI T, KAJIURA-KOBAYASHI H, NAGAHAMA Y. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mechanisms of Development*, 2000, 99(1): 139–142
- KOICHIRO T, DANIEL P, NICHOLAS P, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Narnia*, 2011, 28(10): 2731–2739
- KRØVEL A V, OLSEN L C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. *Developmental Biology*, 2004, 271(1): 190–197
- LIN R J, GAO J Z, JIN S R, *et al.* Cloning and expression analysis of *Vasa* gene in *Symphysodon haraldi*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(3): 330–338 [林睿涓, 高建忠, 金仕容, 等. 七彩神仙鱼 *Vasa* 基因 cDNA 的克隆及表达分析. 上海海洋大学学报, 2017, 26(3): 330–338]
- LIU Y, WANG Q H, HUANG R L, *et al.* Cloning and expression analysis of *vasa* gene from *Pinctada fucata martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(7): 2832–2839 [刘雅, 王庆恒, 黄荣莲, 等. 马氏珠母贝 *Pm-vasa* 基因的克隆与表达分析. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(7): 2832–2839]
- NAGASAWA K, TAKEUCHI Y, MIWA M, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like gene in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 2009, 75(1): 71–79
- OLSEN L, AASLAND, RFJOSE A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 1997, 66(1/2): 95–105
- ÖZHAN-KIZIL G, HAVEMANN J, GERBERDING M. Germ cells in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on *Vasa* protein for their maintenance but not for their formation. *Developmental Biology*, 2009, 327(1): 230–239
- RAGHUVEER K, SENTHILKUMARAN B. Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 157(1): 79–85
- REUNOV A A, REUNOVA Y A. In mouse oocytes the mitochondrion-originated germinal body-like structures accumulate mouse *Vasa* homologue (MVH) protein. *Zygote*, 2015, 23(4): 501–506
- ROCAK S, LINDER P. DEAD-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(3): 232–241
- ROGERS G JR, KOMAR A A, MERRICK WC. eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2002, 72: 307–331
- SHAO M Y. CDNA cloning and developmental expression patterns of reproduction-related DEAD-box family and *boule* genes from *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Qingdao Ocean University of China, 2007 [邵明瑜. 栉孔扇贝生殖相关基因 DEAD-box 家族和 *boule* 的 cDNA 克隆及其发育表达图. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007]
- SUI J, ZHANG Z F, SHAO M Y, *et al.* Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in *Apostichopus japonicus* and its expression in tissues. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(3): 407–413 [隋娟, 张志峰, 邵明瑜, 等. 刺参 *vasa*-like 基因克隆及其在组织中的表达分析. 中国水产科学, 2008, 15(3): 407–413]
- TANNER N K, LINDER P. DEXD/H box RNA helicases from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 2001, 8(2): 251–262
- TSUNEKAWA N, NAITO M, SAKAI Y, *et al.* Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000, 127: 2741–2750
- WU H R, CHEN Y T, SU Y H, *et al.* Asymmetric localization of germline markers *Vasa* and *Nanos* during early development in the amphioxus *Branchiostoma floridae*. *Developmental Biology*, 2011, 353(1): 147–159
- WU X, WANG Z, JIANG J, *et al.* Cloning, expression promoter analysis of *vasa* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 41–50
- XIANG F. The expression of zebrafish *vasa* gene and *gcl* gene during oogenesis. Master's Thesis of Wuhan University, 2004 [项方. 斑马鱼 *vasa* 基因和 *gcl* 基因在卵母细胞发生过程中的表达. 武汉大学硕士研究生学位论文, 2004]
- XU H Y, LI M Y, GUI J F, *et al.* Fish germ-cell. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, 40(2): 124–138 [徐红艳, 李名友, 桂建芳, 等. 鱼类生殖细胞. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(2): 124–138]
- XU H, GUI J, HONG Y. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics*, 2005, 233(3): 82–872
- XU L J, ZHANG X, WU S, *et al.* Progress on research of germ-cell transplantation in fish. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(3): 280–286 [许莉佳, 张薪, 伍莎, 等. 鱼类生殖细胞移植的研究进展. 生命科学, 2012, 24(3): 280–286]
- ZAMBONI L, UPADHYAY S. Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *Journal of Experimental Zoology*, 1983, 228(2): 173–193
- ZHENG X D, LIU Z S, ZHAO N, *et al.* Embryonic development and paralarvae growth of *Octopus vulgaris*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(2): 317–323 [郑小东, 刘兆胜, 赵娜, 等. 真蛸 (*Octopus vulgaris*) 胚胎发育及浮游期幼体生长研究. 海洋与湖沼, 2011, 42(2): 317–323]
- ZHOU Q R, SHAO M Y, ZHANG Z F. Structure characterization

and application prospects of *vasa* protein. Transactions of Oceanology and Limnology, 2007(4): 129–134 [周倩如, 邵明瑜, 张志峰. *Vasa* 基因编码蛋白的结构特征和应用展望. 海洋湖沼通报, 2007(4): 129–134]

ZHOU Q R. cDNA cloning and expression analysis of two DEAD-box family genes, *Fc-vasa* and *Fc-PL10a*, from *Fenneropenaeus chinensis*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [周倩如. 中国明对虾

(*Fenneropenaeus chinensis*) 两个 DEAD-box 家族基因 *Fc-vasa* 和 *Fc-PL10* 的克隆和表达分析. 中国海洋大学硕士学位论文, 2007]

ZHU X P, XU H Y, ZHANG P Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *vasa* in Chinese soft-shell turtle oocytes. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 3(2): 306–313 [朱新平, 徐红艳, 张飘逸, 等. 中华鳖 *vasa* 基因克隆及在卵母细胞中的表达分析. 水生生物学报, 2017, 3(2): 306–313]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression of the *vasa* Gene in the *Octopus sinensis*

LIU Yuyan^{1,2}, LI Fenghui², BIAN Li², ZHU Wenjing², CHEN Siqing^{2①}, QU Jiangbo³,
CHANG Qing², LIU Changlin², GE Jianlong²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Tianyuan Aquaculture Co., Ltd of Yantai Economic Development Zone, Yantai, Shandong 264006, China)

Abstract The *vasa* gene is a member of the DEAD-box family of proteins and plays a key role in the formation of germ cells in eukaryotes. In this study, we cloned the full length (2438 bp) of *Octopus sinensis vasa* cDNA (*Os-vasa*) via rapid amplification of cDNA end (RACE) methods. With an open reading frame (ORF) of 2067 bp, encoding 688 amino acids, a 5'UTR of 128 bp, a 3'UTR of 244 bp, and included an A-tail. Based on ExpASy, Signal4.1, TMHMM, and SMART biological analysis, the ORF encoded a putative protein, with a predicted molecular weight of 76 580.53 Da, and the theoretical isoelectric point was 5.89. No signal peptide site was detected, and there was a significant signal in the transmembrane region; therefore, it was presumed to be an intracellular protein, and not a membrane protein. There were two domains, DEXDc and HELICc, and nine conserved motifs of the DEAD-box family, indicating that the cDNA cloned in this study belonged to the family of *vasa*. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression patterns of the *Os-vasa* gene at different stages of the embryo and larva, in the ovaries at two growth stages, and in specific tissues for males and females. The results showed that the *Os-vasa* gene was especially expressed in the gonads, and the expression level in the ovary was significantly higher than that in the testis; *vasa* mRNA was expressed in both immature and mature ovaries, and the transcript level of the immature stage was evidently higher than the mature stage, revealing that the *Os-vasa* gene might play an important role in the development process and the maintenance of ovarian functions. *Os-vasa* gene transcripts were detected at whole embryonic developmental stages, were weakly expressed first 10 days, and gradually increased from the 13th day to the highest level on the 19th day. In the larval stages, *vasa* exhibited the lowest and highest expression on the 8th day post-hatching and the 20th day, respectively. The findings of this study can provide information for the study of primordial germ cell origin and migration and differentiation, and can contribute to the understanding of ovarian development and oogenesis of *O. sinensis*.

Key words *Octopus sinensis*; *vasa*; Gene cloning; Expression analysis

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210206003

http://www.yykxjz.cn/

陈丽梅, 李莉, 石栩蔚, 秦艺铭, 刘利华, 郭永军. 基于转录组数据的毛蚶 SSR 分子标记开发与评价. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 129-137

CHEN L M, LI L, SHI X W, QIN Y M, LIU L H, GUO Y J. Development and evaluation of SSR markers based on transcriptome sequencing in *Scapharca kagoshimensis*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 129-137

基于转录组数据的毛蚶 SSR 分子标记开发与评价*

陈丽梅¹ 李莉² 石栩蔚¹ 秦艺铭¹ 刘利华¹ 郭永军^{1①}

(1. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384;

2. 山东省海洋生物研究院 山东 青岛 266104)



摘要 本研究基于毛蚶(*Scapharca subcrenata*)的转录组数据, 利用 MISA 软件对其中的微卫星位点进行挖掘。从 35 555 条 unigene 中共获得 3987 个 SSR, SSR 出现频率达 11.21%。SSR 重复类型主要以二核苷酸重复为主(58.06%), 其次为三核苷酸重复(19.04%)。共有 182 种重复基元, 不同类型 SSR 的重复基元分布特征不同, 其中, 二核苷酸重复基元中 AC/GT 类型比例最高, 为 45.70%。毛蚶转录组中 SSR 重复次数主要集中在 5~7 次, SSR 长度主要集中在 12~29 bp, 多态性均在中等以上。利用筛选出的 14 对 SSR 引物在山东潍坊毛蚶野生群体中进行遗传多样性分析, 结果显示, 平均有效等位基因数(N_a)、平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)分别为 15.4、0.682、0.852 和 0.817, 从 PIC 值来看, 本研究开发的 14 个微卫星标记均属高多态性标记($PIC \geq 0.5$)。此外, 有 7 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ($P < 0.05$)。结果表明, 基于毛蚶转录组数据开发微卫星标记是切实可行的, 研究结果丰富了毛蚶的分子标记数量, 对毛蚶的种群遗传学分析、遗传图谱构建及分子辅助育种等研究具有重要意义。

关键词 毛蚶; 转录组; SSR; 遗传多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0129-09

毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)俗称毛蛤、麻蛤、麻蚶等(王如才等, 2008), 属广温广盐性经济贝类。毛蚶广泛分布于中国、日本、朝鲜沿岸, 在中国以莱州湾、渤海湾、辽东湾、海州湾等浅海区资源尤为丰富(王庆志等, 2015)。对毛蚶的研究主要集中在形态学(陈蓉等, 2009; 宋菲菲等, 2012)、苗种繁育(翟林香等, 2010; 马云聪等, 2008)及养殖技术(王庆志等, 2015)等, 关于群体遗传学的研究较少(赵文等, 2011;

田吉腾等, 2016)。进入 20 世纪 80 年代, 受生境破坏及过度捕捞等因素的影响, 毛蚶自然资源逐年减少, 产量大幅度下降, 已远远不能满足市场需求, 毛蚶自然种群的遗传评估和资源恢复工作也亟待进行。

微卫星分子标记具有分布范围广、呈共显性遗传、多态性高和重复性好等特点, 在群体遗传多样性分析、种质资源评价、遗传图谱构建等研究中有明显优势(Nikolic *et al*, 2009; Bao *et al*, 2016; Kewwuwan

*财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-48)、山东省现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(SDAIT-14-04)和天津市企业特派员项目(19JCTPJC60100)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48), Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System in Shandong Province (SDAIT-14-04), and Tianjin Technical Expert Project (19JCTPJC60100)]. 陈丽梅, E-mail: chenlimeicc@163.com

① 通讯作者: 郭永军, 研究员, E-mail: guoyongjun@tjau.edu.cn

收稿日期: 2021-02-06, 收修改稿日期: 2021-02-26

et al, 2016)。微卫星的开发方法主要有直接文库筛选法(战爱斌等, 2008)、磁珠富集法(宋丹丹等, 2019)、数据库检索法(魏大为等, 2015)、种间转移扩增法(Liu et al, 2007)等。目前, 毛蚶已开发出部分微卫星标记, 如 Feng 等(2009)利用磁珠富集法筛选了 14 对毛蚶微卫星引物, 陈辰(2015)利用同样的方法获得 41 对多态性较好的微卫星引物。另外, Li 等(2012)通过在魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中构建 cDNA 文库, 得到了 25 条在魁蚶和毛蚶中均通用的 EST-SSR 引物。Dong 等(2012)利用泥蚶(*Tegillarca granosa*)的转录组数据, 开发了 62 个 EST-SSR 引物, 在毛蚶中的通用率为 25.81%。但毛蚶微卫星标记的数量还远不能满足其遗传分析需求, 需要开发更多可利用的微卫星标记。近年来, 利用转录组测序平台开发 SSR 分子标记已经得到越来越多的应用, 其相比于传统方法, 具有通量大、周期短、成本低且直接与某些功能基因相关联的优点(于爱清等, 2019)。

本研究基于毛蚶鳃组织的转录组数据, 对其中的 SSR 位点进行搜索, 分析其分布特征及组成类型; 并利用所筛选的引物在潍坊毛蚶野生群体中进行了遗传多样性分析, 旨在为毛蚶微卫星分子标记的开发提供更为有效的方法, 为毛蚶种群遗传学分析、遗传图谱构建及分子标记辅助育种提供有力工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料及转录组测序

实验所需毛蚶样品于 2017 年 10 月采自天津滨海新区大神堂海域, 壳长为(26.19±1.46) mm, 活体重为(20.01±2.89) g。选取活力好的毛蚶 3 只, 取其鳃组织, 构建高通量转录组测序文库, 并利用 Illumina HiSeq4000 测序平台(杭州联川生物技术股份有限公司)进行测序, 共获得 93.57 Gb 的数据量, 原始测序数据经 Trinity 软件(<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)组装并去除冗余后, 获得了平均长度为 621.23 bp 的 unigene 35 555 条。

1.2 微卫星标记筛选和引物设计

微卫星序列的识别和定位使用 MISA 软件进行, MISA 搜索参数设置如下: 单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的最少重复次数分别为 12、6、5、5、4 和 4, 复合 SSR 两个位点间最大间隔碱基数设置为 100, 结合 Primer 3 软件批量设计引物。主要参数设置: 引物长度为 18~27 bp, PCR 扩增产物在 100~280 bp 之间, 57℃ ≤ 退火温度

(T_m) ≤ 63℃, 20% ≤ GC 含量 ≤ 80%。同时, 利用 NCBI 数据库中的 Primer-BLAST 对结果进行进一步验证, 主要参数设置: Self complementarity < 6, Self 3 complementarity < 3, 且上下游引物 T_m 值差值不高于 2℃。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 微卫星多态性分析

使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)进行毛蚶肌肉组织 DNA 的提取, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成荧光引物, 对毛蚶潍坊群体的 30 个个体进行 STR 检测(3730XL 测序分析仪, 美国 ABI 公司), 利用 GeneMapper 3.2 软件对结果进行基因分型。

等位基因数(N_a)、期望杂合度(H_e)和观测杂合度(H_o)用 Microsatellite Analyser (MSA) 软件计算(Dieringer et al, 2003)。多态信息含量(polymorphism information content, PIC)用 PIC-CALC 0.6 软件计算。利用 Genepop 4.2 软件进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)分析(<http://genepop.curtin.edu.au/>), 并对 P 值进行 Bonferroni 校正。

2 结果与分析

2.1 毛蚶转录组中 SSR 的数量和分布特点

对毛蚶转录组中序列总长度 22 087 807 bp 的 35 555 条 unigene 序列进行 SSR 检测, 共得到 3987 个 SSR (完美型 SSR 为 3074 个), 分布在 3162 条 unigene 序列当中。SSR 发生频率(含 SSR 的 unigene 数/unigene 总数)为 8.89%, SSR 出现频率(检出 SSR 位点数/unigene 总数)为 11.21%, 平均每 5.54 kb 含有 1 个 SSR 位点(总 unigene 长度/搜索到的 SSR 数量)。其中, 612 条 unigene 含有 1 个以上 SSR 位点, 以复合微卫星形式出现的 SSR 数目为 913 个。

2.2 毛蚶转录组中 SSR 的重复基元类型和频率特征

从毛蚶转录组中筛查到的 3987 个 SSR 位点中, 二核苷酸重复 SSR 出现频率最高, 为 2315 个, 占总数的 58.06%; 其次是三核苷酸重复 SSR (759 个, 19.04%)和单核苷酸重复 SSR (696 个, 17.46%); 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复 SSR 所占比例最少, 分别占总数的 4.01%、1.15%和 0.28%。

3987 个 SSR 共有 182 种重复基元类型, 根据碱基互补配对原则和阅读起始碱基顺序的差异(栾生等, 2007), 对每种长度类型的重复基元进行同类兼并后, 单、二、三、四、五、六核苷酸重复基元类型分别为 2、4、10、18、17 和 8 种(表 1)。单核苷

表 1 毛蚶转录组 SSR 主要重复基元类型及分布比例

Tab.1 The type and percentage of main repeat motif of SSR in transcriptome of *S. kagoshimensis*

重复类型 Type of SSR	重复基元 Repeat motif	数量 Number	所占比例 Ratio/%	重复类型 Repeat type	重复基元 Repeat motif	数量 Number	所占比例 Ratio/%
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	582	83.62	三核苷酸 Trinucleotide	AAC/GTT	119	15.68
	C/G	114	16.38		ACC/GGT	54	7.11
二核苷酸 Binucleotide	AC/GT	1058	45.70		AAG/CTT	39	5.14
	AG/CT	766	33.09		AGC/CTG	39	5.14
	AT/AT	480	20.73		AGG/CCT	29	3.82
	CG/CG	11	0.48		ACG/CGT	23	3.03
三核苷酸 Trinucleotide	AAT/ATT	264	34.78		ACT/AGT	12	1.58
	ATC/ATG	171	22.53		CCG/CGG	9	1.19

酸重复中出现最多的基元类型是 A/T, 占单核苷酸重复的比例为 83.62%。二核苷酸重复中出现较多的是 AC/GT 和 AG/CT 类型, 占二核苷酸重复的比例分别为 45.70%和 33.09%, AAT/ATT 基元在三核苷酸重复中出现的频率最高, 占三核苷酸重复的 34.78%。

2.3 毛蚶转录组中 SSR 长度及重复次数分布

本研究中, 毛蚶转录组中 SSR(完美型)长度在 12~84 bp 之间, 其中, 长度在 12~19 bp 之间的 SSR 占比最大, 为 SSR 总数的 61.06%。其次为长度 20~29 bp 的 SSR, 占总数的 22.38%。长度 ≥ 50 bp 的 SSR 仅占总数的 2.64%。SSR 的长度分布规律见图 1。

毛蚶转录组中不同类型 SSR 的重复次数分布见表 2。由表 2 可知, SSR 单核苷酸重复次数主要集中在 12~14 次, 二核苷酸重复次数主要集中在 6~8 次, 三核苷酸和四核苷酸重复次数主要集中在 5~6 次, 五核苷酸和六核苷酸重复次数主要为 4 次。总的来看, 重复 6 次的 SSR 占比最高, 为 778 个(19.51%), 其次为重复 5 次和 7 次, 分别为 488 个(12.24%)和 423 个(10.61%)。重复次数 ≥ 15 次的 SSR 位点共有 803 个, 占总 SSR 个数的 20.14%。

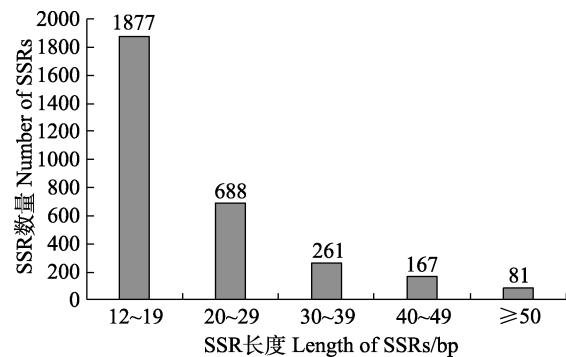


图 1 毛蚶转录组中的 SSR 长度分布
Fig.1 Length distribution of SSRs in transcriptome of *S. kagoshimensis*

2.4 毛蚶 SSR 引物设计及群体遗传多样性分析

除部分微卫星序列侧翼序列过短或者本身结构不适合设计引物以外, 使用 Primer 3 软件对其中含有 SSR 的 3162 条序列进行引物设计, 最后从 60 对引物中筛选出扩增稳定、多态性较高的 14 对引物(表 3)。利用这 14 对引物对毛蚶潍坊野生群体的 30 个个体进行遗传多样性分析。等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)和哈迪-温伯格平衡检验(P_{HWE})等参数详见表 4。

表 2 毛蚶转录组中不同类型 SSR 重复次数分布

Tab.2 Repeat number of SSR in transcriptome of *S. kagoshimensis*

重复类型 Type of SSR	重复次数 Repeat number											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15
单核苷酸 Mononucleotide	-	-	-	-	-	-	-	-	189	105	114	288
二核苷酸 Binucleotide	-	-	591	337	233	132	109	176	126	63	59	489
三核苷酸 Trinucleotide	-	411	147	78	47	14	8	12	8	9	4	21
四核苷酸 Tetranucleotide	-	72	38	8	11	6	3	5	5	3	4	5
五核苷酸 Pentanucleotide	34	5	2	-	3	-	1	-	1	-	-	0
六核苷酸 Hexanucleotide	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
总和 Total	45	488	778	423	294	152	121	193	329	180	181	803

表3 毛蚶14对SSR引物信息
Tab.3 Information of SSR primers in *S. kagoshimensis*

位点 Locus	重复基元 Repeat motif	引物序列 Primer sequences (5'~3')	产物平均长度 Mean product size /bp	退火温度 T_m / $^{\circ}$ C
MH09	(AT) ₇	F: ATTCGGCACACTTTTGAGGT R: CCAATTTGGCAAGTGCTTTT	174	60
MH17	(TGA) ₆	F: ACAATGCCAAGGAAGAATCG R: CGGCTCATCAGCATACTCAA	272	60
BE02	(GA) ₁₂	F: CGTCTTTTTGTGAAGATCCTTG R: ACGAAAATCCAAAAGAGCGA	258	56
BE04	(ATA) ₇	F: TTGCCGAGAAGGTTTGTTTT R: GCCCTACCTTGAGTCGTAA	213	58
BE10	(GGA) ₆	F: TGTAGTGCAAGGTGGAGCTG R: TGTCCAGTGCCATATCCAGA	254	61
BE16	(GT) ₁₂	F: GGTACAGTGTGGGCCAAAAG R: GAGTGGGGATGTTGGAGTGA	286	59
BE18	(TTC) ₆	F: CACGCTGTTTTCACCTTTTG R: GAATCTGTCAATCGGTCGGT	267	61
RC02	(AC) ₁₂	F: GGTAAATGACGCACACATGC R: CTTTCAATGACCACTGGCAA	232	57
RC06	(TG) ₁₂	F: TTGCTGCCAGTGTGTGTGTA R: ACCAGTGAAAACCACCAAGC	247	60
RC15	(TAT) ₇	F: AACACAATGCCCTACTTGGC R: AACACCCAACAAACCTCAGAA	194	60
RC20	(AG) ₁₂	F: TGGTGACTGCTTACTTGGGA R: AGCGAAACGCTAAAAGCAAA	274	58
KT05	(AC) ₁₂	F: TTTATATGTGGCGGTCAGCA R: GATGGGCTATCCAGATGTCCT	159	60
KT09	(CAA) ₆	F: TGCGTCAACAACAAAAGGAG R: GGTACATTTCCAGCATCCG	164	60
KT10	(TGA) ₆	F: CAGTACCAAAGACGGCCATT R: TGAGGTACTIONTGGTTGGTCCAG	237	60

表4 基于14个SSR位点的潍坊毛蚶群体遗传多样性分析
Tab.4 Genetic diversity of Weifang population in *S. kagoshimensis* at 14 SSR loci

微卫星位点 Locus	重复基元 Repeat motif	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	哈-温平衡检验 P_{HWE}
MH09	(AT) ₇	11	0.967	0.805	0.767	0.019 1
MH17	(TGA) ₆	6	0.533	0.771	0.719	0.009 9
BE02	(GA) ₁₂	19	0.933	0.942	0.921	0.294 7
BE04	(ATA) ₇	19	0.567	0.869	0.843	0.000 0*
BE10	(GGA) ₆	9	0.500	0.780	0.735	0.000 0*
BE16	(GT) ₁₂	25	0.759	0.962	0.943	0.000 0*
BE18	(TTC) ₆	23	0.733	0.953	0.933	0.003 2*
RC02	(AC) ₁₂	26	0.793	0.953	0.933	0.010 0
RC06	(TG) ₁₂	17	0.577	0.930	0.905	0.000 0*
RC15	(TAT) ₇	4	0.567	0.623	0.549	0.249 8
RC20	(AG) ₁₂	19	0.900	0.938	0.917	0.287 1
KT05	(AC) ₁₂	21	0.733	0.925	0.904	0.000 0*
KT09	(CAA) ₆	8	0.600	0.669	0.600	0.129 0
KT10	(TGA) ₆	9	0.379	0.802	0.769	0.000 0*
平均 Mean		15.4	0.682	0.852	0.817	-

*表示 Bonferroni 校正后显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)

* means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction ($P<0.05$)

14 个微卫星位点总共检测到 216 个等位基因, 每个位点的等位基因个数从 4 个到 26 个不等, 平均等位基因数为 15.4 个。 H_o 为 0.379~0.967, 平均值为 0.682; H_e 为 0.623~0.962, 平均值为 0.852, PIC 为 0.817。经 Bonferroni 校正后发现, 14 个位点中有 7 个偏离哈迪-温伯格平衡。

3 讨论

3.1 毛蚶转录组 SSR 类型和分布规律

近年来, 越来越多的贝类中报道了利用转录组数据开发微卫星的方法, 在墨西哥湾扇贝 (*Argopecten irradians concentricus*) 的转录组测序数据中, SSR 的出现频率为 10% (谭杰等, 2018), 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 的 SSR 出现频率为 13.34% (王忠良等, 2015), 泥东风螺 (*Babylonia lutosus*) 的 SSR 出现频率为 13.62% (熊钢等, 2020)。本研究中, 毛蚶转录组中 SSR 的出现频率为 11.21%, 和上述报道相似, 但低于扁玉螺 (*Neverita didyma*) 的 86.53% (卢玮筱等, 2018)。在其他水生动物中, 转录组中 SSR 出现频率差异较大, 如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 为 43.24% (李超等, 2015), 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 为 11.30% (黄勇等, 2019), 金乌贼 (*Sepia esculenta*) 为 90.66% (张金勇等, 2020), 曼氏针乌贼 (*Sepiella japonica*) 为 48.70% (管奥等, 2018), 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为 22.1% (杨铭等, 2017)。在 SSR 检索标准一致的情况下, SSR 出现频率主要与物种差异、转录组结构及测序数据大小有关。

除单核苷酸重复外, 大多数贝类如墨西哥湾扇贝、马氏珠母贝、泥东风螺及菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) (谭杰等, 2018; 王忠良等, 2015; 熊钢等, 2020; 闫路路, 2015) 等转录组中 SSR 均以二核苷酸重复为主, 本研究中毛蚶转录组中 SSR 也以二核苷酸重复为主, 和上述研究结论一致。多数鱼类, 如牙鲆、刀鲚 (*Coilia ectenes*)、密斑刺鲀 (*Diodon hystrix*) (李超等, 2015; 于爱清等, 2019; 马军等, 2020) 以及虾类, 如凡纳滨对虾、红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) (杨铭等, 2017; 李喜莲等, 2020) 等, 转录组中的 SSR 类型分布也符合这一规律。

本研究中二核苷酸重复基元类型以 AC/GT 最多, 占二核苷酸重复的 45.70%, 这与合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)、泥东风螺的研究结果一致 (曲妮妮, 2008; 熊钢等, 2020)。目前, 大多数鱼类的研究结果也验证了这一结论, 如牙鲆、刀鲚、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和鲢鱼 (*Miichthys miiuy*)

转录组中的二核苷酸重复类型中, AC/GT 重复基元分别占 75.25%、71.89%、65.39% 和 68.2% (李超等, 2015; 于爱清等, 2019; 曾聪等, 2013; 车荣波等, 2015)。Toth 等 (2000) 对多个真核生物基因组的研究结果表明, 脊椎动物和节肢动物基因组中二核苷酸的类型多以 AC/GT 为主。与上述研究不同, 战爱斌等 (2008) 和李宏俊等 (2009) 通过富集文库法得到的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 和海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 基因组中 AG/CT 重复基元的比例远高于 AC/GT。不同贝类中重复单元类型占比不同的现象, 除了 SSR 筛选方法不同外, 还可能与不同编码基因的碱基组成偏好及体内甲基化酶活性有关 (曾聪等, 2013)。

3.2 毛蚶转录组 SSR 的长度和重复次数

SSR 标记多态性的高低是判断其物种可用性的重要依据。根据 Temnykh 等 (2001) 的研究, SSR 的长度大小是影响其多态性高低的关键因素, 当 SSR 长度 ≥ 20 bp 时, 呈高度多态性, $12 \text{ bp} \leq \text{长度} \leq 20$ bp 时, 呈中等多态性; 前者更容易发生变异, 原因是在较长的模板上滑动错配发生的几率更高 (毛俐慧等, 2018)。本研究在设置筛选参数时, 已剔除了长度在 12 bp 以下的 SSR 序列, 12~19 bp 和长度 ≥ 20 bp 的序列分别占 SSR 总数的 66.23% 和 33.77%, 在此基础上设计引物, 保证了引物具有较高的多态性。

本研究筛选出的 14 对多态性较好的 SSR 引物中, 二核苷酸重复主要为 6 次, 三核苷酸重复主要为 7 次, 随着重复次数的增加, 各类型 SSR 的数量均逐渐降低。重复次数范围和 SSR 数量变化规律和大多数同类研究一致。相比之下, 陈辰 (2015) 和 Feng 等 (2009) 用磁珠富集方法开发的毛蚶 SSR 中, 高重复序列所占比例较大, 其二核苷酸重复次数一般集中在 13~27 次。造成这种差异的原因, 一方面是由于转录组中开发的 SSR 重复次数往往要低于基因组中的 SSR (Xia *et al*, 2018), 另一方面是磁珠富集的杂交洗脱等程序能够将大部分低重复序列除去 (孙效文等, 2005)。Schlötterer 等 (2000) 认为, 重复次数与 SSR 位点突变率存在一定程度正相关。虽然本研究从转录组中开发的 SSR 重复次数相对较低, 但从毛蚶群体遗传学分析的结果来看, 依然显示了较高的多态性。

3.3 潍坊毛蚶群体遗传多样性分析

本研究对基于转录组数据得到的微卫星引物进行筛选, 并在潍坊毛蚶野生群体中进行了遗传多样性分析, 其平均等位基因数 (N_a)、观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 15.4、0.682 和 0.852, 与陈辰 (2015)

(N_a : 15.2; H_o : 0.719; H_e : 0.856)的研究结果类似, 相比 Feng 等(2009)(N_a : 21.64; H_o : 0.798; H_e : 0.931)多态性略低。14 个微卫星位点的 PIC 值范围为 0.549~0.943, 平均值为 0.817。根据 Botstein 等(1980)的标准, $PIC \geq 0.5$ 、 $0.25 \leq PIC < 0.5$ 和 $PIC < 0.25$ 分别代表高度多态性、中度多态性和低度多态性。从结果来看, 本研究开发的 14 个微卫星标记均属高多态性, 能够提供丰富的遗传信息, 在毛蚶种群遗传学研究、遗传图谱构建及家系分析鉴定中具有较高的实用性。另外, 本研究采集的样本为山东潍坊野生群体, 也说明目前群体依然保持着较高的遗传多样性。

经 Bonferroni 校正后发现, 14 个微卫星位点中有 7 个显著偏离哈迪-温伯格平衡($P < 0.05$), 微卫星位点偏离哈迪-温伯格平衡的现象在相关报道中并不少见, 如在菲律宾蛤仔(闫路路, 2015)、青蛤(方军等, 2020)、里式拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)(吴欣等, 2016)和熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)(黄飘逸等, 2020)的群体遗传学研究中, 微卫星位点偏离哈迪-温伯格的比例分别为 75%、70.37%、35.71%和 20%。一般来说, 群体偏离平衡的原因主要是近交或存在无效等位基因而导致的纯合子过剩或取样样本量过小。其中, 微卫星标记中存在无效等位基因是一个较为普遍的现象, 尤其是在海洋贝类中(Reece *et al.*, 2004)。本研究采集的群体为野生群体, 从平均等位基因数、杂合度等遗传参数来看, 均体现出较高的多态性, 故推测微卫星中无效等位基因的存在或样本量较小是造成偏离哈迪-温伯格平衡的主要原因。

本研究结果表明, 利用高通量转录组测序筛选毛蚶微卫星是一种高效可行的方法。研究结果增加了毛蚶的可用微卫星标记, 对毛蚶的种群遗传学分析、遗传图谱构建及分子标记辅助育种都具有重要的意义。

参 考 文 献

- BAO M M, ZHOU Q, XIE C X, *et al.* Ten polymorphic microsatellite markers characterized for *Schizothorax pseudaksaiensis* and applied for population genetic analysis. *Journal of Genetics*, 2016, 95: e5-e8
- BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331
- CHE R B. Development of molecule markers and gene differential expression analysis of *Miichthys miui* based on transcriptome sequencing data. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2015 [车荣波. 基于转录组数据的鲈鱼分子标记筛选及基因差异表达分析. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2015]
- CHEN C. Population genetics of the ark shell. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [陈辰. 毛蚶群体遗传学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- CHEN R, LIU J Y, TANG L J, *et al.* Morphological variations analysis of five different populations of *Scapharca subcrenata* in China. *Marine Sciences*, 2009, 33(7): 64-69 [陈蓉, 刘建勇, 唐连俊, 等. 中国 5 个海区不同群体毛蚶形态差异分析. *海洋科学*, 2009, 33(7): 64-69]
- DIERINGER D, SCHLÖTTERER C. Microsatellite analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite datasets. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 167-169
- DONG Y H, YAO H H, LIN Z H, *et al.* Characterization of 62 polymorphic EST-SSR markers in the blood clam (*Tegillarca ganosa*) and their cross-amplification in *Scapharca subcrenata*. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(4): 991-997
- FANG J, SHEN Y P, ZHANG L L, *et al.* Development and verification of SSR markers in *Cyclina sinensis*. *Journal of Applied Oceanography*, 2020, 39(2): 214-220 [方军, 沈彦鹏, 张雷雷, 等. 基于转录组数据的青蛤微卫星标记开发与验证. *应用海洋学学报*, 2020, 39(2): 214-220]
- FENG Y W, LI Q, KONG L F. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the ark shell *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae). *Conservation Genetics*, 2009, 10: 1125-1127
- GUAN A, WU Y T, CHEN Y, *et al.* Deep sequence-based transcriptome analysis of microsatellites in the cuttlefish (*Sepiella japonica*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 144-151 [管奥, 毋玉婷, 陈宇, 等. 曼氏无针乌贼转录组微卫星特征分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 144-151]
- HUANG P Y, MAO H T, YU Z N, *et al.* Evaluation of genetic diversity and versatility of wild and cultured populations based on high-throughput sequencing of *Crassostrea sikamea* microsatellite markers. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 368-377 [黄飘逸, 马海涛, 喻子牛, 等. 利用高通量测序开发的熊本牡蛎微卫星标记评价野生和养殖群体的遗传多样性及通用性. *水产学报*, 2020, 44(3): 368-377]
- HUANG Y, GONG W B, CHEN H G, *et al.* Sequencing and bioinformatic analysis for transcriptome of *Micropterus salmoides* based on RNA-seq. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(1): 106-112 [黄勇, 龚望宝, 陈海刚, 等. 基于 RNA-Seq 高通量测序技术的大口黑鲈转录组分析. *南方水产科学*, 2019, 15(1): 106-112]
- KEWWUWAN K, KUBOTA S, LIU Q, *et al.* Detection of growth-related quantitative trait loci and high-resolution

- genetic linkage maps using simple sequence repeat markers in the kelp grouper (*Epinephelus bruneus*). *Marine Biotechnology*, 2016, 18(1): 57–84
- LI C, HOU J L, WANG G X, *et al.* Bioinformatic analysis of SSR markers in transcriptomic sequencing *Paralichthys olivaceus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 122–127 [李超, 侯吉伦, 王桂兴, 等. 基于牙鲆 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息分析. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 122–127]
- LI H J, LIU X, DU X D, *et al.* Development of microsatellite markers in bay scallop and their inheritance patterns in an F₁ hybrid family. *Marine Sciences*, 2009, 33(12): 4–8 [李宏俊, 刘晓, 杜雪地, 等. 海湾扇贝微卫星标记开发及其分离方式分析. *海洋科学*, 2009, 33(12): 4–8]
- LI M, ZHU L, ZHOU C Y, *et al.* Development and characterization of EST-SSR markers from *Scapharca broughtonii* and their transferability in *Scapharca subcrenata* and *Tegillarca granosa*. *Molecules*, 2012, 17(9): 10716–10723
- LI X L, GUO J L, LI Q, *et al.* The information analysis of SSR loci in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) transcriptome. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59(7): 207–211 [李喜莲, 郭建林, 李倩, 等. 红螯螯虾转录组中的 SSR 位点信息分析. *湖北农业科学*, 2020, 59(7): 207–211]
- LIU B Q, ZENG Q G, WANG Y J, *et al.* The cross-species amplification and validation of EST-SSR loci in *Porphyra haitanensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(2): 149–154
- LU W X, CHEN Y X, QI P Z. Analysis of SSR Information in the transcriptional group of *Neverita didyma*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, 37(3): 215–220 [卢玮筱, 陈永霞, 祁鹏志. 扁玉螺转录组 SSR 信息分析. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(3): 215–220]
- LUAN S, KONG J, WANG Q Y, *et al.* Analysis of microsatellites in the genome of Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Progress in Natural Science*, 2007, 17(6): 731–740 [栾生, 孔杰, 王清印, 等. 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) 基因组微卫星特征分析. *自然科学进展*, 2007, 17(6): 731–740]
- MA J, LIU J X, JIANG Z J, *et al.* Development and identification of SSR markers based on RNA-seq data of *Diodon hystrix*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(1): 127–136 [马军, 刘嘉鑫, 江智景, 等. 基于 RNA-seq 数据的密斑刺鲀 SSR 分子标记开发与鉴定. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 127–136]
- MA Y C, YAN S H, SU W Q, *et al.* Practical techniques of breeding and culture of *Scapharca subcrenata*. Beijing: China Ocean Press, 2008 [马云聪, 闫升华, 苏文清, 等. 毛蚶育苗和养殖实用技术. 北京: 海洋出版社, 2008]
- MAO L H, LIU J X, DING H Q, *et al.* Microsatellite characterization analysis and primers design of the whole transcriptome of *Curcuma alismatifolia*. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(22): 7407–7414 [毛俐慧, 刘建新, 丁华桥, 等. 姜荷花全长转录组微卫星特征分析和引物设计. *分子植物育种*, 2018, 16(22): 7407–7414]
- NIKOLIC N, FEVE K, CHEVALET C, *et al.* A set of 37 microsatellite DNA markers for genetic diversity and structure analysis of Atlantic salmon *Salmo salar* populations. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 458–466
- QU N N. Microsatellite DNA isolation and genetic diversity of the pearl oyster *Pinctada fucata*. Master's thesis of Huazhong Agricultural University, 2008 [曲妮妮. 合浦珠母贝微卫星 DNA 标记分离与遗传多样性研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2008]
- REECE K S, RIBEIRO W L, GAFFNEY P M, *et al.* Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity*, 2004, 95(4): 346–352
- SCHLÖTTERER C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 2000, 109(6): 365–371
- SONG D D, WANG L, WEI H J, *et al.* Construction and polymorphism analysis of a microsatellite library in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 819–826 [宋丹丹, 王龙, 魏红静, 等. 克氏原螯虾微卫星文库构建及多态性分析. *水产科学*, 2019, 38(6): 819–826]
- SONG F F, WANG Q X, LIU M, *et al.* Morphological variation analysis of *Scapharca subcrenata* in China. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2012, 42(11): 40–45 [宋菲菲, 王其翔, 刘名, 等. 不同地区毛蚶群体的形态差异的比较研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2012, 42(11): 40–45]
- SUN X W, JIA Z Y, WEI D W, *et al.* Comparison between magnetic beads enriched and small inserted fragment library for microsatellite sequences of common carp. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(2): 126–132 [孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 126–132]
- TAN J, YAO G Y, LIU Z G, *et al.* SSR information analysis and unigene functional annotation of transcriptome from *Argopecten irradians* “Bohaihong” and *Argopecten irradians concentricus*. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(12): 5242–5250 [谭杰, 姚高友, 刘志刚, 等. 扇贝“渤海红”与墨西哥湾扇贝转录组 SSR 信息分析及 unigene 功能注释. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(12): 5242–5250]
- TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1441–1452
- TIAN J T, HOU Y, LIU Z H, *et al.* Genetic diversity of different

- populations of *Scapharca subcrenata* based on mitochondrial CO I gene. *Marine Sciences*, 2016, 40(1): 1-9 [田吉腾, 侯丫, 刘志鸿, 等. 基于线粒体 COI 基因的毛蚶群体遗传多样性. *海洋科学*, 2016, 40(1): 1-9]
- TOTH G, GASPARI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967-981
- WANG R C, WANG Z P. Science of marine shellfish culture. Qingdao: China Ocean University Press, 2008 [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008]
- WANG Q Z, ZHANG M, TENG W M, *et al.* A review: Research progress of biology in ark shell *Scapharca subcrenata* insight from aquaculture. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(4): 437-443 [王庆志, 张明, 滕炜鸣, 等. 毛蚶养殖生物学研究进展. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(4): 437-443]
- WANG Z L, DING Y, XU Y H, *et al.* Polymorphism of EST-SSRs from *Pinctada martensii* based on transcriptome datasets. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 687-693 [王忠良, 丁燊, 许尤厚, 等. 基于转录组数据的马氏珠母贝 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 687-693]
- WEI D W, LIAN Z Q, WU X D, *et al.* Preliminary screening of *silurus lanzhouensis* EST-SSR markers based on Clariidae and Siluridae ESTs. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(5): 19-23 [魏大为, 连总强, 吴旭东, 等. 基于胡鲇科和鲇科 ESTs 序列初步筛选兰州鲇 EST-SSR 分子标记. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 19-23]
- WU X. Development of SSR and SNP for Onchidiidae based on transcriptome sequencing. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [吴欣. 基于转录组测序的石磺科贝类 SSR 和 SNP 两种分子标记的开发. 上海海洋大学硕士学位论文, 2016]
- XIA Y, LUO W, YUAN S Q, *et al.* Microsatellite development from genome skimming and transcriptome sequencing: Comparison of strategies and lessons from frog species. *BMC Genomics*, 2018, 19: 886
- XIONG G, WANG X Q, WANG P, *et al.* Development and genetic diversity analysis of *Babylonia lutosus* with EST-SSR markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 117-124 [熊钢, 王晓清, 王佩, 等. 泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 117-124]
- YAN L L, QIN Y J, YAN X W, *et al.* Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1573-1580 [闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. *生态学报*, 2015, 35(5): 1573-1580]
- YANG M, YU Y, ZHANG X J, *et al.* Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*). *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 96-102 [杨铭, 于洋, 张晓军, 等. 基于转录组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发. *海洋科学*, 2017, 41(2): 96-102]
- YU A Q, SHI Y H, XU J B, *et al.* Characteristic analysis of microsatellites in selected *Coilia ectenes* using a transcriptome dataset. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 101-109 [于爱清, 施永海, 徐嘉波, 等. 长江刀鲚选育群体转录组 EST-SSR 的分布特征分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 101-109]
- ZENG C, GAO Z X, LUO W, *et al.* Characteristics of microsatellites in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) EST sequences using 454 FLX. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 982-988 [曾聪, 高泽霞, 罗伟, 等. 基于 454 GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中微卫星特征分析. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 982-988]
- ZHAI L X, MAO H Q. Biological characteristics and artificial breeding techniques of *Scapharca subcrenata*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2010(4): 345-346 [翟林香, 毛红茜. 毛蚶的生物学特性及人工育苗技术. *现代农业科技*, 2010(4): 345-346]
- ZHAN A B, HU J J, HU X L, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers for Zhikong scallop by screening SSR-enriched library. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 353-361 [战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记. *水产学报*, 2008, 32(3): 353-361]
- ZHANG J Y, HE M C, XIANG Z L, *et al.* Microsatellite screening and characterization analysis of *Sepia esculenta* based on full-length transcriptome sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 149-155 [张金勇, 何暮春, 项子龙, 等. 基于全长转录组测序的金乌贼微卫星位点筛选与特征分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 149-155]
- ZHAO W, ZHANG L, BI J H. ISSR analyses of genetic diversity within and among five stocks of *Scapharca subcrenata* along Liaoning coast. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(6): 854-862 [赵文, 张雷, 毕进红. 辽宁沿海 5 个毛蚶群体遗传多样性的 ISSR 分析. *水产学报*, 2011, 35(6): 854-862]

Development and Evaluation of SSR Markers Based on Transcriptome Sequencing in *Scapharca kagoshimensis*

CHEN Limei¹, LI Li², SHI Xuwei¹, QIN Yiming¹, LIU Lihua¹, GUO Yongjun¹①

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fishery Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104, China)

Abstract *Scapharca kagoshimensis* is a marine shellfish of great economic value. In recent decades, populations of *S. kagoshimensis* have declined due to environmental destruction and overfishing. To enhance our understanding of the genetic diversity and population-level genetic structure of *S. kagoshimensis*, microsatellite loci were detected based on the transcriptome data of *S. kagoshimensis* using MISA software. A total of 3987 Single Sequence Repeats (SSRs) were identified from 35,555 unigenes and the frequency of their occurrence was 11.21%. The main types of repeats were dinucleotides and trinucleotides, which accounted for 58.06% and 19.04%, respectively. A total of 182 types of repeat motifs were classified in all SSRs, and AC/GT was the most abundant among dinucleotide repeats (45.70%). The repeat numbers of SSRs primarily ranged between five and seven, and the number of SSRs gradually decreased as repeat number increased. Motif length was predominantly between 12 and 29 bp, and the SSR polymorphism level was above moderate. Among the 60 designed primer pairs, 14 pairs proved to be polymorphic microsatellite markers and were amplified in 30 wild individuals sampled from Weifang in Shandong Province. The results showed that the average number of alleles (N_a), average observed heterozygosity (H_o), average expected heterozygosity (H_e), and polymorphism information content (PIC) were 15.4, 0.682, 0.852, and 0.817, respectively. All 14 loci were highly polymorphic (PIC ≥ 0.5). After Bonferroni correction, seven of the 14 loci deviated significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). These results indicate that it is feasible to develop microsatellite markers based on the *S. kagoshimensis* transcriptome. The polymorphic microsatellite loci obtained in this study will facilitate further studies on population genetic management, genetic mapping, and molecular assisted breeding of *S. kagoshimensis*.

Key words *Scapharca kagoshimensis*; Transcriptome; SSR; Genetic diversity

① Corresponding author: GUO Yongjun, E-mail: guoyongjun@tjau.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210315001

http://www.ykxjz.cn/

赵丹, 周丽青, 郑言鑫, 孙秀俊, 吴彪, 刘志鸿, 吴宙, 吴磊. *Foxl2* 基因在虾夷扇贝发育过程中的表达模式分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 138–145

ZHAO D, ZHOU L Q, ZHENG Y X, SUN X J, WU B, LIU Z H, WU Z, WU L. Expression pattern of the *Foxl2* gene in the scallop *Patinopecten yessoensis* during development. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 138–145

Foxl2 基因在虾夷扇贝发育过程中的表达模式分析*

赵丹^{1,2} 周丽青^{1,2①} 郑言鑫⁵ 孙秀俊² 吴彪²
刘志鸿² 吴宙^{2,3} 吴磊^{2,4}



(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. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022;

4. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 江苏 连云港 222005;

5. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 山东 烟台 265800)

摘要 *Foxl2* 是叉头状转录因子(forkhead transcription factor, *Fox*)基因家族的重要成员之一, 在卵巢发育和性别调控中发挥着重要作用。为探究 *Foxl2* 在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性腺发育中的表达调控模式, 利用生物信息学方法分析了虾夷扇贝 *Foxl2* 的序列特征; 采用半定量 PCR(RT-PCR)检测了 *Foxl2* 在不同组织中的表达差异。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和原位杂交技术(ISH)揭示了 *Foxl2* 在性腺发育 4 个时期(增殖期、生长期、成熟期和排放期)的时空表达变化。结果显示, 虾夷扇贝 *Foxl2* 序列包含 *Fox* 基因家族共有的 FH 结构域; 多重序列比较分析显示, 虾夷扇贝与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)的相似性最高, 分别为 98%、96%。系统进化树分析显示, 在不同物种以及进化的过程中, *Foxl2* 基因具有较高的保守性。定量分析和原位杂交结果显示, 原位杂交阳性信号主要定位在生殖细胞的细胞质中。在虾夷扇贝的鳃、肾、肝胰腺、精巢中, 都可检测到少量 *Foxl2* 转录本的存在, 在卵巢中表达量最高, 且在卵巢成熟期达到最高值。随着性腺发育和精细胞的逐级分化, *Foxl2* 的表达量呈下降趋势, 这与原位杂交的结果一致。研究表明, *Foxl2* 在虾夷扇贝卵巢发育中可能发挥重要作用, 推测其是雌性虾夷扇贝性腺发育调控中的关键基因, 可为今后阐明其在虾夷扇贝性别分化进程中的功能提供理论依据。

关键词 虾夷扇贝; *Foxl2*; 荧光定量 PCR; 原位杂交; 性腺发育

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0138-08

Foxl2 是叉头状转录因子(forkhead transcription factor, *Fox*)超家族的成员之一, 主要在垂体和卵巢中表达, 通过转录调节其目的靶基因的转录、蛋白表达, 参与生殖细胞的增殖与分化, 在动物卵巢发育和维持

* 国家自然科学基金项目(31672637)、浙江重中之重开放课题(KF2018008)和国家重点研发计划(2018YFD0900800)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672637), Zhejiang Provincial Top Discipline of Bioengineering of China (KF2018008), and National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900800)]. 赵丹, E-mail: 1282095341@qq.com

① 通讯作者: 周丽青, 副研究员, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-15, 收修改稿日期: 2021-04-15

中发挥重要作用(Uhlenhaut *et al.*, 2011), 与卵巢生殖细胞分化和卵巢功能的维持密切相关(Ellsworth *et al.*, 2006; Boulanger *et al.*, 2014)。

迄今为止, *Foxl2* 基因功能的深入研究集中在脊椎动物和部分无脊椎动物, 且结构高度保守。*Foxl2* 是脊椎动物卵巢分化的特异性标志物(Alam *et al.*, 2008)。据报道, *Foxl2* 在蛙(*Rana rugosa*)卵巢分化的早期起关键作用(Oshima *et al.*, 2008); 是山羊(*Capra hircus*)雌性性别决定因子(Boulanger *et al.*, 2014); *Foxl2* 的失活会导致小鼠(*Mus musculus*)卵巢发育异常(Escalier *et al.*, 2002); 同时, 敲除 *Foxl2* 和 *WNT4* 会导致小鼠表现出由雌性逆转为雄性的特征(Ottolenghi *et al.*, 2008)。*Foxl2* 在雄性鸡(*Gus gallus*)胚性腺中的错误表达抑制了睾丸发育途径(Major *et al.*, 2019)。以上研究表明, *Foxl2* 在脊椎动物卵巢中特异性表达, 对卵巢的发育起着重要作用。相对于脊椎动物, *Foxl2* 基因在无脊椎动物的研究较少。研究发现, *Foxl2* 主要在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的性腺和唇瓣中表达, 其中, 处于生长期卵巢的表达量是精巢的8倍(刘晓玲, 2012; Naimi *et al.*, 2009)。在三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)中, *Foxl2* 主要表达于颗粒细胞中, 与哺乳动物相似(叶容晖等, 2018)。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)因其多样的性别表现形式被认为是确定动物性别分化相关基因的最佳研究对象。虾夷扇贝隶属于瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、扇贝科(Pectinidae), 是我国北方重要的养殖经济物种。已有相关研究表明, *Foxl2* 在扇贝雌性性腺中含量丰富(Li *et al.*, 2018), 可能是扇贝性别决定和分化的关键候选基因(Li *et al.*, 2016)。但对于虾夷扇贝 *Foxl2* 基因在性腺发育中的时空表达模式尚未见有详细的报道。为进一步了解 *Foxl2* 在虾夷扇贝性腺发育不同时期中的表达特征, 本研究克隆了虾夷扇贝 *Foxl2* cDNA 编码区序列, 进行生物信息学分析, 并观察其组织表达规律, 旨在为 *Foxl2* 在虾夷扇贝性腺发育过程中的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用贝为2龄虾夷扇贝, 购自山东烟台长岛生鲜市场, 性腺生殖周期包含增长期、生长期、成熟期和排放期共4个时期, 体重为(73.34±20.50) g。选取正常进食、排便的个体, 取扇贝部分性腺组织用于RNA提取和组织分布检测, 部分性腺组织浸入原位

杂交固定液(Servicebio, 中国)中。组织切片法结合性腺组织涂片法鉴定性别。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

取大约50 mg冷冻的性腺组织, 在研钵中用液氮充分研磨。采用Trizol法提取虾夷扇贝性腺总RNA, 通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific, 美国)检测其纯度与浓度, 选取OD_{260 nm/280 nm}值在1.90~2.2范围、RNA浓度>1000 ng/μL的样本进行反转录。RNA鉴定合格后, 采用HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme, 中国)并参照说明书合成cDNA。-20℃保存。

1.3 *Foxl2* 基因的生物学分析

虾夷扇贝转录组数据分析获得的基因编码序列与NCBI数据库比对, 结果显示, 与虾夷扇贝的 *Foxl2* (登录号: XM_021497746)完全吻合, 命名为 *PyFoxl2*。

采用ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)确定 *PyFoxl2* 的开放阅读框。在线分析软件SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)预测结构和功能域。使用Signal P 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测 *PyFoxl2* 蛋白的信号肽, 并使用TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜区域。使用BLAST程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *PyFoxl2* 进行碱基同源分析, 并进行蛋白质序列相似性搜索。使用swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三级结构。通过Jalview比对来自不同物种 *Foxl2* 的序列, 并使用MEGA 7.0软件的Neighbor-Joining(NJ)方法构建 *PyFoxl2* 系统发育树。

1.4 半定量RT-PCR

根据所获得的 *PyFoxl2* mRNA 转录本序列, 设计半定量RT-PCR引物 *Foxl2*-F 和 *Foxl2*-R (表1)。以虾夷扇贝生长期的cDNA为模板, 使用2×*Taq* Master Mix for PAGE试剂盒(Vazyme, 中国)对目的基因进行PCR扩增。反应条件: 95℃ 3 min (预变性); 95℃ 15 s, 60℃ 15 s (退火), 循环35次; 72℃ 5 min (彻底延伸)。扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因。

1.5 荧光定量

根据开放阅读框ORF (open reading frame)设计 *PyFoxl2* 定量qRT-PCR引物: *QFoxl2*-F 和 *QFoxl2*-R。使用 β -actin 基因(鲍相渤等, 2011)作为内参基因校正cDNA模板(表1)。

表1 本实验所用引物
Tab.1 Primers used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
Foxl2-F	CGATGCTCCATTGGAAGAGT	RT-PCR
Foxl2-R	AAGTAGTCGTGGCGATCAGG	RT-PCR
β -actin-F	AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	RT-PCR and qRT-PCR
β -actin-R	CCAGTGATGAGGAGGAAGCAG	RT-PCR and qRT-PCR
QFoxl2-F	GGAAGAAAATGCCGATTCA	qRT-PCR
Q Foxl2-R	ACTCCCAACATGCTGTTCC	qRT-PCR
Y Foxl2	ATAGGGACCGCAGTGGTTGTCAGCAAATAA	原位杂交探针 <i>in situ</i> hybridization probe

分别以虾夷扇贝不同发育时期的性腺 cDNA 为模板对目的基因进行扩增。使用 ChamQ SYBR Color qPCR master mix 试剂盒(Vazyme, 中国)按照下列参数配制 qPCR 反应体系: $2\times$ ChamQ STBR Color qPCR master mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, $50\times$ ROX reference dye 1 0.4 μ L, 灭菌蒸馏水 6.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s(预变性); 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(退火), 循环 40 次; 在 StepOnePlusTM(美国)进行 qPCR 反应, 每次反应 3 个重复, 各个样品 3 个平行实验。本实验结果采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *PyFoxl2* 基因的相对表达量。利用 Prism 5 软件对实验数据进行统计和分析。

1.6 原位杂交

根据 *PyFoxl2* 基因的 ORF 区设计原位杂交探针 YFoxl2。取部分性腺组织, 切成 2 mm 左右的厚度, 用灭菌的镊子置于原位杂交液中常温固定 24 h 用于切片处理。正式原位杂交步骤: 固定的组织经石蜡切片后依次放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-85%酒精 5 min-75%酒精 5 min-DEPC 水洗。用胃蛋白酶处理, 使靶

核酸片段暴露, 预杂交缓冲液(不含探针和硫酸葡聚糖)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 接着滴加含探针的杂交液, 55 $^{\circ}$ C 杂交过夜。进行非特异结合探针的洗脱和残余 RNA 的消化后, 用 BSA(bovine serum albumin)封闭非特异性抗体 1 h, 滴加鼠抗地高辛标记 488(anti-DIG-488)进行抗体孵育 37 $^{\circ}$ C 40 min, 洗涤, 最后显色液(DAPI)进行显色, 于尼康正置荧光显微镜(日本)下观察并采集图像。

2 结果

2.1 *PyFoxl2* 序列分析

生物信息学分析结果显示, *PyFoxl2* ORF 序列长度为 1107 bp, 编码 368 个氨基酸。存在保守的 FH 结构域(128~218 bp); FH 结构域存在一个疑似核定位信号序列(nuclear localization signal sequence)RRRRMRR。*PyFoxl2* 蛋白无信号肽, 不存在明显的跨膜区域。因此, 推测其为一个胞内蛋白, 不属于膜蛋白。

2.2 *PyFoxl2* 空间结构预测

应用 Swiss-Model 同源建模服务器预测了 *PyFoxl2* 蛋白三维结构。结果显示, 该蛋白保守区主要由 3 个 α 螺旋、4 个 β 折叠和 2 个翼状结构组成(图 1)。

2.3 *PyFoxl2* 氨基酸序列同源性及进化树分析

从 NCBI 数据库里选择 7 个 *Foxl2* 代表性的物种的氨基酸序列进行同源比对分析。结果发现, *PyFoxl2* 与软体动物的氨基酸序列相似度较高, 其中, 与栉孔扇贝、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)的相似性最高, 分别为 98%、96%, 与美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的相似性为 73% (图 2)。

为了了解 *Foxl2* 在不同物种中的进化关系, 使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对 18 个物种构建系统进化树。结果显示, 软体动物聚为一支, 无脊

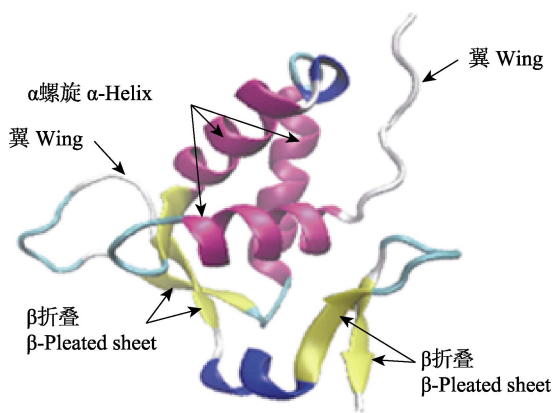


图1 *PyFoxl2* 叉头保守区推测的三维结构

Fig.1 Schematic structure of *PyFoxl2* forkhead domain

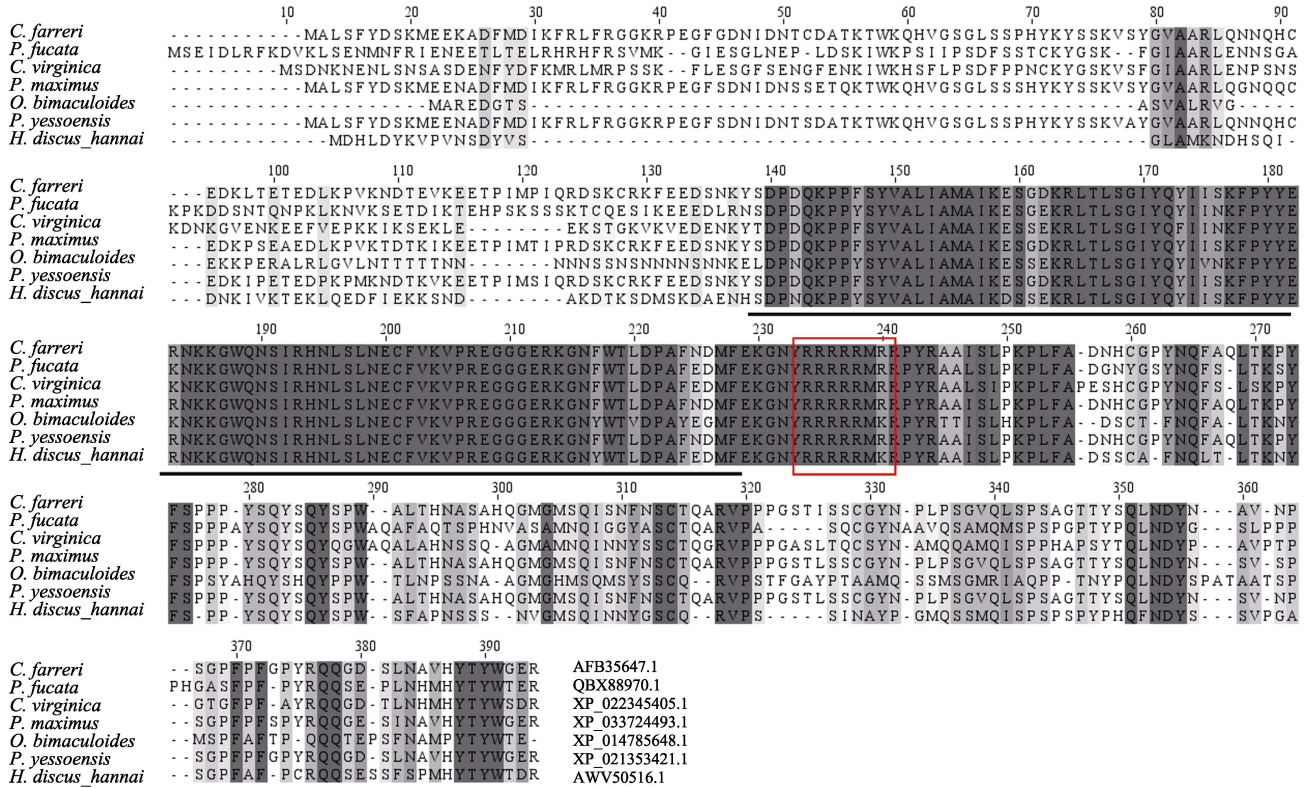


图 2 虾夷扇贝 *Foxl2* 与其他物种的同源性序列比对

Fig.2 *Foxl2* homologous sequence alignment between yesso scallop and other species

横线为 FH 结构域, 红色的框为核定位信号序列

物种 NCBI 登录号。栉孔扇贝: AFB35647.1; 合浦珠母贝: QBX88970.1; 美洲牡蛎: XP_022345405.1; 欧洲大扇贝: XP_033724493.1; 加州双斑蛸: XP_014785648.1; 虾夷扇贝: XP_021353421.1; 皱纹盘鲍: AWW50516.1。

横线为 DM 结构域, 红色的框为核定位信号序列

Species NCBI Login No. *C. farreri*: AFB35647.1; *P. fucata*: QBX88970.1; *C. virginica*: XP_022345405.1; *P. maximus*: XP_033724493.1; *O. bimaculoides*: XP_014785648.1; *P. yessoensis*: XP_021353421.1; *H. discus hannai*: AWW50516.1

The horizontal line is the forkhead domain, and the red box is the nuclear localization signal sequence

椎动物软体动物聚为一支, 节肢动物门单独分出一支。其中, 虾夷扇贝先与栉孔扇贝、长牡蛎、合浦珠母贝 (*Streptodera trachelostropha*) 等聚为一支, 这显示它们的亲缘关系较近, 形成的独立分支再与三角帆蚌聚为一支, 最后与脉红螺 (*Rapana venosa*) 聚为一支, 为软体动物门 (Mollusca) (图 3)。

2.4 *PyFoxl2* 在各组织中的表达

RT-PCR 分析 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝生长期不同组织中的表达。结果显示, 在鳃、肾、肝胰腺中都可检测到少量 *PyFoxl2* 转录本的存在, 但在外套膜、闭壳肌中未见表达。*PyFoxl2* 在卵巢中的表达量最高, 其表达量显著高于精巢 (图 4)。

2.5 *PyFoxl2* 在性腺发育不同时期的相对表达量

通过 qRT-PCR 分析构建了 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝

性腺发育的时空表达模型。结果显示, *PyFoxl2* 在精巢的性腺发育周期中呈下降趋势; 在卵巢中呈先上升后下降的趋势, 其中, 在成熟期达到最大值 (图 5)。

2.6 *PyFoxl2* mRNA 在性腺组织中的细胞学定位

原位杂交结果显示, *PyFoxl2* 定位于所有生殖细胞的细胞质。在卵巢中, 与阴性对照组相比, *PyFoxl2* mRNA 在各时期的性腺分化细胞中均检测到阳性信号。其中, 卵原细胞的阳性信号最弱 (图 6A1~A2)。*PyFoxl2* 卵巢增殖期的阳性信号弱于生长期和成熟期。在精巢中, 与阴性对照组相比, *PyFoxl2* 在精原和精母细胞中的表达呈阳性。在成熟期精巢中, 阳性信号随着生殖细胞的分化而逐渐减弱, 精子中没有检测到信号 (图 6B1~B4)。

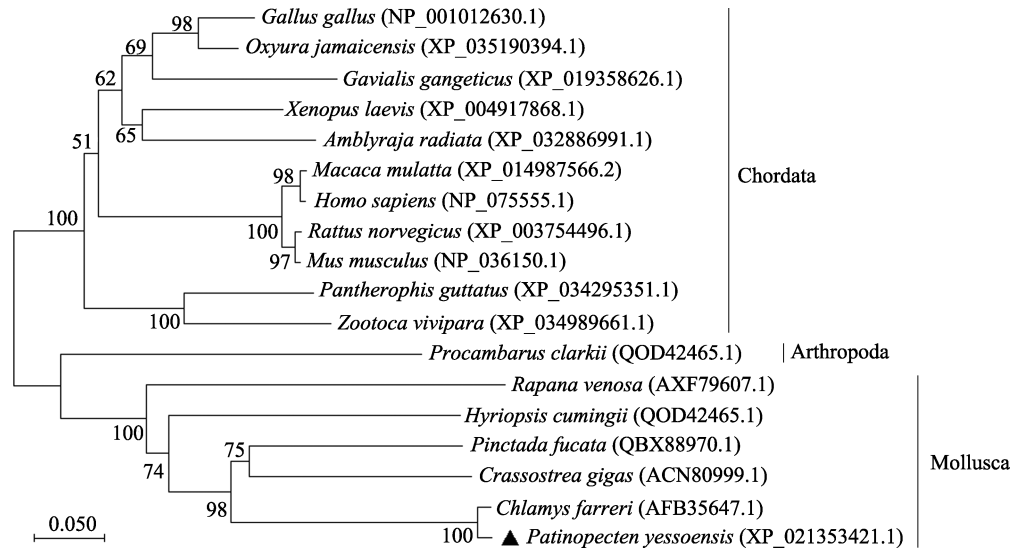


图 3 不同物种 Foxl2 蛋白系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of Foxl2 protein from different species

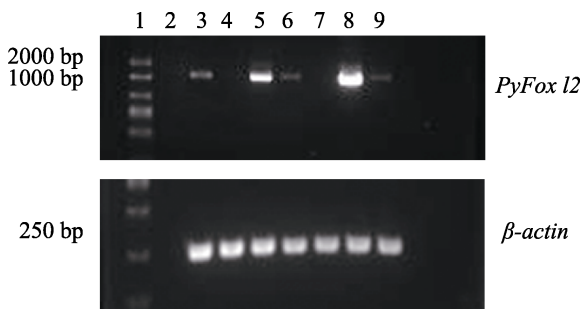


图 4 *PyFoxl2* 在不同组织中的表达

Fig.4 The expression of *PyFoxl2* in different tissues

- 1: DL 2000 marker; 2: 去离子水; 3: 鳃; 4: 外套膜; 5: 肾; 6: 肝胰腺; 7: 闭壳肌; 8: 卵巢; 9: 精巢
 1: DL 2000 marker; 2: Deionized water; 3: Gill; 4: Mantle; 5: Kidney; 6: Hepatopancreas; 7: Adductor muscle; 8: Ovary; 9: Testis

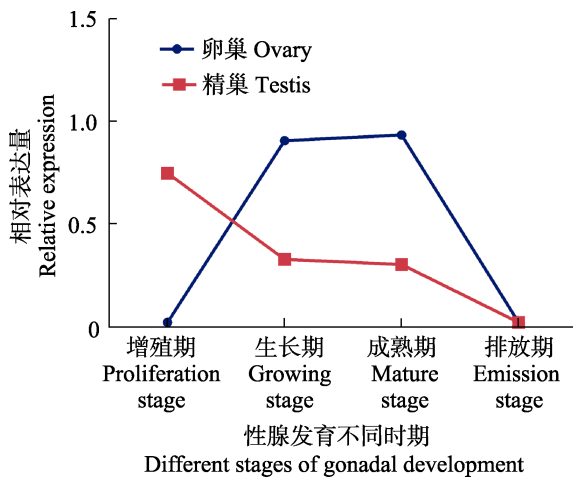


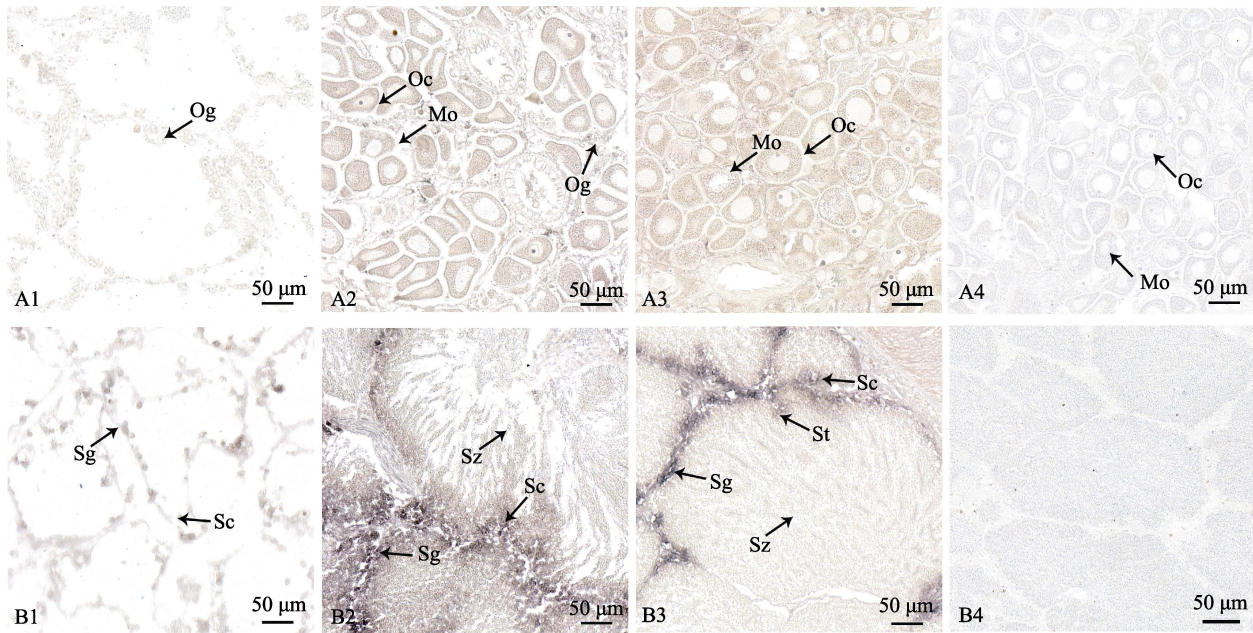
图 5 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝性腺发育的时空表达模式

Fig.5 The expression pattern of *PyFoxl2* in gonadal development of *P. yessoensis*

3 讨论

本研究分析了 *PyFoxl2* 的序列, 发现其含有 *Fox* 基因家族的 FH 保守结构域序列特征。*Fox* 家族都含有一个叉头样 DNA 结合区域, 该叉头结构由 90 个氨基酸组成(曲中玉等, 2006), 包含 3 个 α 螺旋、4 个 β 折叠和 2 个翼状结构。其 α 螺旋与靶基因 DNA 双螺旋大沟结合, 其 β 折叠则与小沟结合(Fan *et al*, 2011), 以调控靶基因的表达。*Foxl2* 是一个转录因子, 该蛋白只有通过核膜进入细胞核内后, 才能发挥其调控作用, 而核定位信号序列是核内功能蛋白进入细胞核的结构基础, 是一些蛋白进入细胞核内的必要片段。通过序列对比发现, 在虾夷扇贝中发现的疑似核定位信号为 RRRRRMRR, 不同物种 *Foxl2* 的叉头框保守区都存在这个核定位信号序列。人(*Homo sapiens*) *Foxl2* 蛋白也在保守区的 C 端具有一段精氨酸和赖氨酸区(RRRRRMKR), 即 *Foxl2* 蛋白的细胞核定位信号序列, 参与该蛋白由细胞质进入细胞核的调控(Beysen *et al*, 2008), 该区域序列的突变将导致 *Foxl2* 转录因子不能顺利地进行亚细胞定位, 只能聚集在细胞核外, 影响其功能的正常发挥。虾夷扇贝 *Foxl2* 转录因子的疑似核定位信号如何引导其进入细胞核内并发挥功能有待今后进一步探讨。

对于不同物种的比较表明, *Foxl2* 主要在卵巢中表达。除此之外, 有学者在硬骨鱼类的脑垂体和鳃中检测到少量的表达, 并认为 *Foxl2* 在脑-垂体-性腺轴中具有潜在的作用(Alam *et al*, 2008; Wang *et al*, 2004)。本研究通过 RT-PCR 在虾夷扇贝鳃、肾和肝胰

图 6 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝性腺发育不同时期的细胞学定位Fig.6 Cytological localization of *PyFoxl2* at different stages of gonadal development in *P. yessoensis*

A: 卵巢; B: 精巢; 1: 增殖期; 2: 生长期; 3: 成熟期; 4: 阴性对照

Mo: 成熟卵; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Sz: 精子

A: Ovary; B: Testis; 1: Proliferation stage; 2: Growing stage; 3: Mature stage; 4: Negative control;

Mo: Mature eggs; Oc: Oocyte; Og: Oogonium; Sc: Spermatocyte; Sg: Spermatogonium; St: Sperm cells; Sz: Sperm

腺中都检测到 *PyFoxl2* 转录本的存在。也有学者在三角帆蚌的研究中发现, *Foxl2* 在性腺、鳃、闭壳肌、足部、外套膜和肾脏中均有表达, 在卵巢的表达水平显著高于精巢(Wang *et al.*, 2020)。在栉孔扇贝的肝胰腺有微弱的表达(刘晓玲, 2012)。以上研究提示, *Foxl2* 基因功能不仅限于性腺和脑垂体方面, 可能在其他组织中也具有一定的功能。

Loffler 等(2003)研究认为, 小鼠在性别决定后, *Foxl2* 的表达立即上调, 促进卵巢分化。本研究通过对虾夷扇贝性腺发育不同时期的时空表达分析发现, *PyFoxl2* 在卵巢增殖期到生长期的表达量显著增加, 维持在成熟期, 而处于增殖期的虾夷扇贝性腺几乎可以判断出性别(高悦勉等, 2007)。因此, 推断 *PyFoxl2* 可能也是在虾夷扇贝性别决定后表达上调。在精巢中, 其表达量整体呈下降趋势。这个研究结果与长牡蛎中的相一致, 在长牡蛎性腺中, 生长期卵巢的表达量是精巢的 8 倍(Naimi *et al.*, 2009)。长牡蛎性腺是一个季节性发育的非持续表达的器官, 配子每年从生殖细胞开始增殖、分化、成熟。随着性腺小管的生长和分支, 它们通过周围的结缔组织扩散, 然后, 结缔组织退化(Berthelin *et al.*, 2001; Fabioux *et al.*, 2004)。 *Foxl2* 在虾夷扇贝卵巢中的表达量随着性腺的发育呈先上升后下降的趋势, 这个结果进一步证明 *Foxl2* 基

因的表达与卵细胞分化息息相关。而原位杂交阳性信号变化验证了 *Foxl2* 在卵巢发育中的周期性表达变化。此外, 通过原位杂交定位技术发现, *PyFoxl2* 仅定位在虾夷扇贝的生殖细胞中, 在成熟卵和卵母细胞中均检测到强阳性信号; 随着雄性生殖细胞的逐级分化, 阳性信号减弱。这个结果也与长牡蛎的一致, Naimi 等(2009)认为这一结果可能提示 *Foxl2* 基因在长牡蛎精巢发育成熟过程中也有一定的作用。而在栉孔扇贝中, *Foxl2* 不仅定位在生殖细胞中, 在体细胞中也有阳性信号(刘晓玲, 2012)。由此推测, *Foxl2* 对虾夷扇贝卵巢发育的调控起更重要的作用。

参 考 文 献

- ALAM M A, KOBAYASHI Y, Horiguchi R, *et al.* Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 157(1): 75–85
- BAO X B, LIU W D, JIANG B, *et al.* Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 2011, 30(10): 603–608 [鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量 PCR 中表达稳定性的比较. *水产科学*, 2011, 30(10): 603–608]

- BERTHELIN C H, LAISNEY J, ESPINOSA J, *et al.* Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate Reproduction and Development*, 2001, 40(1): 79–86
- BEYSEN D, MOUMN L, VEITIA R, *et al.* Missense mutations in the forkhead domain of *Foxl2* lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(13): 2030–2038
- BOULANGER L, PANNETIER M, GALL L, *et al.* *Foxl2* is a sex determining gene in the goat. *Current Biology*, 2014, 24(4): 404–408
- ELLSWORTH BS, EGASHIRA N, HALLER J L. *Foxl2* in the pituitary: Molecular, genetic, and developmental analysis. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(11): 2796–2805
- ESCALIER D, ELOY L, GARCHON H J. Sex specific gene expression during meiotic prophase I: Xlr (X linked, lymphocyte regulated), not its male homologue Xmr (Xlr-related, meiosis regulated), is expressed in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 1646–1652
- FABIOUX C, POUVREAU S, LE ROUX F, *et al.* The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897–904
- FAN J Y, HAN B, QIAO J, *et al.* Functional study on a novel missense mutation of the transcription factor *Foxl2* causes blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES). *Mutagenesis*, 2011, 26(2): 283–289
- GAO Y M, TIAN B, YU Y G, *et al.* The gonadal development and reproductive cycle of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in Tahe Bay in Dalian. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(5): 335–339 [高悦勉, 田斌, 于永刚, 等. 大连塔湾海区虾夷扇贝的性腺发育与繁殖规律. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 335–339]
- LI R J, ZHANG L L, LI W R, *et al.* *Foxl2* and *Dmrt1L* are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patinopecten yessoensis*. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 01166
- LI Y P, ZHANG L L, SUN Y, *et al.* Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 2016, 18: 453–465
- LIU X L. Molecular cloning, expression pattern and function analysis of *Cf-foxl2* in the scallop *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [刘晓玲. 栉孔扇贝 *Cf-foxl2* 基因的克隆、表达模式及功能初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- LOFFLER K L, ZARKOWER D, KOOPMAN P, *et al.* Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *Foxl2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 3237–3243
- MAJOR A T, AYERS K, CHUE J, *et al.* *Foxl2* antagonises the male developmental pathway in embryonic chicken gonads. *Journal of Endocrinology*, 2019, 243(3): 211–228
- NAIMI A, MARTINEZ A S, SPECQ M L, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154: 134–142
- OSHIMA Y, UNO Y, MATSUDA Y, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(2/3): 170–177
- OTTOLENGHI C, PELOSI E, TRAN J, *et al.* Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Human Molecular Genetics*, 2008, 16(23): 2795–2804
- QU Z Y, CHEN Z J. *Foxl2*: A transcription factor related with infertility. *Reproduction and Contraception*, 2006, 26(1): 40–43 [曲中玉, 陈子江. *Foxl2*—不孕有关的转录因子. 生殖与避孕, 2006, 26(1): 40–43]
- UHLENHAUT N H, TREIER M. Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction*, 2011, 142(4): 489–495
- WANG D S, KOBAYASHI T, ZHOU L Y, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320(1): 83–89
- WANG G L, DONG S S, GUO P F, *et al.* Identification of *Foxl2* in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* and its involvement in sex differentiation. *Gene*, 2020, 754: 144853
- YE R H, RE H B. Molecular cloning and gene expression of *foxl2* and *sox14* gene from *Hyriopsis cumingii*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 160–167 [叶容晖, 任海波. 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)叉头蛋白 2 (*foxl2*)基因和性别决定框 14 (*sox14*)基因克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 2018, 49(1): 160–167]

Expression Pattern of the *Foxl2* Gene in the Scallop *Patinopecten yessoensis* during Development

ZHAO Dan^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2①}, ZHENG Yanxin⁵, SUN Xiujun², WU Biao²,
LIU Zhihong², WU Zhou^{2,3}, WU Lei^{2,4}

(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. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China; 4. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 5. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract *Foxl2*, an important member of the *Fox* (forkhead transcription factor) gene family, plays an important role in ovarian development and sex regulation. To explore the mode of expression regulation in the sex differentiation of the scallop *Patinopecten yessoensis*, we analyzed the *Foxl2* gene sequence characteristics of *P. yessoensis* using bioinformatics methods, and the expression of *Foxl2* in different tissues was detected *via* semi-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization revealed the temporal and spatial expression changes of *Foxl2* in the four stages of gonadal development (proliferation, growth, maturation, and emission stage). The results showed that the *Foxl2* sequence of *P. yessoensis* contains the FH domain shared by the *Fox* gene family, and the multiple sequence comparison analysis showed that *P. yessoensis* has the highest similarity with *Chlamys farreri* and *Pecten maximus* (98% and 96%, respectively). The phylogenetic tree analysis showed that the *Foxl2* gene is highly conserved in different species and in the process of evolution. The results of the quantitative analysis and *in situ* hybridization showed that the positive signal of the *in situ* hybridization was mainly located in the cytoplasm of the germ cells. A small amount of *PyFoxl2* transcripts were detected in the gills, kidneys, hepatopancreas, and testes. The expression level of *Foxl2* was the highest in the ovary and peaked in the mature stage of the ovary. In contrast, with the development of the testis and the gradual differentiation of the male gametes, the expression of *Foxl2* showed a declining trend, which is consistent with the results of the *in situ* hybridization. In conclusion, *Foxl2* may play a key role in the ovarian development of *P. yessoensis*. It is a key gene in the regulation of sex differentiation in female *P. yessoensis*. This study provides a theoretical basis for advancing our understanding of the sex differentiation and gonadal development of *P. yessoensis*.

Key words *Patinopecten yessoensis*; *Foxl2*; Real-time quantitative PCR; *in situ* hybridization; Gonadal development

① Corresponding author: ZHOU Liqing, E-mail: zhouliq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210201001

http://www.yykxjz.cn/

吴文广, 张继红, 刘毅, 赵云霞, 张坤阳, 王亮亮. 薛家岛海水网箱养殖海域贝藻综合养殖效果及其影响因素分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 146–155

WU W G, ZHANG J H, LIU Y, ZHAO Y X, ZHANG K Y, WANG L L. Analysis of the effectiveness of the polyculture of shellfish and algae and influencing factors in the Xuejiadao sea cage aquaculture area. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 146–155

薛家岛海水网箱养殖海域贝藻综合养殖效果及其影响因素分析*

吴文广^{1,3} 张继红^{1,2①} 刘毅¹ 赵云霞¹ 张坤阳¹ 王亮亮¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究于2018年9—11月在山东省青岛市薛家岛海域构建了包含鱼类网箱、马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)和异枝麒麟菜(*Eucheuma striatum*)的多营养层次综合养殖(IMTA)模式,开展现场实验的同时,在室内测定了马氏珠母贝的摄食生理指标和异枝麒麟菜的营养盐吸收速率,对比分析了贝藻综合养殖对网箱养殖区的水质改善效果。结果显示,实验点马氏珠母贝壳高及特定生长率(SGR)均显著高于对照点,水层为0.50~0.62 m的马氏珠母贝平均壳高显著高于其他水层。实验点异枝麒麟菜的净增重显著高于对照点,水深为0.60~0.90 m的生长速率最高;在24.45℃条件下,马氏珠母贝对颗粒有机物(POM)的摄食率、吸收率和吸收效率均值分别为(4.13±0.77) mg/(h·ind.)、(1.04±0.24) mg/(h·ind.)和(25.00±2.51)%,均显著高于20.74℃实验组;在实验温度范围内,异枝麒麟菜对N、P、Si营养盐的吸收速率均随着温度升高呈先升高再降低的趋势,最高值出现在30℃。实验期间,马氏珠母贝摄食和吸收的POM分别为778.08和144.47 g,异枝麒麟菜吸收的N、P、Si总量分别为8.55、1.11和9.18 g,均高于对照点。研究表明,温度、养殖深度、POM及营养盐浓度是影响马氏珠母贝和异枝麒麟菜生长及生理代谢的主要因素。

关键词 海水网箱养殖; 马氏珠母贝; 异枝麒麟菜; 多营养层次综合养殖

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0146-10

近年来,随着浅海网箱养殖产生的环境污染及生态问题日益凸显,多营养层次综合养殖(IMTA)作为一种健康可持续发展的海水养殖理念,可实现营养物质

在不同营养级生物间的传递和再循环,同时,可提高食物产出效率,达到控制养殖水域富营养化的生态高效养殖目的(Chopin *et al.*, 2001)。唐启升等(2013)研究

* 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)(20180101)、山东省重大科技创新工程专项——“健康海洋”技术创新工程(2018SDKJ0501-3)和中国科学院战略性先导科技专项(A类)“美丽中国生态文明建设科技工程”(XDA23050402)共同资助 [This work was supported by Aquaculture Science and Technology Cooperation Projects of Tropical Countries Along the “Belt and Road” of the Ministry of Agriculture (20180101), the Marine Science and Technology Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0501-3), and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA23050402)].

吴文广, E-mail: wuwg@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-02-01, 收修改稿日期: 2021-03-16

表明,多营养层次综合水产养殖是应对多重压力胁迫下近海生态系统显著变化的一条有效途径。目前,该养殖模式已经在世界多个国家(中国、加拿大、挪威、以色列等)广泛实践,并取得了诸多的积极效果(Neori *et al.*, 2004; Gui *et al.*, 2018; Ashkenazi *et al.*, 2019; 张继红等, 2013a)。以贝藻为主体的 IMTA 是水产养殖业绿色发展的代表性模式,通过引入滤食性贝类和大型藻类,利用贝类的滤食及大型藻类光合作用吸收营养盐的功能,可以减轻网箱养殖产生的环境压力,降低有机物和营养盐负荷(张继红等, 2013b)。

20 世纪 70 年代,我国已开展了海水贝藻混养的研究,并取得了较好的养殖效果,但多集中于扇贝、贻贝 (*Mytilus edulis*)、牡蛎 (*Ostrea gigas*) 与海带 (*Laminaria japonica*) 等北方养殖种类(王德利, 2001; 高桦楠等, 2016)。马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*) 又称合浦珠母贝,广泛分布在热带或亚热带海域,以过滤海水中微藻、浮游性动物的幼虫和海水中的有机碎屑杂质等为食(邓正华等, 2016)。麒麟菜 (*Eucauma muricatum*) 是一种世界性海藻,主要分布在热带海域以及亚热带海域,而琼枝麒麟菜 (*Eucauma gelatiana*) 和异枝麒麟菜 (*Eucauma striatum*), 又名长心卡帕藻 (*Kappaphycus alvarezii*), 是我国南方地区养殖的主要经济种类(陈攀等, 2018)。针对我国北方传统贝藻养殖所面临的问题,即夏季水温过高导致栉孔扇贝 (*Azumapecten farreri*)、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 等死亡率上升、产量下降及藻类养殖种类空缺等,马氏珠母贝和麒麟菜是开展贝藻综合养殖的理想经济种类。通过尝试引入马氏珠母贝、异枝麒麟菜等相对更耐高温的热带种类到北方海域开展鱼贝藻 IMTA 模式,有效地利用夏季北方海域相对较高的水温特点及网箱养殖区较高的营养盐浓度(王德利, 2001), 探讨其在北方海域进行规模化养殖的可能性,可作为北方海域夏季海水养殖种类的有益补充。目前,关于浅海网箱养殖、马氏珠母贝与异枝麒麟菜的混养效果研究报道较少。本研究以山东青岛薛家岛网箱养殖海域为研究区域,构建了包含鱼类网箱、马氏珠母贝和异枝麒麟菜的 IMTA 模式,对比并分析了贝藻综合养殖对网箱养殖区的水质改善效果,以期为浅海鱼贝藻 IMTA 模式的建立提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验站位设置

实验所需马氏珠母贝和异枝麒麟菜均采自海南

省三亚市养殖区,空运至青岛实验室暂养 7 d 后开始实验。2018 年 9—11 月在山东青岛薛家岛海域设置网箱养殖区(实验点, 35°55′16.6″N, 120°13′04.1″E)和非养殖区(对照点, 35°55′27.6″N, 120°13′15.3″E), 开展海上贝藻综合养殖对比实验(图 1)。网箱养殖区鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 养殖密度为 10.8 尾/m³。

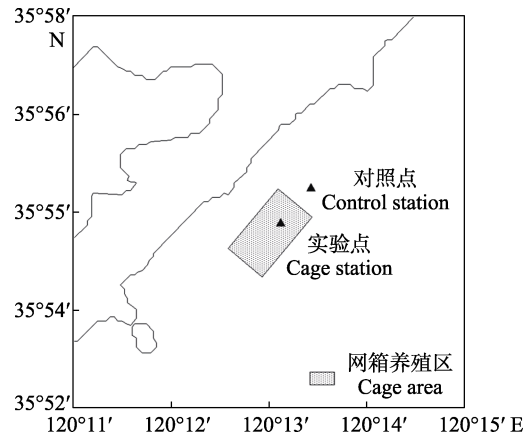


图 1 现场综合养殖实验站位

Fig.1 The station for field experiments of integrated multi-trophic aquaculture

1.2 布置方案与样品采集

1.2.1 布置方案 参照麒麟菜栽培技术规程(海南省地方标准)(DB46/T192-2010), 挑选色泽鲜亮的异枝麒麟菜进行绑苗, 主绳长为 2.5 m, 苗距为 30 cm, 每条主绳悬挂 7 个不同深度的异枝麒麟菜并编号, 测量每层初始苗的湿重, 分别在对照点和实验点悬挂异枝麒麟菜各 4 绳并编号。参照马氏珠母贝养成技术规程(海南省地方标准)(DB46/T2862-2014), 挑选健康有活力的马氏珠母贝置于养殖吊笼内, 每层放置 3 个, 共 7 层, 每笼 21 个马氏珠母贝, 对照点和实验点各悬挂 5 笼, 测量马氏珠母贝的初始湿重、壳高。在网箱养殖区, 将异枝麒麟菜第 1 层苗绳悬挂在海水表层, 马氏珠母贝养殖笼悬挂在水下 0.26 m 处, 苗绳和养殖笼下端均悬挂坠石使它们在海水中垂直展开, 即马氏珠母贝的吊养深度分别为 0.26、0.32、0.38、0.44、0.50、0.56 和 0.62 m, 异枝麒麟菜的吊养深度分别为 0、0.3、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1 和 2.4 m。非养殖区(对照点)也同样操作。

1.2.2 样品采集和测定 养殖实验于 2018 年 9 月 21 日—11 月 2 日开展, 并于 10 月 15 日和 11 月 2 日分别在实验点和对照点采集样品。温度、盐度、pH 等环境参数均采用多参数水质仪(YSI-EXO₂ 型)测定。总

悬浮颗粒物(TPM)、颗粒有机物(POM)、营养盐等环境参数的采集及测定均采用《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)的方法;叶绿素 *a* 采用 Turner-Designs Trilogy 荧光仪(美国)进行测定(吴文广等, 2018)。使用电子天平(梅特勒-ME-2002, 美国)现场称量每个实验组、每绳、每层异枝麒麟菜的湿重并记录对应编号, 统计马氏珠母贝养殖笼内每层的死亡个数, 并记录对应编号, 使用电子天平称量每层马氏珠母贝的生物学参数(壳高、湿重), 称量后均放回原处。实验结束后, 全部取回至实验室进行最终的测量分析。

1.3 室内生理实验

1.3.1 马氏珠母贝摄食生理实验 参照张继红等(2013a, b)的方法, 采用室内静水法测定马氏珠母贝的滤水率(Clearance rate, CR)、摄食率(Feeding rate, FR)、吸收率(Absorption rate)及吸收效率(Absorption efficiency)等生理指标, 每个实验组设置 5 个平行和 3 个空白对照, 每个平行组放置 1 个马氏珠母贝, 实验持续 2 h 后, 收集粪便和假粪。实验结束后, 将贝类分别置于过滤海水中, 排空 2 h, 再次收集粪便, 测定实验用贝的壳高、湿重等生物学指标, 实验用水为网箱区表层自然海水。

1.3.2 异枝麒麟菜营养盐吸收速率实验 选取生长正常的异枝麒麟菜, 充气暂养 7 d 后开始实验。使用吸水纸吸干藻体表面的水分后, 分别测量并记录异枝麒麟菜的湿重, 平均湿重为(9.82±0.51) g, 实验海水使用网箱区表层自然海水脱脂棉过滤, 设置 3 个实验组和 1 个空白对照组, 实验容器为体积 12 L 聚乙烯材质整理箱, 每个实验容器放入实验海水 10 L, 微充气培养, 温度梯度设置为 17℃、20℃、25℃、30℃、35℃共 5 个梯度, 每个温度梯度结束后, 按照每天升温 2℃, 升至实验温度暂养 3 d 后, 继续进行下一个温度梯度实验。实验期间, 培养箱设置 12 h 光照和 12 h 黑暗, 每个温度梯度实验持续 24 h, 按 1.2.2 所述方法测定营养盐浓度。

1.4 计算方法

马氏珠母贝和异枝麒麟菜的特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)计算公式:

$$SGR=100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t$$

式中, W_2 为结束时湿重(g)或壳高(mm), W_1 为初始湿重(g)或壳高(mm), t 实验持续时间(d)。

马氏珠母贝摄食生理指标的相关计算公式参考周毅等(2002)和张继红等(2013a, b)的方法。

异枝麒麟菜对各项营养盐吸收速率参照方哲等(2008)的方法, 计算公式:

$$C=(N_0-N_t) \times V / (T \times G)$$

式中, C 为营养盐吸收速率($\mu\text{mol/g} \cdot \text{h}$), N_0 为实验结束时空白对照组的各项营养盐浓度($\mu\text{mol/L}$), N_t 为实验过程中各个取样时间点的各项营养盐浓度($\mu\text{mol/L}$), V 为实验所用海水的体积(L), T 为实验时间(h), G 为异枝麒麟菜的湿重(g)。

马氏珠母贝对 POM 的摄食及吸收总量计算公式:

$$M_{\text{pom}}=n \times W_d \times I \times T_a \times 10^{-3}$$

式中, M_{pom} 为马氏珠母贝对 POM 的摄食总量或吸收总量(g), n 为马氏珠母贝最终剩余总个数(ind.), W_d 为马氏珠母贝养殖最终单位个体软组织干重(g/ind.), I 为马氏珠母贝对 POM 的摄食率或吸收率 [mg/(h·g DW)], T_a 为养殖时间(h)。

异枝麒麟菜 N、P、Si 去除总量计算公式:

$$R=G_a \times M \times C \times T_a \times 10^{-6}$$

式中, R 为异枝麒麟菜对 N、P 或 Si 的去除总量(g), G_a 为异枝麒麟菜净增重(湿重计)(g), M 为 N、P 或 Si 元素的摩尔质量(g/mol), C 为 20℃~25℃时, 异枝麒麟菜对 N、P 或 Si 营养盐吸收速率的平均值 [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$], T_a 为养殖时间(h)。

1.5 数据处理

实验数据采用 Microsoft Excel 2010、Surfer8.0 和 Matlab 统计分析软件进行分析及绘图, 采用 SPSS17.0 软件进行独立样本 t 检验分析组间差异($P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著), 贝藻的 SGR 与主要环境因子间的关系采用冗余分析(redundancy analysis, RDA), 分析过程使用 Canoco for Windows 4.5 软件按照国际通用标准完成(吴文广等, 2018)。

2 结果

2.1 环境数据分析

近海网箱养殖实验海区环境参数详见表 1。单因子方差分析(one-way ANOVA)表明, 实验期间, 实验点 TPM、POM、氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)及溶解无机氮(DIN)浓度均显著高于对照点($P < 0.05$), 而透明度显著低于对照点; 除第 1 次取样外, 实验点硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)浓度、叶绿素 *a* 浓度均显著高于对照点($P < 0.05$); 除初始取样外, 实验点 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度均显著高于对照点($P < 0.05$); $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ 浓度在初始取样时显著低于对照点, 而第 1 次和第 2 次取样时则相反($P < 0.05$)。

表 1 近海网箱养殖实验海区环境参数

Tab.1 The environmental parameters of experimental area in offshore fishcage farming

环境参数 Environmental parameters	日期 Date					
	2018-09-21		2018-10-15		2018-11-02	
	实验点 Cage ₀	对照点 Control ₀	实验点 Cage ₁	对照点 Control ₁	实验点 Cage ₂	对照点 Control ₂
表层温度 T/°C	24.75±0.17	24.75±0.13	21.24±0.15	21.05±0.19	18.24±0.11	17.46±0.12
盐度 S	32.57±0.09	32.55±0.07	32.27±0.08	32.56±0.11	31.51±0.06	31.75±0.05
溶解氧 DO/(mg/L)	6.89±0.37	6.83±0.41	7.35±0.24	7.23±0.31	7.46±0.22	7.39±0.27
pH	8.25±0.03	8.26±0.02	8.25±0.01	8.31±0.02	7.96±0.02	7.96±0.01
水深 Water depth/m	15.22±0.31	15.51±0.25	15.22±0.31	15.51±0.25	15.22±0.31	15.51±0.25
透明度 TRA/m	1.13±0.11	1.51±0.15*	1.30±0.13	1.91±0.21*	1.73±0.15	2.14±0.22*
总悬浮颗粒物 TPM/(mg/L)	111.42±11.17*	86.68±9.57	60.42±7.62*	47.62±8.64	70.78±7.56*	45.20±9.11
颗粒有机物 POM/(mg/L)	22.04±2.12*	17.26±1.31	10.52±1.02*	7.98±0.67	11.34±1.13*	6.22±0.54
叶绿素 a Chl-a/(μg/L)	1.01±0.14*	0.89±0.09	0.83±0.06	0.97±0.05	1.12±0.11*	0.69±0.08
亚硝酸盐氮 NO ₂ ⁻ -N/(μmol/L)	0.07±0.02	0.09±0.03	0.07±0.03	0.07±0.02	1.27±0.07*	0.77±0.05
硝酸盐氮 NO ₃ ⁻ -N/(μmol/L)	1.48±0.14*	0.99±0.11	1.09±0.16	1.04±0.18	4.15±0.54*	2.97±0.37
氨氮 NH ₄ ⁺ -N/(μmol/L)	3.66±0.14*	3.38±0.17	3.83±0.21*	3.25±0.16	1.77±0.33*	1.28±0.21
溶解无机氮 DIN/(μmol/L)	5.22±0.97*	4.46±0.44	5.00±0.54*	4.36±0.61	7.19±1.12*	5.01±0.99
磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P/(μmol/L)	0.18±0.03	0.22±0.04	0.32±0.09*	0.22±0.07	0.44±0.11*	0.23±0.08
硅酸盐 SiO ₃ ²⁻ -Si/(μmol/L)	5.27±1.12	8.05±1.45*	4.96±0.99*	4.03±0.57	4.63±0.73*	2.34±0.66

注: 同一取样日期不同数据列中上标有“*”表示差异显著(P<0.05), Cage₀、Cage₁、Cage₂分别代表实验点初始、第1次、第2次测量; Control₀、Control₁、Control₂分别代表对照点初始、第1次、第2次测量; 下同

Note: “*” represented significant differences in the same sampling date, the same below, Cage₀, Cage₁, Cage₂ refers to the initial, first and second shell height in fish cage area, respectively; Control₀, Control₁, Control₂ refers to the initial, first and second shell height in control area, the same as below

2.2 贝藻综合养殖效果分析

2.2.1 马氏珠母贝生长状况 不同时间、不同海水深度的马氏珠母贝壳高和湿重的生长状况见图2和图3。结果表明, 第3次取样时, 实验点和对照

点马氏珠母贝壳高和湿重均显著高于初始值(P<0.05), 实验点马氏珠母贝壳高在0.38 m和0.50~0.62 m水深显著高于其他水层(P<0.05), 对照点马氏珠母贝壳高在0.32和0.50 m处均显著低

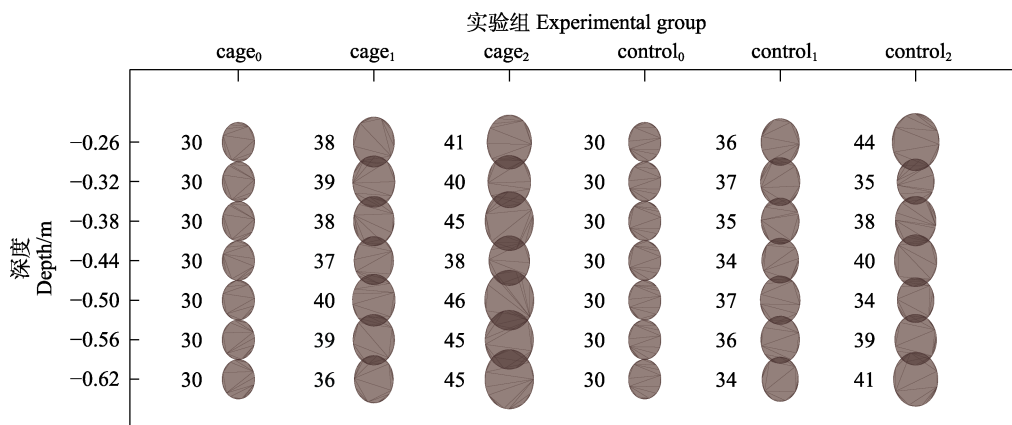


图 2 实验点和对照点马氏珠母贝壳高生长状况(圆形的大小表示贝类的壳高)/mm
Fig.2 The shell height of *P. martensi* in fish cage area and control area
(The size of the circle indicates the shell height of the shellfish)/mm

cage₀、cage₁、cage₂ 分别代表实验点初始、第1次、第2次测量;

control₀、control₁、control₂ 分别代表对照点初始、第1次、第2次测量; 下同

cage₀, cage₁, cage₂ refers to the initial, first and second shell height in fish cage area, respectively; control₀, control₁, control₂ refers to the initial, first and second shell height in control area, the same as below

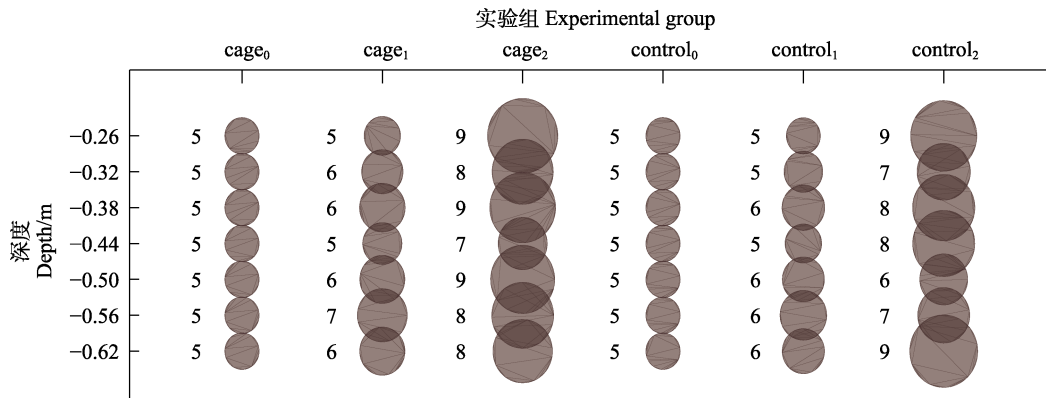


图 3 实验点和对照点马氏珠母贝湿重生长状况(圆形的大小表示贝类的湿重)/g
Fig.3 The wet weight of *P. martensi* in fish cage area and control area (The size of the circle indicates the wet weight of the shellfish)/g

于其他水层($P < 0.05$), 实验点马氏珠母贝的平均壳高和平均湿重分别为(43.71±3.64) mm和(8.42±1.04) g, 对照点马氏珠母贝的平均壳高和平均湿重分别为(38.38±4.50) mm和(7.83±1.80) g。方差分析表明, 第3次取样时, 实验点马氏珠母贝壳高显著高于对照点($P < 0.05$)。

马氏珠母贝在不同深度的实验点和对照点的SGR结果见表2。从表2可以看出, 实验点马氏珠母贝壳高SGR在0.50 m时为最大值(0.96), 在0.44 m为最小值(0.53); 而湿重SGR最大值出现在0.26 m, 为1.66, 最小值出现在深度为0.44 m(0.83); 对照壳高SGR在0.26 m时为最大值(0.86), 在0.50 m处为最小值(0.29); 湿重SGR最大值出现在深度为0.62 m(1.58), 最小值出现在深度为0.56 m(0.96)。实验点的马氏珠母贝壳高SGR平均值显著高于对照点($P < 0.05$)。

2.2.2 异枝麒麟菜生长状况 异枝麒麟菜在实验点和对照点不同养殖深度的生长状况见图4。从图4可以看出, 异枝麒麟菜在水深为0.60~0.90 m的生长速率最快, 随着水深的增加, 异枝麒麟菜藻体湿重损

失较大。经过43 d的海上养殖实验, 实验点的异枝麒麟菜平均每绳总净增重为(253.48±38.68) g, 0.6~0.9 m水层平均每绳净增重为(200.04±33.02) g, 而对照点平均每绳总净增重为(211.09±43.42) g, 0.60~

表 2 不同深度实验点和对照点马氏珠母贝的SGR(%/d)
Tab.2 The SGR of shell height and wet weight of *P. martensi* in fishcage area and control area in different depth

水深 /m Water depth /m	对照点 Control area		实验点 Fish cage area	
	壳高 Shell height	湿重 Wet weight	壳高 Shell height	湿重 Wet weight
0.26	0.86	1.52	0.73	1.66
0.32	0.32	1.02	0.65	1.34
0.38	0.52	1.38	0.93	1.51
0.44	0.63	1.37	0.53	0.83
0.50	0.29	0.77	0.96	1.45
0.56	0.58	0.96	0.92	1.37
0.62	0.72	1.58	0.94	1.27
平均值 Average value	0.56±0.19	1.23±0.29	0.81±0.16*	1.35±0.26

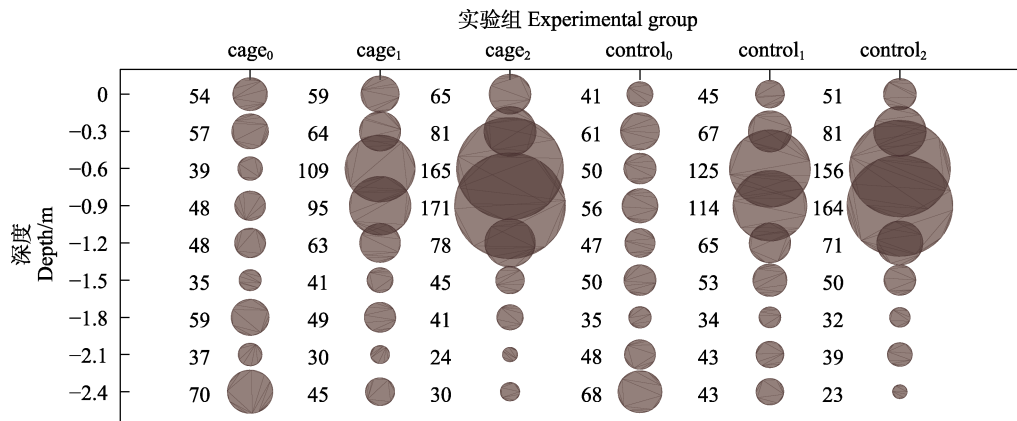


图 4 实验点和对照点异枝麒麟菜生长状况(圆形的大小指示藻类的湿重)/g
Fig.4 The growth of *E. striatum* in fishcage area and control area (The size of the circle indicates the wet weight of the algae)/g

表3 不同深度下实验点和对照点
异枝麒麟菜湿重的 SGR (%/d)

Tab.3 The SGR of *E. striatum* in fish cage area and control area in different depth

水深 Water depth/m	对照点 Control area	实验点 Fish cage area
0	0.52±0.10	0.46±0.22
0.3	0.71±0.59	0.90±0.69
0.6	2.60±0.27	3.21±0.57*
0.9	2.50±0.64	2.32±0.23
1.2	1.00±0.60	1.11±0.38
1.5	-0.12±1.00	0.59±0.01*
1.8	-0.32±1.06	-1.10±0.33
2.1	-0.51±0.10	-1.03±0.10
2.4	-2.47±0.60	-2.88±0.16

0.90 m 水层平均每绳净增重为(106.87±25.96) g, 且该水层实验点异枝麒麟菜的净增重显著高于对照点 ($P<0.05$)。异枝麒麟菜实验点和对照点湿重的 SGR 结果见表 3。从表 3 可以看出, 水深为 0.60~0.90 m 时, 异枝麒麟菜的 SGR 显著高于其他水层, 且实验点的异枝麒麟菜 SGR 在水深为 0.60 和 1.50 m 时显著高于对照点 ($P<0.05$)。

2.3 马氏珠母贝的摄食生理

马氏珠母贝摄食生理实验组水体的环境参数及悬浮颗粒物的特性见表 4。从表 4 可以看出, 10 月 15 日实验组水体的 TPM 及颗粒无机物(PIM)显著高于 9 月 21 日实验组, 而 9 月 21 日实验组水体温度及有机物比率(f)显著高于 10 月 15 日实验组 ($P<0.05$)。马氏珠母贝的生物学参数见表 5。从表 5 可以看出, 2 次实验所用马氏珠母贝生物学指标相比均无显著差异 ($P>0.05$)。不同温度条件下, 马氏珠母贝对实验海区自然海水的摄食生理指标见表 6。从表 6 可以看出, 马氏珠母贝在 24.45℃ 条件下, 实验海区海水 POM 的摄食率、POM 的吸收率和吸收效率平均值分别为 (4.13±0.77) mg/(h·ind.)、(1.04±0.24) mg/(h·ind.) 和 (25.00±2.51)%, 均显著高于 20.74℃ ($P<0.05$), 表明温度对马氏珠母贝的摄食生理产生显著影响。估算了

不同实验组马氏珠母贝对 POM 的去除总量, 实验点和对照点马氏珠母贝对海水中 POM 摄食总量见表 7。从表 7 可以看出, 经过 43 d 的海上养殖实验, 实验点马氏珠母贝的 POM 摄食总量和对 POM 的吸收总量分别为 778.08 和 144.47 g, 均高于对照点。

2.4 异枝麒麟菜的营养盐吸收速率

不同温度的异枝麒麟菜(湿重计)对 N、P、Si 营养盐吸收率见表 8。从表 8 可以看出, 异枝麒麟菜的 N、P、Si 营养盐吸收速率均随着温度升高呈先升高再降低趋势, 最高值出现在 30℃。在 35℃ 温度条件下, 对 N、P、Si 的吸收速率均出现负值, 温度对异枝麒麟菜的营养盐吸收产生显著影响。不同实验组异枝麒麟菜的 N、P、Si 去除效果总量见表 9。从表 9

表4 实验组水体的环境参数及悬浮颗粒物的特性

Tab.4 The environmental parameters and characteristics of suspended particles in experimental groups

环境参数 Environmental parameters	日期 Date	
	2018-09-21	2018-10-15
表层温度 $T/^\circ\text{C}$	24.45±0.55*	20.74±0.37
盐度 S	32.37±0.02	32.17±0.03
溶解氧 DO/(mg/L)	6.86±0.16	7.48±0.11
pH	8.04±0.01	8.18±0.02
总悬浮颗粒物 TPM/(mg/L)	39.05±3.07	46.61±4.31*
颗粒有机物 POM/(mg/L)	9.04±1.11	9.25±1.31
颗粒无机物 PIM/(mg/L)	30.01±2.89	37.36±2.67*
有机物比率 $f/\%$	23.15±2.84*	19.85±1.66

注: *表示不同实验日期同一行数据差异显著 ($P<0.05$)

Note: "*" represented significant differences in the different experiment sampling date ($P<0.05$)

表5 实验组马氏珠母贝的生物学参数

Tab.5 Shell length/height and weight of *P. martensi* used in experiment

实验组 Groups	壳高 Shell height/mm	壳长 Shell length/mm	总干重 Dry weight/g	软组织干重 Dry tissue weight/g
09-21	30.42±0.07	31.91±0.61	2.01±0.11	0.15±0.02
10-15	31.14±0.64	32.60±1.43	2.03±0.14	0.14±0.01

表6 不同温度下马氏珠母贝对自然海水的摄食生理指标

Tab.6 Feeding physiological index of *P. martensi* in different temperatures

实验组 Groups	滤水率 Clearance rate /[L/(h·g DW)]	单位体重摄食率 Ingestion rate /[mg/(h·g DW)]	单位个体摄食率 Ingestion rate /[mg/(h·ind.)]	单位体重吸收率 Absorption rate /[mg/(h·g DW)]	单位个体吸收率 Absorption rate /[mg/(h·ind.)]	吸收效率 Absorption efficiency/%
09-21 (24.45℃)	6.03±0.69*	28.02±5.01*	4.13±0.77*	7.05±1.63*	1.04±0.24*	25.00±2.51*
10-15 (20.74℃)	4.53±0.16	20.55±1.97	2.89±0.42	1.97±2.31	0.28±0.32	9.21±10.46

表7 不同实验组的马氏珠母贝的滤除效果

Tab.7 Filtering effect of *P. martensi* from different experimental groups

实验组 Group	养殖剩余总数量 Total number of /ind.	最终软组织干重均值 Mean dry weight of soft tissue/g	滤食时间 Filter-feeding time/h	颗粒有机物摄食总量 The ingested amount of particulate organic matter/g	对颗粒有机物的吸收总量 The absorbed amount of particulate organic matter/g
实验点 Cage station	97	0.32	1032	778.08	144.47
对照点 Control station	95	0.25	1032	595.37	110.54

表8 不同温度下异枝麒麟菜对氮、磷、硅营养盐的吸收率

Tab.8 The nutrient absorption rate of *E. striatum* in different temperature

吸收速率 Absorption rate/($\mu\text{mol/g}\cdot\text{h}$)	温度 Temperature				
	17 $^{\circ}\text{C}$	20 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	35 $^{\circ}\text{C}$
溶解无机氮 DIN	0.220 \pm 0.090	0.450 \pm 0.130	0.720 \pm 0.240	0.700 \pm 0.021	-0.240 \pm -0.012
磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	0.022 \pm 0.010	0.031 \pm 0.020	0.038 \pm 0.010	0.049 \pm 0.011	-0.002 2 \pm -0.001
硅酸盐 $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$	0.080 \pm 0.030	0.250 \pm 0.130	0.380 \pm 0.120	0.530 \pm 0.170	-0.030 \pm -0.010

表9 不同实验组异枝麒麟菜的 N、P、Si 去除效果对比
Tab.9 The removal amount of nutrient form *E. striatum* in different experimental groups

实验组 Group	净增重 Added weigh /g	氮去除总量 Total removed nitrogen /g	磷去除总量 Total removed phosphorus /g	硅去除总量 Total removed silicon/g
实验点 Cage station	1 013.92	8.55	1.11	9.18
对照点 Control station	844.36	7.12	0.93	7.65

可以看出, 经过 43 d 的海上养殖实验, 实验点异枝麒麟菜的 N、P、Si 去除总量分别为 8.55、1.11 和 9.18 g, 均高于对照点。

2.5 贝藻生长影响因素分析

马氏珠母贝与异枝麒麟菜的 SGR 与环境因子的 RDA 排序见图 5。从图 5 可以看出, 环境因子用实线箭头表示, 贝藻 SGR 用虚线箭头表示。环境因子与 SGR 之间夹角的余弦值代表其相关性, 即夹角越小, 其相关性越强。RDA 分析显示, 温度、TPM、POM 对马氏珠母贝的壳高和湿重的 SGR 有显著影响, 呈正相关($P<0.05$); 而温度、 $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ 、pH、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 与异枝麒麟菜的湿重 SGR 呈显著正相关($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 鱼贝藻混养系统中的贝藻养殖效果及影响因素

近年来, 海水网箱养殖产生的环境及生态系统问

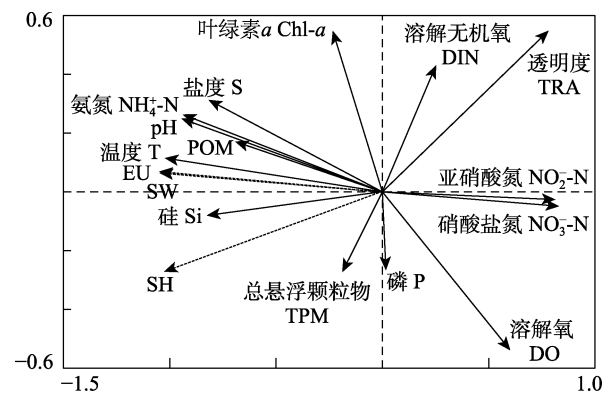


图5 贝藻 SGR 与环境因子 RDA 排序

Fig.5 RDA biplot of SGR from shellfish and algae

EU: 异枝麒麟菜湿重 SGR; SH: 马氏珠母贝壳高 SGR; SW: 马氏珠母贝湿重 SGR
EU: Wet weight SGR of *E. striatum*;
SH: Shell height SGR of *P. martensi*;
SW: Wet weight SGR of *P. martensi*,

题引起人们的关注, 开展鱼、贝、藻的 IMTA 是缓解这一环境压力的有效途径, 目前, 已成为国际上主推的养殖理念(张继红等, 2018)。然而, 养殖种类的搭配、养殖密度、养殖区的合理布局等是开展 IMTA 的理论基础(杨红生等, 2000)。本研究表明, 实验点马氏珠母贝壳高及 SGR 均显著高于对照点, 且实验点马氏珠母贝壳高在水深为 0.5~0.62 m 时显著高于其他水层; 异枝麒麟菜在水深为 0.60~0.90 m 时生长速率最快, 且异枝麒麟菜的湿重净增重显著高于对照点。与贝、藻单养和混养模式等研究相比(Qian *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2003), 本研究通过引入鱼类网箱养殖单元的鱼贝藻的混养效果显著。鱼类网箱养殖是投饵

型养殖,是本研究养殖模式运转的中心,其养殖过程中产生的鱼类残饵、粪便等微小颗粒物质可有效地被马氏珠母贝摄食并吸收,同时,鲈鱼和马氏珠母贝代谢释放的N、P、Si等无机营养盐被异枝麒麟菜吸收并储存在体内,并释放O₂到该养殖系统中,通过这种养殖方式去除多余的POM和营养盐,进一步实现了营养物质高效循环利用(Chopin *et al.*, 2001; Hayashi, *et al.*, 2008; 张继红等, 2013a,b),同时,鱼贝藻养殖模式的养殖效果显著优于贝藻混养模式。

与贝、藻单养相比,影响鱼贝藻养殖效果的因素则更加复杂。本研究表明,温度、养殖水层、POM及营养盐浓度是影响马氏珠母贝和异枝麒麟菜生长及生理代谢的主要因素。温度是影响海水养殖生物生长的主要因素之一(赖卓欣等, 2019)。近年来,我国北方海域夏季出现水温过高导致扇贝等养殖种类死亡率、藻类养殖种类空缺等问题(高振锟等, 2017)。本研究引入马氏珠母贝、异枝麒麟菜等相对更耐高温的种类到北方海域进行接力养殖,通过有效利用夏季北方海域相对较高的水温特点及网箱养殖区较高的营养盐浓度。结果表明,马氏珠母贝、异枝麒麟菜和鲈鱼的混养模式可以适应北方夏季温度变化,养殖效果显著。养殖水层也是影响贝藻生长的重要因素,马氏珠母贝幼贝单养的吊养深度通常在1.0~1.5或2.0~3.0 m,麒麟菜的吊养深度在20~40 cm范围,其吊养深度主要取决于养殖海域的环境特性(符韶等, 2001; 王爱民等, 2010)。本研究中,实验点马氏珠母贝幼贝、异枝麒麟菜吊养深度分别在0.5~0.62 m和0.60~0.90 m的SGR状况要优于其他水层,可能是该养殖系统中的POM分布特性、营养盐浓度、透明度及水动力条件等因素对贝藻的适宜生长水层产生了影响(Kasim *et al.*, 2017)。本研究RDA结果也表明,温度、养殖深度、POM及营养盐浓度是影响马氏珠母贝和异枝麒麟菜SGR主要因素,因此,在构建鱼贝藻综合养殖模式时,需全面了解不同水层的POM及营养盐浓度等因素的分布特性,进行合理的规划,从而使IMTA养殖系统具有更高的食物产出能力和实现营养物质的高效利用。

3.2 鱼、贝、藻混养系统中的贝藻养殖环境效应

海水鱼类网箱养殖是一种高密度、集约化的养殖方式,给养殖者带来巨大经济、社会效益的同时,网箱周围残饵粪便等有机颗粒物及N、P、Si等无机营养盐负荷不断增大,对环境也造成了一定的负面影响,威胁了海水网箱业的可持续发展(张继红等, 2013a, b)。本研究结果表明,实验点马氏珠母贝的

POM摄食总量和对POM的吸收总量均高于对照点,且实验点异枝麒麟菜的N、P、Si去除总量也高于对照点。马氏珠母贝可作为生物滤器有效去除网箱养殖产生的残饵、粪便等颗粒有机物,滤食性贝类主要通过滤食的方式直接影响水体中的营养物质,通过滤食水体中的颗粒物并将其重新包装成粪便和假粪,从而降低了水体中营养物质的浓度,同时,提高了养殖海域透明度,但滤食性贝类及网箱鱼类在生长代谢过程中,会利用呼吸作用释放CO₂和NH₄⁺-N,在IMTA系统中会降低水中的DO水平及升高DIN浓度,对贝类和鱼类的生长产生负面影响。而本研究通过引入异枝麒麟菜这一藻类养殖单元,利用藻类的生物学特性,吸收并储存网箱养殖产生的N、P、Si营养盐,减轻了网箱养殖对环境的压力,提高了养殖品种的多样性和经济效益对网箱养殖水域的生态环境优化作用显著。

在IMTA系统中,将POM、营养盐作为鱼贝、鱼藻和贝藻之间互利关系的纽带已成为共识(Hayashi *et al.*, 2008; 张继红等, 2013a,b;高桦楠等, 2016),鱼贝藻综合养殖系统中,投饵性养殖单元(主要为鱼类)产生的残饵、粪便和营养盐等物质可转化为非投饵性(滤食性贝类、藻类等)养殖单元的营养物质来源(唐启升等, 2013)。本研究结果表明,与贝藻混养相比,网箱区马氏珠母贝对养殖海区POM的摄食量和吸收量均提高了30.69%,异枝麒麟菜对海区DIN营养盐的去除量提高了12.64%,同时,贝藻将系统内的多余营养物质转化为自身的生物质,提高了养殖品种的多样性和经济效益,本研究为建立浅海鱼贝藻IMTA技术提供了数据支持和理论支撑。

参 考 文 献

- ASHKENAZI D Y, ISRAEL A, ABELSON A. A novel two-stage seaweed integrated multi-trophic aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(1): 246-262
- CHEN P, CHEN Y, MA J, *et al.* Bottom sowing culture technology of *E.gelatianae* in Xisha Reef area. *Journal of Hainan Tropical Ocean University*, 2018, 25(5): 13-17 [陈攀, 陈燕, 马军, 等. 西沙礁盘区琼枝麒麟菜底播养殖技术研究. 海南热带海洋学院学报, 2018, 25(5): 13-17]
- CHOPIN T, BUSCHMANN A H, HALLING C, *et al.* Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key towards sustainability. *Journal of Phycology*, 2001, 37(6): 975-986
- DENG Z H, JIANG S, ZHANG B, *et al.* Ingestion and digestion of pearl oyster (*Pinctada fucata*) on microalgae of different types and concentrations. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 112-118 [邓正华, 姜松, 张博, 等. 合浦珠母贝对不同种类及浓度的单胞藻摄食与消化效果研究. 南

- 方水产科学, 2016, 12(3): 112–118]
- FANG Z, HUANG H Q, BAO S X, *et al.* The preliminary study of *Kappaphycus alvarezii* on absorption of nitrogen and phosphorus in sea water. *Journal of Aquaculture*, 2008, 29(6): 1–4 [方哲, 黄惠琴, 鲍时翔, 等. 异枝麒麟菜对海水中氮、磷吸收的初步研究. *水产养殖*, 2008, 29(6): 1–4]
- FU S, DENG C M, LIANG F L. Mariculture of *Pinotada martensi* and cage improvement for pearl cultivation. *Marine Sciences*, 2001, 25(3): 23–24 [符韶, 邓陈茂, 梁飞龙. 马氏珠母贝养殖与育珠笼具的改进. *海洋科学*, 2001, 25(3): 23–24]
- GAO H N, LI L, ZHENG X, *et al.* Three co-culture patterns of *Pinctada fucata martensii* and macroalgae in circulating aquaculture system. *Journal of Tropical Biology*, 2016, 7(2): 147–152 [高桦楠, 李乐, 郑兴, 等. 循环水系统内马氏珠母贝与 3 种大型藻类的混养状况及水质分析. *热带生物学报*, 2016, 7(2): 147–152]
- GAO Z K, ZHANG J H, LI M, *et al.* Effects of Temperature fluctuation on physiological and immune parameters of scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 148–154 [高振锟, 张继红, 李敏, 等. 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 148–154]
- GUI J F, TANG Q S, LI Z J, *et al.* Aquaculture in China success stories and modern trends. Wiley Blackwell, 2018
- HAYASHI L, YOKOYA N S, SÉRGIO O, *et al.* Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture*, 2008, 277(3/4): 185–191
- KASIM M, MUSTAFA A. Comparison growth of, *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) cultivation in floating cage and longline in Indonesia. *Aquaculture Reports*, 2017, 6: 49–55
- LAI Z X, LIU Y, WANG Q H, *et al.* Cloning of FBP gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 106–114 [赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) FBP 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 106–114]
- NEORI A, CHOPIN T, TROELL M, *et al.* Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 2004, 231(1/2/3/4): 361–391
- QIAN P Y, WU C Y, WU M, *et al.* Integrated cultivation of the red alga *Kappaphycus alvarezii* and the pearl oyster *Pinctada martensi*. *Aquaculture*, 1996, 147(1/2): 21–35
- TANG Q S, FANG J G, ZHANG J H, *et al.* Impacts of multiple stressors on coastal ocean ecosystems and Integrated Multi-trophic Aquaculture. *Progress In Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 1–11 [唐启升, 方建光, 张继红, 等. 多重压力胁迫下近海生态系统与多营养层次综合养殖. *海洋水产研究*, 2013, 34(1): 1–11]
- WANG A M, SHI Y H, WANG Y, *et al.* Biology and new farming techniques of *Pinotada martensi*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010 [王爱民, 石耀华, 王嫣等. 马氏珠母贝生物学与养殖新技术. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010]
- WANG D L. Application and research of the co-culture technique of shellfish and seaweed in China. *Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas*, 2001, 19(1): 78–81 [王德利. 贝藻混养技术在我国海水养殖中的应用与研究. *海洋科学进展*, 2001, 19(1): 78–81]
- WU M, MAK S K K, ZHANG X J, *et al.* The effect of co-cultivation on the pearl yield of *Pinctada martensi* (Dumker). *Aquaculture*, 2003, 221(1/2/3/4): 347–356
- WU C M, GAO H F, DING M L, *et al.* The growth promoting effect of metabolites of *Pinctada martensi* on *Kappaphycus alvarezii*. *Oceanologia et Limnologia Since*, 1997, 28(5): 453–457 [吴汪黔生, 高洪峰, 丁美丽, 等. 合浦珠母贝代谢产物对异枝麒麟菜生长的促进作用. *海洋与湖沼*, 1997, 28(5): 453–457]
- WU W G, ZHANG J H, LIU Y, *et al.* Size-fractionated phytoplankton and its influencing factors in autumn near Zhangzidao Island and its adjacent waters. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(4): 1418–1426 [吴文广, 张继红, 刘毅, 等. 獐子岛及邻近海域秋季浮游植物的粒级结构及其影响因素. *生态学报*, 2018, 38(4): 1418–1426]
- WU W G, ZHANG J H, WANG W, *et al.* Variation of Chl-*a* concentration and its control factors pre-and-post-the-harvest of kelp in Sanggou Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(8): 1178–1186 [吴文广, 张继红, 王巍, 等. 桑沟湾水域叶绿素 *a* 在海带收获前后的变化及其影响因素. *水产学报*, 2015, 39(8): 1178–1186]
- YANG H S, ZHOU Y, WANG J, *et al.* A modelling estimation of carrying capacities for *Chlamys farreri*, *Laminaria japonica* and *Apostichopus japonicus* in Sishiliwan Bay, Yantai, China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(4): 27–31 [杨红生, 周毅, 王健, 等. 烟台四十里湾栉孔扇贝、海带和刺参负荷力的模拟测定. *中国水产科学*, 2000, 7(4): 27–31]
- ZHANG J H, WU T, XU D, *et al.* Feeding on feces, diets and cage farming sediments of *Paralichthys olivaceus* by Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Progress In Fishery Sciences*, 2013a, 34(2): 96–102 [张继红, 吴桃, 徐东, 等. 虾夷扇贝对牙鲆的粪便、残饵及网箱养殖区沉积物的摄食. *渔业科学进展*, 2013a, 34(2): 96–102]
- ZHANG J H, WU T, GAO Y P, *et al.* Feeding behavior of 5 species filter-feeding bivalves on *Paralichthys olivaceus* feed, fecal and sediment particulates in cage farming area. *Journal of Fisheries of China*, 2013b, 37(5): 90–97 [张继红, 吴桃, 高亚平, 等. 5 种滤食性贝类对牙鲆的粪便、残饵及网箱养殖区沉降物的摄食行为. *水产学报*, 2013b, 37(5): 90–97]
- ZHANG J H, REN L H, WEI Y W, *et al.* Ecological environment

and sustainable utilization of biological resources in Sanggou Bay. Beijing: Agricultural Press of China, 2018 [张继红, 任黎华, 魏龔伟, 等. 桑沟湾生态环境与生物资源可持续利用. 北京: 中国农业出版社, 2018]

ZHOU Y, YANG H S. Biodeposition method used in bivalval physio-ecological studies. Chinese Journal of Ecology, 2002, 21(6): 74-76 [周毅, 杨红生. 应用于贝类生理生态研究的生物沉积法. 生态学杂志, 2002, 21(6): 74-76]

(编辑 陈 严)

Analysis of the Effectiveness of the Polyculture of Shellfish and Algae and Influencing Factors in the Xuejiadao Sea Cage Aquaculture Area

WU Wenguang^{1,3}, ZHANG Jihong^{1,2①}, LIU Yi¹, ZHAO Yunxia¹, ZHANG Kunyang¹, WANG Liangliang¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, 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. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract In recent years, environmental pollution and ecological problems caused by cage aquaculture have become increasingly prominent in shallow seas. The cultivation technique of integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) can be applied to minimize the impact of nutrient enrichment from organic fisheries. The IMTA mode was implemented in September to November 2018 in this study, which included fish cage aquaculture, the shellfish *Pinctada martensi*, and the alga *Eucheuma striatum*. The feeding physiology indicators of *P. martensi* and the nutrient uptake rate of *E. striatum* were measured at different temperatures in the laboratory concurrent with conducting field experiments, and the improvement of the water quality in the cage aquaculture area by IMTA of shellfish and algae were compared and analyzed. The results showed that: (1) the specific growth rate (SGR) of *P. martensi* in the marine fish cage area was significantly higher than that in control area, and the average shell height of *P. martensi* in the 0.50~0.62 m water layer in the cage area was significantly higher than the other water layers. (2) *Eucheuma striatum* had the fastest SGR in the 0.60~0.90 m water layer, and the net wet weight gain of *E. striatum* was significantly higher than that in the control area. (3) At 24.45°C, the average feeding rate, absorption rate, and absorption efficiency of *P. martensi* on particulate organic matter were, respectively, (4.13±0.77) mg/h·ind., (1.04±0.24) mg/h·ind., and (25.00±2.51)%, which were significantly higher than those at 20.74°C. Within the experimental temperature range, the absorption rates of nitrogen, phosphorus, and silicon first increased then decreased with increasing temperature, and the maximum values appeared at 30°C. (4) It is estimated that the total amount of filtered particulate organic matter and the total amount of absorbed particulate organic matter by *P. martensi* in the marine fish cage area during the culture experiment was 778.08 g and 144.47 g, respectively, and the total amount of nitrogen, phosphorus, and silicon removed by *E. striatum* in the marine fish cage area was 8.55 g, 1.11 g, and 9.18 g, respectively; all the above indicators were higher than those in the control area. Temperature, depth of cultivation, particulate organic matter, and nutrient concentrations were the primary factors affecting the growth and physiological metabolism of *P. martensi* and *E. striatum*. This study provides data and theoretical support for the establishment of IMTA technology.

Key words Sea cage mariculture; *Pinctada martensi*; *Eucheuma striatum*; Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA)

① Corresponding author: ZHANG Jihong, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210317002

http://www.ykxjz.cn/

刘义, 梁洲瑞, 余雯雯, 常丽荣, 卢龙飞, 肖露阳, 郑言鑫, 刘福利. 不同离岸距离的养殖海区对海带养殖性状及苗绳老化的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 156-164

LIU Y, LIANG Z R, YU W W, CHANG L R, LU L F, XIAO L Y, ZHENG Y X, LIU F L. Effects of cultivation area of different offshore distances on the agronomic traits and breeding rope aging of *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 156-164

不同离岸距离的养殖海区对海带 养殖性状及苗绳老化的影响*



刘 义^{1,2} 梁洲瑞^{2,3} 余雯雯⁴ 常丽荣⁵ 卢龙飞⁵
肖露阳⁵ 郑言鑫⁶ 刘福利^{2,3①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 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. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090; 5. 威海长青海洋科技股份有限公司 山东 威海 264316; 6. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 山东 烟台 265800)

摘要 本研究选取不同离岸距离的养殖海区(由远到近分别为高区、中区、低区), 研究不同海区环境对3个海带(*Saccharina japonica*)品种/品系(“寻山2号”、“寻山3号”和“205”)的生长性状, 如长度、宽度、厚度、鲜重和干重的影响, 结合不同捻距(80.8、65.6、61.1、53.4和48.3 mm)的养殖苗绳, 分析了影响海带脱苗率的主要因素, 同时, 对比研究了不同海区和苗绳捻距对养殖苗绳力学性能和老化程度的影响。结果显示, 对于相同海带品种/品系, 其长度、宽度和厚度性状在不同海区表现不同, 海带“寻山2号”和海带“寻山3号”在高区具有更优良的经济性状。不同品种海带的鲜重和干重均呈现为在高区较大、中区次之、低区最低, 但离岸养殖对不同品种鲜重与干重的提升作用不同。无论养殖前后, 特制养殖苗绳的断裂强力均显著高于传统养殖苗绳($P<0.05$), 养殖使用1年后, 特制养殖苗绳的强力保持率为93.8%, 而传统养殖苗绳仅为63.6%。捻距为61.1 mm的苗绳脱苗率较低, 捻距过大(80.8 mm)或过小(≤ 53.4 mm)的苗绳脱苗率均显著增大。高区养殖的苗绳分子链氧化更剧烈, 老化程度更高。本研究表明, 离岸式养殖对不同海带品种/品系产量均有提升作用, 但不同品种对不同离岸距离, 尤其是离岸深水区的适应性不同; 通过控制苗绳捻距可有效降低海带脱苗率; 离岸水域环境下进行海带养殖, 选择耐老化、捻距为61.1 mm的特制苗绳可适当延长使用时间并降低脱苗率。本研究结果对推动我国离岸式海带养殖产业发展具有指导作用。

关键词 海带; 离岸距离; 养殖绳性能; 捻距; 脱苗率

* 国家重点研发计划(2018YFD0900305; 2018YFD0901505)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系和烟台科技计划项目(2019MSGY125)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900305; 2018YFD0901505), China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Sciences and Technology Program of Yantai (2019MSGY125)]. 刘 义, E-mail: yiliu055@163.com

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

收稿日期: 2021-03-17, 收修改稿日期: 2021-04-10

中图分类号 S968.42+1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0156-09

海带(*Saccharina japonica*)是我国最重要的养殖海藻之一,具有重要的经济价值。海带是藻胶化工的重要原材料,近年来,在精细化工、医药和生物能源等领域的应用也愈发广泛。海带养殖可发挥消氮固碳、调控水质等生态功能,与水产动物搭配进行的多营养层次综合养殖也越来越受到重视(郑辉等, 2014)。我国已经形成集海带选育、育苗、养殖、加工与生物制品开发等一体化产业链(逢少军等, 2015; 李晓捷, 2015; 袁廷柱等, 2020; 金振辉等, 2009; 徐涛等, 2019)。2019年全国海带总产量达162.40万t, 养殖面积为4.45万 hm^2 (农业农村部渔业渔政管理局等, 2020)。近年来,在全球气候变化、海水污染、海岸工程等多重压力下,以及受海洋生态文明建设大背景下的近海水域保护与利用政策的影响,近岸海藻养殖区被压减或取缔。另外,随着近岸水产养殖产业扩张,近岸适养海区空间有限,养殖密度不断增大,导致养殖海带产量和质量下降。这些因素导致海藻养殖向离岸深水区发展的趋势日益明显(张起信等, 2007; 刘福利等, 2019、2020)。

海带养殖产量不仅与品种/品系、分苗早晚、养殖密度和养殖方式有关,还与海区环境、海区大小等有关(索如瑛, 1960; 李凤晨等, 2003)。养殖区内流速是影响海带产量的重要因素,水深流大的离岸外海区的水温变化幅度小、透明度高、由水体交换频繁带来的自然肥力充足,利于提高海带的产量和品质(卢书长等, 1994; 梁省新等, 2009; 何培民等, 2018; 刘福利等, 2019)。但高海况(浪大、流急)的离岸深水区会使海带的脱苗率增大,藻体折断,对海带的养殖带来很大挑战(刘福利等, 2019)。假根的形态特征是影响海带脱苗率的关键因子,苏丽(2018)研究发现,遗传因素(海带品种/品系)及外界环境因素(如养殖水层、光照)共同决定了海带假根的形态。不同种类海带对离岸养殖环境的适应性不同,传统海带养殖品系、品种大多以高产为选育目标,对不同海带品系的抗风浪能力(如脱苗率、假根发育情况、藻体柔韧性等)关注较少。除了本身的抗风浪能力外,海带与养殖苗绳之间的作用力也是影响脱苗率的关键因素。因此,研究不同材质及不同捻距(反映苗绳的松紧度)的养殖苗绳对海带脱苗率的影响具有重要意义。另外,高海况的离岸深水区也对养殖设施及养殖技术提出了挑战,研发新型绳索材料,增强绳索的破断强力及抗老化性能是应对措施之一(刘福利等, 2019)。

针对上述离岸深水区海带养殖的问题,本研究以海带品种、海区离岸距离、苗绳材质、苗绳捻距4个因素设计实验,探讨不同海带品种/品系在不同海况养殖海区的经济性状(以长度、宽度、厚度、鲜重和干重等表征)和脱苗率,研究不同材质、不同捻距的苗绳对海带脱苗率的影响,探明不同海况海区养殖苗绳的老化程度,以期为我国离岸式海带养殖产业的抗风浪品种选育和新型养殖苗绳研发等提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验海带品种/品系及实验海区

选择的实验海带品种/品系包括“205”、“寻山2号”和“寻山3号”。实验海带的幼苗培育、出库、暂养按照当前海带生产的常规方法和流程进行,夹苗间距约为8cm/株,记录每根苗绳所夹的海带株数。

选择山东省荣成市的爱伦湾海区,设置近岸海区(122°35'23.71"、37°09'32.13")、中间海区(122°35'45.94"、37°08'53.43")和离岸深水区(122°35'28.49"、37°08'26.95")3个养殖点(分别以低区、中区和海区表示)。低区离岸最近,水深约为8m,海区离岸最远,水深约为25m,中区的位置位于低区和海区之间,水深约为15m。每个实验海带品种/品系在每个海区分别养殖6绳。海区组在分苗后养殖15d后脱苗严重,补苗1次。

1.2 苗绳材质和捻距

实验苗绳材质及捻距:使用期小于1年的传统养殖苗绳(捻距为40~60mm,聚乙烯材质,以新绳表示);使用期约为2年的传统养殖苗绳(聚乙烯材质,下文以旧绳表示);2种特制聚乙烯绳(设置捻距分别为65.6和80.8mm);3种特制聚乙烯/聚丙烯共混绳(设置捻距分别为48.3、53.4和61.1mm,苗绳中聚丙烯含量为20%)。捻距越小,绳子越紧,越不易拧动。在中间海区包含所有材质和捻距的苗绳种类(每种2~3根)。由于特制苗绳数量有限,在近岸海区和离岸深水区未设置捻距为65.6和80.82mm的特制聚乙烯绳。

1.3 海带经济性状、脱苗率及苗绳力学参数、老化程度的测量

每个海区每个品种/品系随机挑选30株海带测量其长、宽、厚(从3条旧绳中分别挑选10株)。测量海

带长度和宽度(叶片长度为柄、叶连接处至叶梢末端的距离,宽度取叶片最宽处),测量时间为2020年1、3、5和6月。采用数显测厚仪测量海带厚度(取海带总长度的四等分点处厚度的平均值),测量时间为2020年3、5和6月。

每个海区所有材质和捻距的苗绳种类(每种2~3根)均进行海带脱苗率的观察和统计,统计时间为2020年3和6月。

采用傅立叶红外光谱仪(PerkinElmer 红外光谱仪 Spectrum Two 型)测定养殖苗绳养殖后的老化程度,采用材料试验机(型号为 INSTRON 4466)测定养殖前后苗绳的断裂强力。

1.4 数据分析

使用 SPSS 19.0 统计分析软件进行海带长度、宽度和厚度的 Duncan 多重比较分析,及不同捻距苗绳脱苗率的 *T* 检验分析,显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同海带品种/品系在不同海区的经济性状

2.1.1 海带“寻山2号”的经济性状 海带“寻山2号”在3个海区中不同月份的长度、宽度与厚度变化情况见图1。对于同一月份的不同养殖海区,1月时,海带“寻山2号”各性状无显著差异,1月后各性状表现出不同,其中,在3月时高区和中区组的长度明显大于低区组,厚度则表现为中区与低区、高区相比均呈显著差异($P<0.05$)。海带“寻山2号”的宽度在5月和6月的不同海区均呈现显著差异($P<0.05$),高区组的宽度明显大于低区和中区组。6月,海带“寻山2号”的长度和宽度在高区具有明显优势。对于同一海区不同月份,海带“寻山2号”长度的变化主要发生在1—3月,但都在5月达到最大值,6月与3月相比无显著差异,高区在5月长度变化较3月表现出显著差异($P<0.05$)。海带“寻山2号”在3个海区的

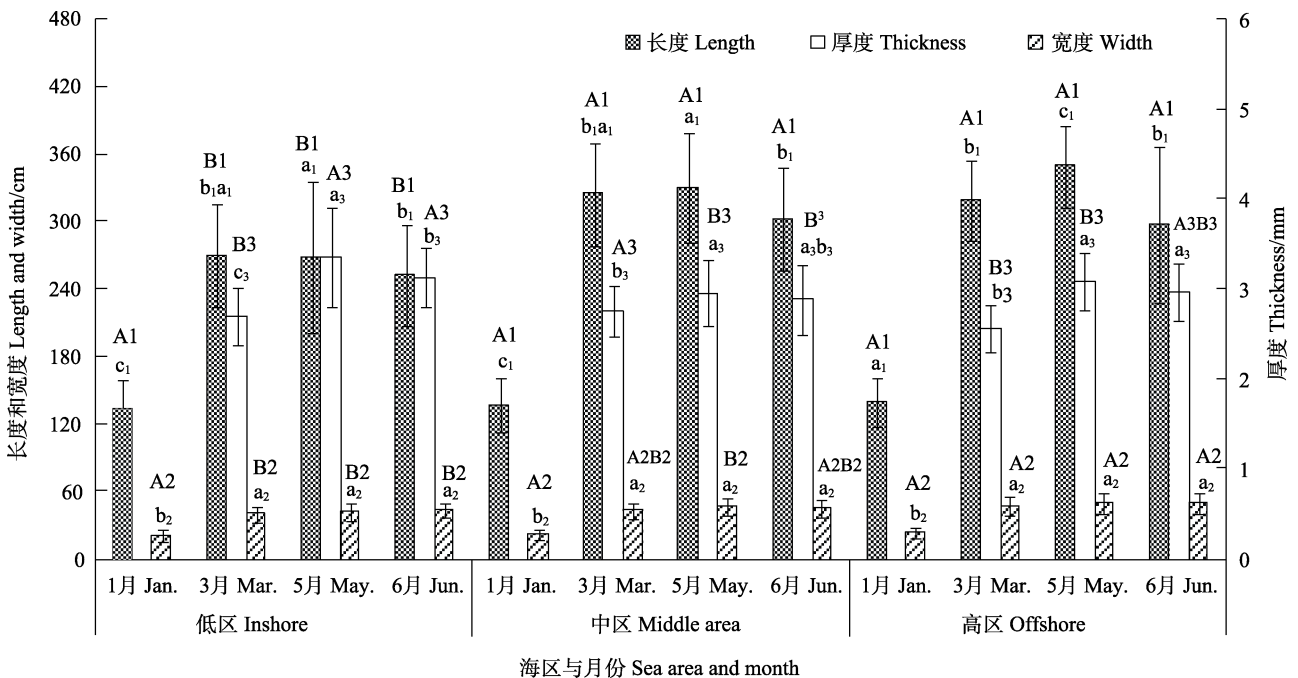


图1 海带“寻山2号”在不同月份、不同海区的长度、宽度和厚度

Fig.1 Length, width and thickness of *S. japonica* strain “Xunshan No.2” in different months and sea areas

不同海区同一月份的多重比较用大写字母作标注(柱状图上的标签上层),同一海区不同月份的多重比较用小写字母作标注(柱状图上的标签下层),同一组的不同字母表示在 $P<0.05$ 水平具有显著差异;

数字 1, 2, 3 分别表示长度、宽度和厚度。下同

Multiple comparisons of the same month in different sea areas were marked with capital letters (upper label on the bar chart), and multiple comparisons of different months in the same sea area were marked with lowercase letters (lower label on the bar chart). Different letters in the same group showed significant differences at the level of $P<0.05$; the numbers 1, 2 and 3 indicated length, width, and thickness respectively. The same as below

宽度变化主要发生在 1—3 月, 厚度在 5 月时较大, 且 5 月的低区组厚度最大。

2.1.2 海带“寻山 3 号”的经济性状 海带“寻山 3 号”在 3 个海区中不同月份的长度、宽度与厚度变化情况见图 2。对于同一月份的不同海区, 高区的海带“寻山 3 号”在 1 月的长度与宽度均显著大于其他海区, 低区组的厚度在 3 月和 5 月均与中区、高区组有显著差异 ($P < 0.05$)。5 月时, 中区和高区的海带“寻山 3 号”长度明显大于低区 ($P < 0.05$), 而低区与中区组的宽度无显著差异, 但二者与高区均呈显著差异 ($P < 0.05$)。6 月, 海带“寻

山 3 号”的长度变化与 5 月一致, 该月高区组的宽度与厚度明显大于中区 ($P < 0.05$)。对于同一海区不同月份, 3 个海区的海带长度都在 5 月达到最大, 3 月与 6 月无显著差异, 尤其在低区, 自 3 月海带达到一定长度后, 未来 3 个月长度的增加效果不明显, 宽度性状在 3 个海区 1、3 和 5 月之间均存在显著差异 ($P < 0.05$), 5 月与 6 月无显著差异, 值得指出的是中区 6 月宽度相较于 5 月有所降低, 并与 3 月无显著差异。

2.1.3 海带“205”的经济性状 海带“205”在 3 个海区中不同月份的长度、宽度与厚度变化情况见图 3。

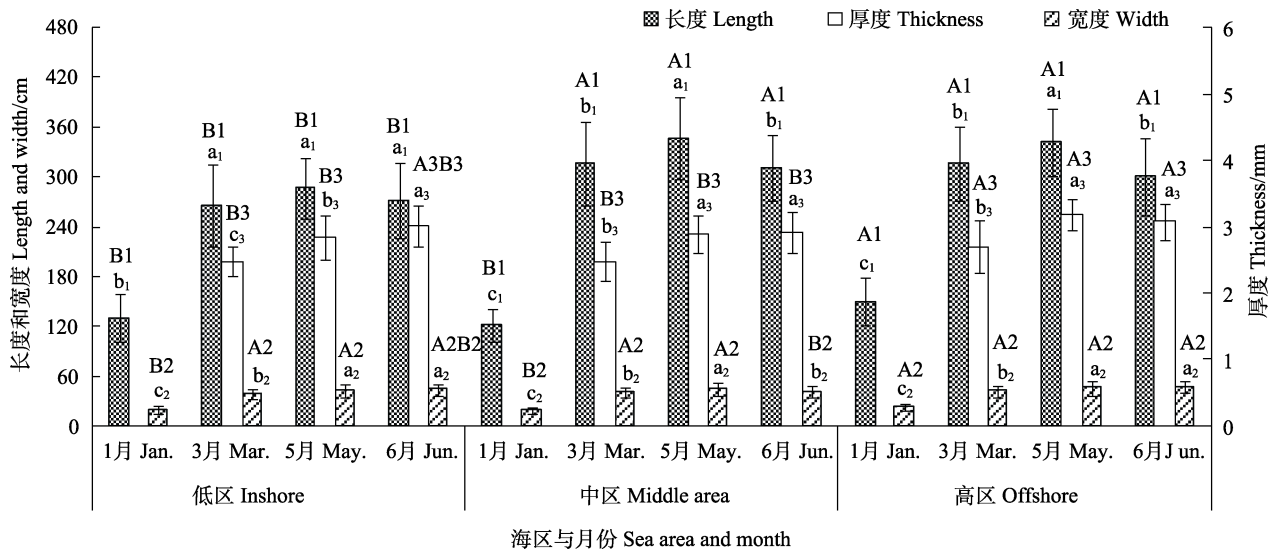


图 2 海带“寻山 3 号”在不同月份、不同海区的长度、宽度和厚度

Fig.2 Length, width and thickness of *S. japonica* strain “Xunshan No. 3” in different months and sea areas

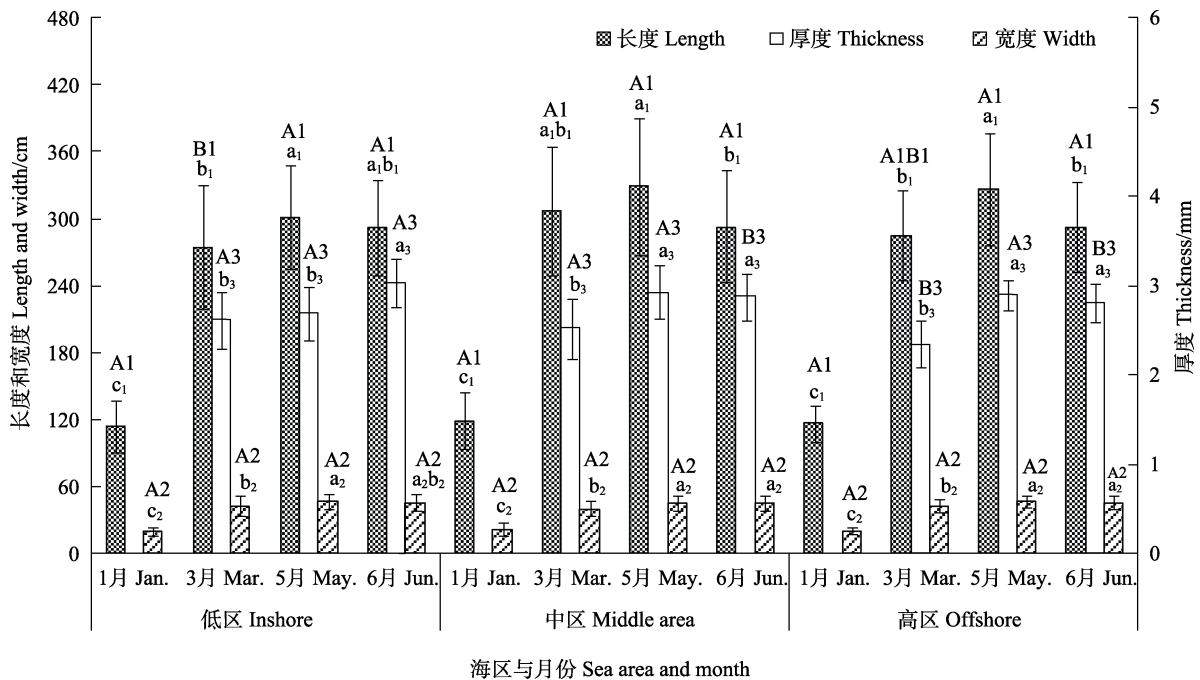


图 3 海带“205”在不同月份、不同海区的长度、宽度和厚度

Fig.3 Length, width and thickness of *S. japonica* variety “205” in different months and sea areas

同一月份不同海区之间比较, 1月长度与宽度均无显著差异, 3月中区的海带长度显著大于低区组 ($P<0.05$), 高区厚度显著大于其他2个海区 ($P<0.05$), 5月和6月3个海区海带长度和宽度无显著差异, 5月低区厚度显著低于其他2个海区 ($P<0.05$)。6月低区海带厚度持续增加, 且显著高于中区和高区组 ($P<0.05$)。同一海区不同月份之间比较, 3个海区海带长度和宽度生长周期均延续到5月, 5月性状最优, 6月中区与高区的长度显著低于5月 ($P<0.05$), 而在低区无显著差异; 宽度在3个海区中5月最大, 6月差异不显著。相比于长度与宽度性状的变化, 厚度变化在中区和高区主要发生在3—5月, 而低区在

3月达到较高水平值后, 6月持续增加, 且高于其他2组。

2.2 不同海区海带养殖产量比较

6月采收时, 3个实验海带品种/品系在3个海区的鲜重与干重见图4。海带的鲜重和干重均在高区最大、中区次之、低区最低。海带的鲜干比整体呈海带“寻山2号”、海带“寻山3号”、海带“205”依次降低的趋势(图5)。随着养殖海区向外海延伸, 海带“205”的鲜干比逐渐增加, 海带“寻山3号”的鲜干比在3个海区变化不大, 中区的海带“寻山2号”的鲜干比明显高于其他海区 ($P<0.05$)。

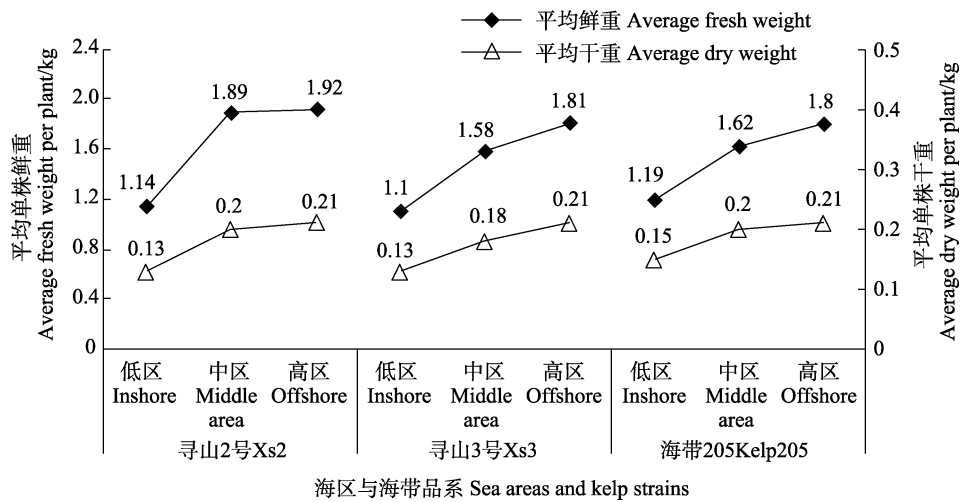


图4 3种海带在不同海区的平均鲜重与平均干重

Fig.4 Average fresh weight and average dry weight of three cultivars of *S. japonica* in different sea areas

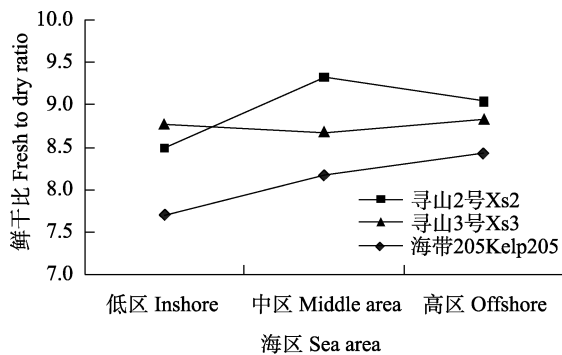


图5 6月3种海带在不同海区的鲜干比

Fig.5 Fresh-dry weight ratio of three *S. japonica* cultivars in different sea areas in June

2.3 不同捻距养殖苗绳的海带脱苗情况

6月海带脱苗情况分析表明, 养殖苗绳的捻距对脱苗率有显著影响。苗绳的捻距为61.1 mm, 脱苗率较低, 捻距过大(80.8 mm)或过小(≤ 53.4 mm)的苗绳脱苗率均显著增大。从图6可以看出, 中区的苗绳脱

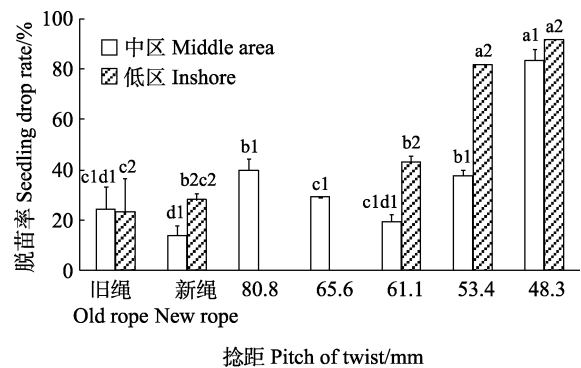


图6 使用不同捻距养殖苗绳在低区和中区的脱苗率
Fig.6 Seedling drop rate of *S. japonica* cultured on breeding ropes with different pitches of twist in inshore and middle sea area

同一组的不同字母表示在 $P<0.05$ 水平具有显著差异, 数字1和2分别表示中区和低区

Different letters in the same group showed significant differences at the level of $P<0.05$, the numbers 1, 2 indicated middle area and inshore, respectively

苗率大小顺序是捻距 48.3 mm (非常紧, 83%)>捻距 80.8 mm (非常松, 40%)>捻距 53.4 mm(较紧, 38%)>捻距 65.6 mm(松, 29%)>普通旧绳 (21%)>捻距 61.1 mm (紧, 20%)>普通新绳 16%, 3 月与 6 月苗绳脱苗率大小顺序基本不变。低区的苗绳脱苗率呈随着捻距减小而增加的趋势。同一海区组, 新绳和旧绳的脱苗率之间无显著差异。高区苗绳脱苗率也呈随着捻距减小而增加的趋势(图 7), 但高区各组之间并无显著差异, 可能与 12 月补苗有关。

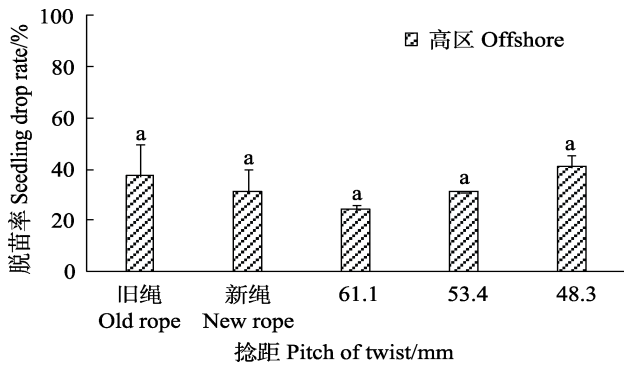


图 7 使用不同捻距养殖绳在高区的脱苗率

Fig.7 Seedling drop rate of *S. japonica* cultured on breeding ropes with different pitches of twist in offshore sea area

2.4 不同养殖苗绳损耗情况

如图 8 所示, 无论养殖前还是养殖后, 特制养殖苗绳的断裂强力均显著高于传统养殖苗绳($P<0.05$)。养殖 1 年后, 特制养殖苗绳的强力保持率为 93.8%, 而传统养殖苗绳仅为 63.6%。

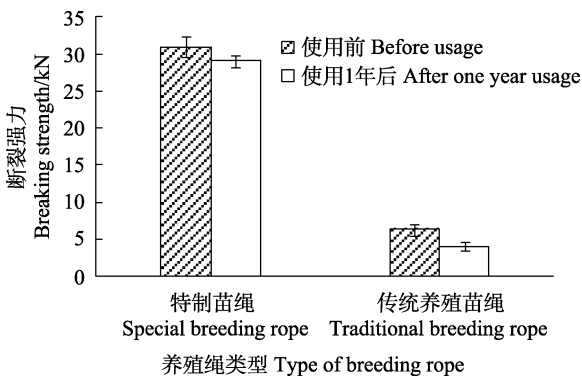


图 8 特制苗绳和传统养殖苗绳养殖使用前后的断裂强力
Fig.8 Breaking strength of special breeding rope and traditional breeding rope before usage and after one year of usage

对养殖使用前后的聚乙烯绳(捻距 65.6 mm)通过红外光谱表征养殖苗绳的老化程度, 与养殖前样品对比, 养殖后样品于 1650 cm^{-1} 处出现了 C=C 共轭双键吸收峰、1740 cm^{-1} 处出现了羰基吸收峰和 1030 cm^{-1} 处出现了 C—O 键吸收峰(图 9)。苗绳养殖使用后的红外光谱

图对比发现, 聚乙烯绳(捻距 80.8 mm)表现出更显著的分子链氧化, 聚乙烯/聚丙烯共混绳(捻距 61.1、48.3 mm)在 1370 cm^{-1} 处出现了一个显著的峰, 这是由于绳索材质是聚丙烯共混改性聚乙烯引起的(图 10)。不同区域养殖的普通旧苗绳红外光谱图显示, 高区养殖苗绳在 1030 cm^{-1} 处出现了更强的 C—O 键吸收峰, 表明高区养殖的苗绳分子链氧化更剧烈、老化程度更高(图 11)。

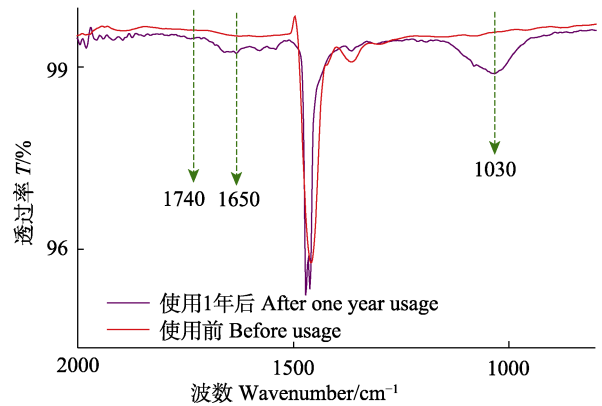


图 9 聚乙烯苗绳(捻距 65.6 mm)养殖 1 年前后的红外光谱
Fig.9 Infrared spectrum of polyethylene breeding rope (pitch of twist 65.6 mm) before usage and after one year usage

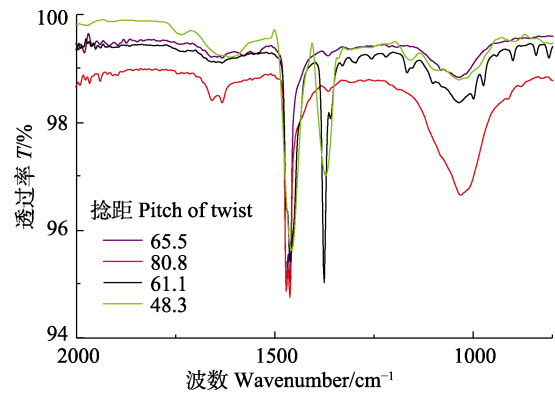


图 10 不同捻距苗绳使用 1 年后的红外光谱
Fig.10 Infrared spectrum of breeding ropes with different pitches of twist after one year usage

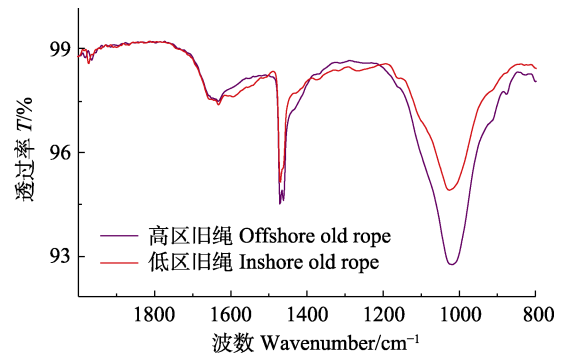


图 11 不同区域养殖的旧苗绳红外光谱
Fig.11 Infrared spectrum of breeding ropes used in different sea areas

3 讨论

由于海区的营养盐、水深、透明度和水流速度的差异,藻类在不同海区表现出不同的生长状态(彭捷等, 2016; Liu *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2018), 通过测定 3 个海带品种/品系在不同海区的经济性状发现, 不同海况的海区对海带的生长存在显著影响。海带“寻山 2 号”的长度和宽度呈从低区到高区逐渐增加的趋势, 而其厚度未表现出该趋势; 海带“寻山 3 号”的长度在高区的整个养殖周期一直维持在较高水平, 在养殖前期(5 月之前), 其厚度呈从低区到高区逐渐增加的趋势, 而养殖后期, 其厚度在不同海区之间无显著差异; 不同海区对海带“205”的长度和宽度性状的影响不大, 但厚度性状在低区表现出持续增加。以上结果表明, 与低区和中区相比, 海带“寻山 2 号”和“寻山 3 号”在高区具有明显的生长优势, 高区水深流大、自然肥力充足、透明度高, 海带生长迅速、产量高(刘福利等, 2019), 而对于海带“205”, 其在高区的经济性状并无明显的优势, 说明应结合海带品种/品系的生长特性选择合适的养殖海区, 如将“寻山 2 号”、“寻山 3 号”在离岸较远的海区养殖, 海带 205 在离岸较近海区养殖。本研究的海带经济性状在 3 个养殖海区均是 5 月时基本达到最大值, 6 月表现出不同程度的回落, 与王翔宇等(2021)和卢书长(1996)的研究结果基本一致, 表明本研究海区及附近海区最佳的海带收获季节是 5—6 月。

从鲜重、干重及鲜干比实验结果分析可知, 不同海带品系的鲜重和干重都随离岸距离的增加而增加, 说明离岸式养殖对不同海带品系产量均有提升作用, 但对不同海带品系的提升作用不同。另外, 鲜干比实验结果分析表明, 不同海区养殖海带的含水量不同, 对食用海带初级加工方式包括淡干海带和盐渍海带出成率的影响也不同(张加幸, 2016)。因此, 可根据养殖海带的品系或品种及其养殖海区选择适宜的加工方式, 以增加海带养殖产值。

聚乙烯分子链在使用后会交联和降解, 导致绳索变硬变脆, 在力学性能上表现为断裂强力的下降。由微观结构分析可推测, 在热氧条件下, 聚乙烯大分子链发生了氧化降解反应, 出现了羰基、双键等新的基团; 随着氧化老化时间的延长, 氧化降解程度越来越严重, 导致分子链断裂、分子量降低, 使拉伸性能下降。本研究发现, 养殖后不同苗绳的断裂强力均显著下降, 但特制的新型养殖苗绳相比于传统养殖苗绳, 在养殖后具有更高的强力保持率, 表明新型养殖苗绳的抗氧化能力较强, 具有较高的抗老化能力。高区养

殖苗绳的老化程度高于低区, 可能与高海况海区的浪大、流急、透明度较高的环境因素有关, 这也说明在高区开展海带养殖活动时, 为提升养殖绳使用年限, 应注意选用抗老化性能更好的绳索材料, 因此, 研发设计抗氧化、抗老化材质的海藻养殖用绳索具有重要意义。

本研究的脱苗率调查结果表明, 捻距过大或过小均会增加海带的脱苗率, 普通新绳的脱苗率低于其他种类苗绳, 由于现阶段使用养殖绳抗老化能力不如特质苗绳, 使用捻距为 61.1 mm 左右的特质苗绳, 可在保证低脱苗率的基础上延长苗绳使用年限。在不同捻距的苗绳脱苗率实验中, 低区脱苗率普遍高于中区, 表明除了苗绳捻距外, 海区环境因素也会影响海带的附着能力。在同样的水流环境中, 海带不同生长阶段的脱苗率不同, 有学者提出在幼苗时期尽量选择缓水流海区(张定民等, 1986), 控制流速 < 20 cm/s, 以避免幼苗大量脱落, 当幼苗生长至一定规格后, 适当增加水流速度, 以促进藻体生长(秦松等, 2019)。因此, 分苗后在流速较小的海区暂养至假根附着牢固后运至离岸海区养殖, 可降低海带脱苗率。另外, 岸上批量集中分苗的操作方式、苗绳运输过程都可能对海带脱苗率产生较大影响(苏丽, 2018)。在实验过程中, 分苗后养殖前期发现, 高区组的海带脱苗严重, 于是在海上进行了一次补苗, 养殖后期发现, 高区的不同捻距苗绳的脱苗率并无显著差异, 且在补苗后高区脱苗率明显低于分苗后的脱苗率, 表明养殖前期的补苗是一个有效降低脱苗影响的措施。

参 考 文 献

- 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 [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]
- 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]
- HWANG E K, HA, D S, PARK C S. The influences of temperature and irradiance on thallus length of *Saccharina japonica* (Phaeophyta) during the early stages of cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30: 2875–2882
- JIN Z H, LIU Y, ZHANG J, *et al.* Breeding actuality and developing direction of *Laminaria* in China. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009(1): 141–150 [金振辉, 刘岩, 张静, 等. 中国海带养殖现状与发展趋势. 海洋湖沼通报, 2009(1): 141–150]
- LI F C, LI Y H. Raft culture technology of kelp. Hebei Fisheries,

- 2003(3): 17, 20 [李凤晨, 李豫红. 海带筏式养殖技术要点. 河北渔业, 2003(3): 17, 20]
- LI X J, CUI C J. A new species of aquaculture: Kelp "Dongfang No.7". China Fisheries, 2015(11): 51-54 [李晓捷, 崔翠菊. 水产养殖新品种: "海带东方7号". 中国水产, 2015(11): 51-54]
- LIANG S X, SHI B Y, HU Z Q. New technology of kelp culture in deep water and large current area. Shandong Fisheries, 2009, 26(6): 42 [梁省新, 史冰玉, 胡志强. 深水大流海区海带养殖新技术. 齐鲁渔业, 2009, 26(6): 42]
- LIU F L, LIANG Z R, ZHANG P Y, *et al.* Preliminary discussion on the development of *Saccharina japonica* offshore aquaculture in China. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 161-166 [刘福利, 梁洲瑞, 张朋艳, 等. 中国海带养殖向离岸深水发展初步探讨. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 161-166]
- LIU F L, NIU J F, SUI Z H, *et al.* Overview and prospects of China economic seaweed cultivation technology. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(12): 1-9 [刘福利, 牛建峰, 隋正红, 等. 中国经济海藻养殖技术概况与展望. 中国农业科技导报, 2020, 22(12): 1-9]
- LIU L, ZOU D H, JIANG H, *et al.* Effects of increased CO₂ and temperature on the growth and Photosynthesis in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* from the coastal waters of South China. Journal of Applied Phycology, 2018, 30: 1271-1280
- LIU S C, LIU D X. Study on the technology of kelp culture in mixed flow sea area. Shandong Fisheries, 1994(4): 4-6 [卢书长, 刘殿秀. 水混流急海域开发海带养殖技术研究. 齐鲁渔业, 1994(4): 4-6]
- LIU S C. Enquiry into harvest time of kelp in Shandong. Shandong Fisheries, 1996(2): 17-18 [卢书长. 对山东省海带收割时间的探讨. 齐鲁渔业, 1996(2): 17-18]
- PANG S J, LIU F, LIU Q S, *et al.* Kelp "205". China Fisheries, 2015(10): 59-60 [潘少军, 刘峰, 刘启顺, 等. 海带"205". 中国水产, 2015(10): 59-60]
- PENG J, CUI C J, ZHANG L N, *et al.* Effects of high temperature stress on survival and physiology of kelp *Laminaria japonica* gametophytes screened by high temperature. Fisheries Science, 2016, 35(1): 32-36 [彭捷, 崔翠菊, 张立楠, 等. 高温胁迫对高温筛选后海带配子体存活率和生理的影响. 水产科学, 2016, 35(1): 32-36]
- QIN S, TIAN T, YANG J, *et al.* Holdfast adhesion of cultured kelp *Saccharina japonica* and sea mustard *Undaria pinnatifida*. Fisheries Science, 2019, 38(1): 34-39 [秦松, 田涛, 杨军, 等. 养殖海带、裙带菜根部附着力初步研究. 水产科学, 2019, 38(1): 34-39]
- SU L. The study on reproduction and cultivation problems related to variety breeding of the economic seaweed *Saccharina japonica*. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018 [苏丽. 与海带品种培育相关的繁殖与栽培问题的研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2018]
- SUO R Y. Kelp close planting. China Fisheries, 1960(2): 10 [索如瑛. 谈谈海带密植问题. 中国水产, 1960(2): 10]
- WANG X Y, SONG H Z, XIN M L, *et al.* Influences of temperature on blade length and width of kelp *Saccharina japonica* from juvenile sporophyte stage. Fisheries Science, 2021, 40(1): 96-102 [王翔宇, 宋洪泽, 辛美丽, 等. 温度对海带幼孢子体后期的叶长、叶宽的影响. 水产科学, 2021, 40(1): 96-102]
- XU T, LIU P, LI K, *et al.* Study on the present situation and development strategy of kelp industry in Shandong Province. Journal of Shandong Normal University (Natural Science), 2019, 34(3): 347-351 [徐涛, 刘朋, 李凯, 等. 山东省海带产业发展现状及发展策略研究. 山东师范大学学报(自然科学版), 2019, 34(3): 347-351]
- YUAN T Z, LIU K, ZHAN D M, *et al.* Optimization test of kelp varieties in Changdao sea area. Hebei Fisheries, 2020(10): 50-52 [袁廷柱, 刘凯, 詹冬梅, 等. 长岛海区海带品种优选试验. 河北渔业, 2020(10): 50-52]
- ZHANG D M, MIAO G R, YANG Q M. Research on the relationship between the coastal current and *Laminaria japonica* raising. Journal of Shandong College of Oceanology, 1986, 16(4): 180-186 [张定民, 缪国荣, 杨清明. 沿岸流与海带养殖关系的研究 II、流速对海带生长的影响. 山东海洋学院学报, 1986, 16(4): 180-186]
- ZHANG J X. Effects of harvest time and processing on extraction and antioxidant activity of fucoidan from fresh kelp. Master's Thesis of Qingdao University of Science and Technology, 2016 [张加幸. 收获期内加工方式对鲜海带岩藻多糖提取及抗氧化活性的影响. 青岛科技大学硕士研究生学位论文, 2016]
- ZHANG Q X, ZHANG Q S, LIU G M, *et al.* An elementary introduction to culturing fish in anti-wave cages. Marine Sciences, 2007, 31(3): 82-83 [张起信, 张启胜, 刘光穆, 等. 浅谈深海抗风浪网箱养鱼业. 海洋科学, 2007, 31(3): 82-83]
- ZHENG H, CUI L T, PAN J. Ecological effect of kelp in polyculture system with *Argopecten irradians*. Fishery Modernization, 2014, 41(3): 26-29 [郑辉, 崔力拓, 潘娟. 海带在贝藻混养生态系统中的生态效应模拟研究. 渔业现代化, 2014, 41(3): 26-29]

Effects of Cultivation Area of Different Offshore Distances on the Agronomic Traits and Breeding Rope Aging of *Saccharina japonica*

LIU Yi^{1,2}, LIANG Zhouhui^{2,3}, YU Wenwen⁴, CHANG Lirong⁵,
LU Longfei⁵, XIAO Luyang⁵, ZHENG Yanxin⁶, LIU Fuli^{2,3①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources (Shanghai Ocean University), Ministry of Education, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, 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. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 5. Weihai Changqing Ocean Science Technology CO., LTD., Weihai, Shandong 264316, China; 6. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract The trend towards kelp *Saccharina japonica* cultivation in offshore areas is becoming increasingly obvious, but there is no relevant research report on the influence of different offshore distances on the agronomic traits of kelp aquaculture. The factors influencing the growth (length, width, thickness, fresh weight, and dry weight) of kelp and the seedling drop rate were explored for different kelp cultivars ("Xunshan No.2", "Xunshan No.3", kelp "205"), offshore sea areas (from far to near, defined as offshore, middle area and inshore), and pitches of twist kelp breeding rope (80.8 mm, 65.6 mm, 61.1 mm, 53.4 mm, 48.3 mm); the mechanical properties and aging degree of the breeding rope were also investigated. The results showed that: for the same kelp cultivar in different sea areas, the length, width, and thickness properties of the blade were different. The cultivars "Xunshan 2" and "Xunshan 3" showed better economic traits in the offshore area. The fresh and dry weights of the different cultivars were higher in the offshore area, followed by the middle area, and were lowest in the inshore area; however, offshore cultivation had different effects on the fresh and dry weight enhancement of the different cultivars. Whether before or after use, the breaking strength of the special breeding rope was significantly higher than that of the traditional breeding rope ($P < 0.05$). After using a year, the strength retention rate of the special breeding rope was 93.8%, whereas that of the traditional breeding rope was only 63.6%. The seedling drop rate of the breeding ropes with a twist pitch of approximately 61.1 mm was the lowest, and the seedling drop rate significantly increased if the pitch of twist of the breeding ropes was too large (80.8 mm) or too small (≤ 53.4 mm). The molecular chain of the breeding rope used in the offshore was oxidized more severely, and the degree of aging was higher. The above results showed that offshore aquaculture can improve the yield of different kelp cultivars, but different cultivars have different adaptabilities to different offshore distances; and controlling the pitch of twist of the culture rope can effectively reduce the kelp seedling drop rate. For kelp culture under offshore sea conditions, a special rope with aging resistance and a twist pitch of approximately 61.1 mm can prolong the use time and reduce the rate of seedling drop. The results of this study can guide the development of the offshore kelp culture industry.

Key words *Saccharina japonica*; Offshore distance; Breeding rope performance; Pitch of twist; Seedling drop rate

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210326002

http://www.yykxjz.cn/

阎永伟, 杨慧超, 莫照兰, 李杰. 患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 165–175
YAN Y W, YANG H C, MO Z L, LI J. Epiphytic microbial communities associated with *Neopyropia yezoensis* with *Oplidiopsis* disease. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 165–175

患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析*

阎永伟¹ 杨慧超^{1,2} 莫照兰^{1,2,3} 李杰^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

3. 中国海洋大学三亚海洋研究院 热带海洋生物种质资源开发与种业工程实验室 海南 三亚 572024)

摘要 拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜(*Porphyra sensu lato*)的主要病害之一,常引起紫菜大面积病烂并造成严重经济损失。本研究利用拟油壶菌感染海区内不同健康状态下的条斑紫菜(*Neopyropia yezoensis*)[未发生任何病烂(PyOlpH)、部分紫菜发生病烂(PyOlpM)和发生严重病烂(PyOlpS)],分析其附生菌群多样性、群落结构和主要类群之间的相互作用。结果显示,3种紫菜附生菌群 α 多样性指数不存在显著差异,但PyOlpM组指数高于其他组。3种紫菜附生菌群共有可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数仅占总 OTU 数的 22.7%,菌群之间存在显著差异(置换多元方差分析, $R^2=0.405$, $P<0.05$)。紫菜感染程度越高,与PyOlpH之间的差异类群数量越多。共注释出 23 门 208 属, α -变形菌纲(α -Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)在所有样品中均占优势,相对丰度前 20 个属中有 16 个也位于这 3 个类群中,且随着感染程度的增加分别出现递增或递减的趋势。其中,贪铜菌属(*Cupriavidus*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)是共现网络中连接度最高的细菌类群,二者及其依靠正相互作用连接的细菌类群之间存在负相互作用。本研究可为阐明拟油壶菌致病的微生态机制及寻找生防细菌提供一定的数据支持。

关键词 条斑紫菜; 拟油壶菌病; 附生菌群; 细菌互作

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0165-11

紫菜(*Porphyra sensu lato*, 亦称 laver)是一种深受世界人民喜爱的高营养价值海洋红藻,其广泛栽培主要集中在韩国和日本等亚洲国家。由于部分海区的水质贫瘠、潮流不通、水体污染、温度不适、养殖管理不当等因素,近年来我国紫菜栽培业饱受频发病害的困扰(黄健等, 2000),部分栽培海区的病烂面积可达 40%~50% (Yan *et al.*, 2019; 何礼娟等, 2021)。拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜的重要病害之一,可在短时间内蔓延并导致大面积

病烂(Klochkova *et al.*, 2016)。已确定该病原属于专性细胞内寄生的卵菌纲拟油壶菌属(*Oplidiopsis*),已发现的 *Oplidiopsis pyropiae*、*O. porphyrae*、*O. porphyrae* var. *korenae*、*O. porphyrae* var. *scotiae*、*Oplidiopsis bostrychia*、*O. heterosiphoniae* 以及 *O. muelleri* 等 7 种菌均具有感染紫菜的能力(West *et al.*, 2006; Sekimoto *et al.*, 2008、2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017; Badis *et al.*, 2019)。我国最早于 1992 年在江苏省南部栽培的条斑紫菜(*Neopyropia yezoensis*, 原名

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 阎永伟, E-mail: yanyw@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 李杰, 副研究员, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-26, 收修改稿日期: 2021-04-19

Pyropia yezoensis [Yang *et al.*, 2020])中发现该病(马家海, 1992), 并先后在栽培条斑紫菜和坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*, 原名 *Porphyra haitanensis* [Yang *et al.*, 2020])中发现感染该病(马家海等, 2007; 刘一萌等, 2012; 何礼娟等, 2021)。拟油壶菌病是对紫菜栽培威胁最大的病害之一, 目前对病原尚没有体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008), 因此, 对其致病机制还知之甚少, 也缺乏对该病害长期有效的防控方法。已经施用的措施包括降低栽培密度、网帘干出以及酸洗等, 但效果并不理想(Kim *et al.*, 2014)。因此, 探索病害发生的机理及其生物防控方法十分有必要。

近年来, 附生细菌逐渐成为探究藻类病害发生机理和生物防控的热点和靶点。这是因为藻类附生细菌除了为藻类生长提供重要的营养物质和生长因子、帮助藻类完成生命周期等重要作用(Goecke *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014), 还与藻类病害密切相关。一方面, 环境胁迫条件下藻类附生微生物的生态失调是导致病害的重要原因。某些致病微生物类群或其毒力相关的功能基因群在受胁迫个体上大量富集并最终致病(Egan *et al.*, 2014、2016)。另一方面, 藻类附生细菌还能通过分泌抗菌物质或群感效应(quorum sensing, QS)抑制剂等次级代谢产物干扰和抵抗致病菌的附着, 保护海藻不受环境中病原的侵染等(Egan *et al.*, 2014)。经统计, 藻类附生细菌中约有 12%~50%的菌株具有抗菌活力, 是生防菌和抗病物质的重要来源(Singh *et al.*, 2015)。

此外, 对植物和动物卵菌病害的研究也充分体现了附生细菌在促病、防病方面的重要作用。一方面, 植物表面附生细菌可产生卵菌毒力必需的细菌毒素或通过共感染以加强卵菌效应基因表达来促进卵菌的致病性(Larousse *et al.*, 2017)。另一方面, 附生细菌能抑制卵菌病原的附着或者利用其基因产物抑制卵菌孢子的萌发及菌丝的生长。例如, 大西洋鲑(*Salmo salar* L.)的卵受水霉病侵染时, 低发病率的鱼卵上附着的高丰度叶居菌属(*Fronidhabitans*)细菌能有效抑制病原的附着(Liu *et al.*, 2014); 而阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)则能利用*fadB*和*fadL*基因表达的氧化酶和蛋白与终极腐霉(*Pythium ultimum*)竞争植物产生的不饱和脂肪酸, 从而抑制腐霉的萌发并达到抑病的效果(van Dijk *et al.*, 2000)。

然而迄今为止, 附生细菌与紫菜拟油壶菌病的关系尚未明确, 一定程度上阻碍了附生细菌在促病、抗病方面的研究进展。因此, 研究紫菜附生细菌与拟油壶菌病之间的关系, 对病害的生物防控具有十分重要的意义。本研究分析了受拟油壶菌病感染的不同健康

状态下的条斑紫菜附生菌群变化, 拟为探究病害发生的微生态机制及寻找潜在生防细菌类群提供一定的基础数据。

1 材料与方 法

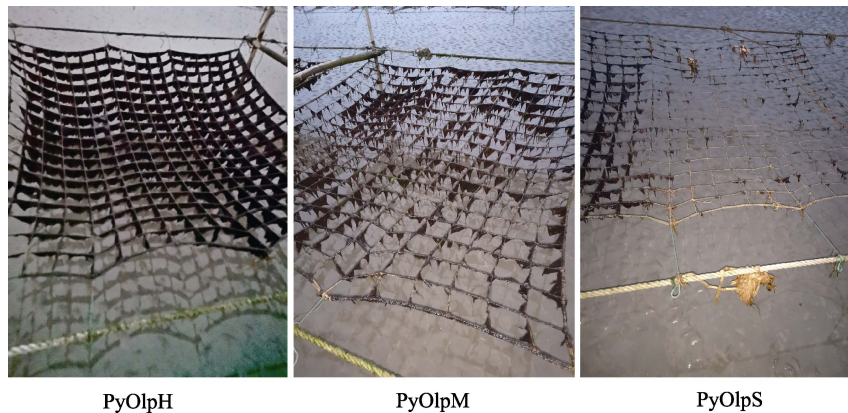
1.1 样品采集

样品采集地点为条斑紫菜的重要栽培区域, 位于江苏省盐城市大丰区沿岸东沙海区(121°03'25.88"E, 33°20'11.28"N), 海区面积约为 1333 hm²。2018 年 10 月—2019 年 1 月, 该海区条斑紫菜栽培面积共约 333 hm²。2019 年 1 月 4 日开始, 约 133 hm²区域条斑紫菜发生病烂, 病烂面积达 40%左右。从该区域选择 3 种不同状况的网帘进行条斑紫菜采样: 网帘上紫菜未发生任何病烂(PyOlpH)、网帘上部分紫菜已发生病烂(PyOlpM)以及网帘上紫菜已经发生严重病烂(PyOlpS)(图 1)。每种类型网帘均采集 3 个生物重复, 每个生物重复采集同一网帘上相对较为完整的多株(30~40 株)条斑紫菜藻体, 均匀混合后置于无菌采样袋中, 同时用无菌采水袋采集网帘下部的原位海水以浸没采样袋中的紫菜样品。采集好的紫菜样品存放于低温保温箱中带回实验室进行后续研究。在每个生物重复中随机挑选 5~6 株条斑紫菜, 通过镜检确认感染情况。然后, 在每个生物重复中再随机挑选 5~6 株紫菜藻体, 混合后用于附生菌群 DNA 提取及微生物群落分析。

1.2 病理观察及病原鉴定

病理观察及病原鉴定过程见何礼娟等(2021)。将紫菜样品用无菌海水冲洗 3~5 次后用灭菌的毛笔去除表面杂质, 并用无菌刀片切取面积约为 1 cm²的条斑紫菜典型病烂部位, 在显微镜下观察后, 记录病烂紫菜的组织病理变化。未发生病烂网帘的紫菜则随机切取相同面积的组织进行显微观察。

用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(思科捷, 青岛)提取 PyOlpM 和 PyOlpS 组样品基因组 DNA, 并分别用真菌 ITS 通用引物 ITS5 和 ITS4 (White *et al.*, 1990)、腐霉(*Pythium*) *cox1* 序列特异引物 *cox1-pyth-F* 和 *cox1-pyth-R* (Lee *et al.*, 2015)以及拟油壶菌 *cox1* 特异引物 *cox1-olpi-F* 和 *cox1-olpi-R* (Kwak *et al.*, 2017)进行 PCR 扩增。最后, PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并将目的片段胶回收、T 载体连接及转化, 将阳性克隆进行测序分析。所得序列在 NCBI 中进行 BLAST 同源性比对, 并在 MEGA-X 软件中用邻接法(Neighbor-Joining, N-J)构建系统发育进化树, 模型选择为 Kimura2-paramete (Bootstrap 设置为 1000)。



PyOlpH

PyOlpM

PyOlpS

图1 不同健康状态下的紫菜栽培网帘比较

Fig.1 Comparison of laver cultivation nets in different statuses

1.3 附生菌群 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

紫菜样品表面附生细菌群落 DNA 提取参照 Burke 等(2009)的方法并做适当修改: 每个生物重复的 5~6 株紫菜藻体先用灭菌海水清洗 3 次以去除松散结合的浮游微生物; 然后, 将藻体置于 15 mL CMFSW 缓冲液(含 0.45 mol/L NaCl、10 mmol/L KCl、7 mmol/L Na₂SO₄ 和 0.5 mmol/L NaHCO₃)中, 并添加 10 mmol/L EDTA 和 150 μL 过滤除菌的快速多酶消化液(3M, 澳大利亚)于室温下孵育 2 h; 移除藻体后, 清液用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)和氯仿: 异戊醇(24: 1)各抽提一次, 取上清液并加入 3 倍体积的无水乙醇和 0.1 倍体积的醋酸钠溶液(3 mol/L, pH 5.2), 混合均匀后于 -20℃ 过夜沉淀; 4℃ 20000 × g 离心 30 min 获得 DNA 沉淀后, 用 70% 的乙醇溶液洗涤 2 次; 最后, 用 200 μL 的无酶灭菌水溶解 DNA 并用琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 片段大小及质量。

取 2 μL DNA, 用 Q5 高保真 DNA 聚合酶及地球微生物组计划(Earth Microbiome Project)推荐的 16S rRNA 基因通用引物 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCG GTAA-3') 和 926R(5'-CCGYCAATYMTTTRAGTTT -3')扩增 V4~V5 可变区(Walters *et al*, 2016)。每个样品进行扩增时, 515F 引物 5'端会附加 6 碱基的 barcode 以对不同样品加以区分。扩增条件: 98℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 25~27 个循环; 72℃ 后延伸 5 min。每个样品的 PCR 产物用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, 美国)切胶回收, 并用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, 美国)对 PCR 产物进行定量。PCR 扩增子在上海派森诺公司用 Illumina MiSeq 平台进行 2×300 的双端测序。

1.4 数据分析

每个样品的双端下机序列用 USEARCH 10.0.240 (Edgar, 2010)进行拼接、质控、去除嵌合体, 并按照 97% 的相似度聚类成可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。采用 RDP classifier 贝叶斯算法在 QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al*, 2010)中基于 SILVA132 数据库对 OTU 代表序列进行分类(cutoff 值设为 0.8)并生成 OTU 表, 将注释为 Unassignable、Unclassified、Chloroplast 以及 Mitochondria 等的 OTU 信息从 OTU 表中去除, 所得 OTU 表用以计算 α 多样性、β 多样性和附生菌群组成等。用 R (R core team, 2014)和 Excel 对微生物多样性及群落进行统计分析, 包括各个类群相对丰度统计、α 多样性指数的单因素方差分析(one-way ANOVA)、韦恩图分析、主坐标分析(PCoA)及置换多元方差分析(PERMANOVA)。

1.5 差异菌群分析

用 LEfSe [line discriminant analysis (LDA) effect size] (Segata *et al*, 2011)分析不同感染程度紫菜与未感染紫菜附生菌群中的差异类群。其中, 本研究中 LEfSe 分析的参数分别设定为 LDA score > 2.5, α = 0.05。

1.6 共现网络分析

用相对丰度前 20 的细菌属构建共现网络(co-occurrence network)。用 psych 包中的 corr.test ()函数在 R 中计算各细菌属间成对的 Spearman 相关系数矩阵, 并用 Gephi 0.9.2 (Bastian *et al*, 2009)对共现网络进行可视化。网络图中的每一个节点(node)均代表某个细菌属, 节点之间的连线(也叫作边, edge)表示 2 个细菌属间具有显著的 Spearman 相关性(|r| > 0.6, 且 FDR 校正的 P < 0.01)。

2 结果

2.1 病理观察及病原鉴定结果

不同状况网帘上紫菜的显微观察结果见图2。如图2所示, PyOlpH组紫菜样品未观察到任何感染迹象。而PyOlpM和PyOlpS组样品在显微镜下观察到紫菜细胞受拟油壶菌感染后呈现的典型病理变化特征(红色箭头), 且后者病变程度明显高于前者。详细的病理观察结果及分析见何礼娟等(2021)。

利用ITS通用引物、腐霉 *cox1* 特异引物及拟油壶菌 *cox1* 特异引物对患病紫菜DNA进行检测, 发现仅ITS通用引物和拟油壶菌 *cox1* 特异引物出现扩增

条带(图3A), 经测序及构建N-J进化树发现该病原与 *O. pyropiae* 聚为一支(图3B), 说明引起大丰地区紫菜病烂的病原为拟油壶菌。

2.2 各样本测序结果统计

各样品16S rRNA基因高通量测序结果见表1。如表1所示, 下机序列经过拼接、质控等预处理, 共获得有效序列283 911条。经过OTU聚类、代表序列注释以及剔除无效序列等, 共获得247 657条高质量序列, 分属于432个OTU。对测序覆盖度进行统计, 结果显示, 各样本Good's coverage指数均大于0.99(表1), 表明该测序深度能够在很大程度上反映各样品中的附生菌群多样性。

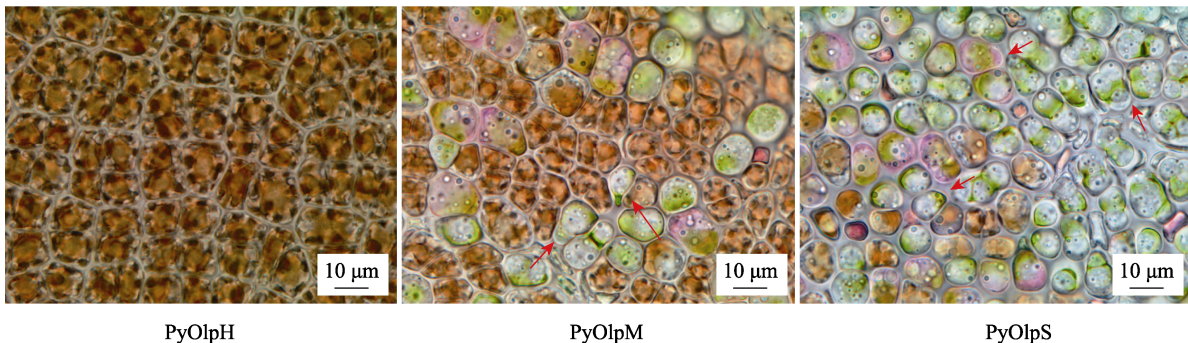


图2 不同状态网帘上条斑紫菜的显微观察

Fig.2 Microscopic observation of *N. yezoensis* on cultivation nets in different statuses

PyOlpS组条斑紫菜显微观察结果引自何礼娟等(2021)

Microscopic observation of *N. yezoensis* in PyOlpS is a quotation from He *et al* (2021)

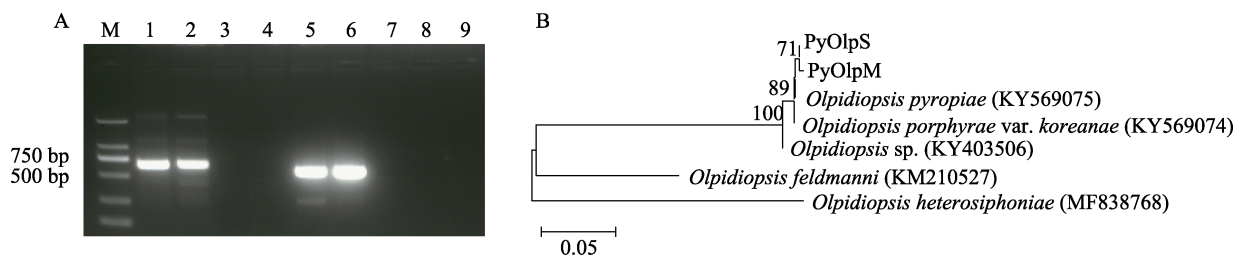


图3 江苏省大丰病烂条斑紫菜病原鉴定

Fig.3 Identification of pathogen causing *N. yezoensis* disease in Dafeng, Jiangsu Province

A: ITS和 *cox1* 基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图; B: 基于 *cox1* 基因构建的N-J系统进化树

A: Argarose gel electrophoresis for the amplification of ITS and *cox1*;

B: N-J phylogenetic tree constructed based on *cox1* gene sequences

M: DL2000 DNA分子量标准; 1、2: 严重和中度病烂紫菜ITS扩增; 3、4: 严重和中度病烂紫菜的腐霉 *cox1* 扩增; 5、6: 严重和中度病烂紫菜的拟油壶菌 *cox1* 扩增; 7、8和9分别为ITS、腐霉 *cox1* 和拟油壶菌 *cox1* 阴性对照(无菌水作模板)
M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: ITS amplification for PyOlpS and PyOlpM; 3, 4: *Pythium cox1* amplification for PyOlpS and PyOlpM; 5, 6: *Olpidiopsis cox1* amplification for PyOlpS and PyOlpM; 7, 8 and 9: Negative controls using sterilized water as template for ITS, *Pythium cox1* and *Olpidiopsis cox1* amplification, respectively

表 1 各样本测序结果统计
Tab.1 Statistics of the sequencing results of all samples

样品 Sample ID	原始序列 Raw reads	拼接 Merged	OTU 数 OTU No.	OTU 表中序列数 Sequence No. in OTU table	Good's coverage
PyOlpH1	31 240 × 2	30 431	108	22 963	0.999
PyOlpH2	30 832 × 2	29 863	116	23 377	1.000
PyOlpH3	37 366 × 2	35 249	146	32 601	0.999
PyOlpM1	40 263 × 2	38 097	134	32 430	1.000
PyOlpM2	39 302 × 2	37 238	129	31 060	0.999
PyOlpM3	39 741 × 2	38 732	152	30 002	0.999
PyOlpS1	34 329 × 2	32 500	116	28 579	0.999
PyOlpS2	35 833 × 2	33 815	150	21 950	0.999
PyOlpS3	34 855 × 2	32 869	111	24 695	0.999

2.3 α 多样性和 β 多样性

用 Observed species (Obs)、Chao1、PD whole tree (PD)和 Shannon 等指数来表征 α 多样性(图 4)。各组之间的多样性差异均不显著($P>0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test)。但是, PyOlpM 组样品的 4 个 α 多样性指数(分别为 133.00、143.00、11.01 和 5.30)均高于 PyOlpH 组(分别为 122.00、134.00、10.40 和 5.26)和 PyOlpS 组(分别为 125.00、132.00、9.91 和 4.41), 而 PyOlpS 组除了 Obs 高于 PyOlpH 组外, 其余指数也均低于 PyOlpH 组。

根据各组间附生菌群落结构多样性的相互关系

在 OTU 水平上绘制了韦恩图(图 5A)。结果显示, 3 组样品特有的 OTU 分别为 77、86 和 92 个。有 98 个 OTU 在 3 组样品中均存在, 占 OTU 总数的 22.7%。3 组样品两两之间也存在共有 OTU, 其中, PyOlpH 和 PyOlpM 之间共有 31 个, PyOlpM 和 PyOlpS 之间共有 30 个 OTU, 而 PyOlpH 和 PyOlpS 之间仅共有 18 个 OTU。基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 显示, 紫菜附生菌群可根据条斑紫菜被侵染的程度而分开(PCo1 解释度为 41.4%), 表明不同状态紫菜附生菌群之间存在明显差异(图 5B)。基于 Bray-Curtis 距离的 PERMANOVA 表明, 这种组间差异具有显著性($R^2=0.405$, $P=0.042<0.05$)。

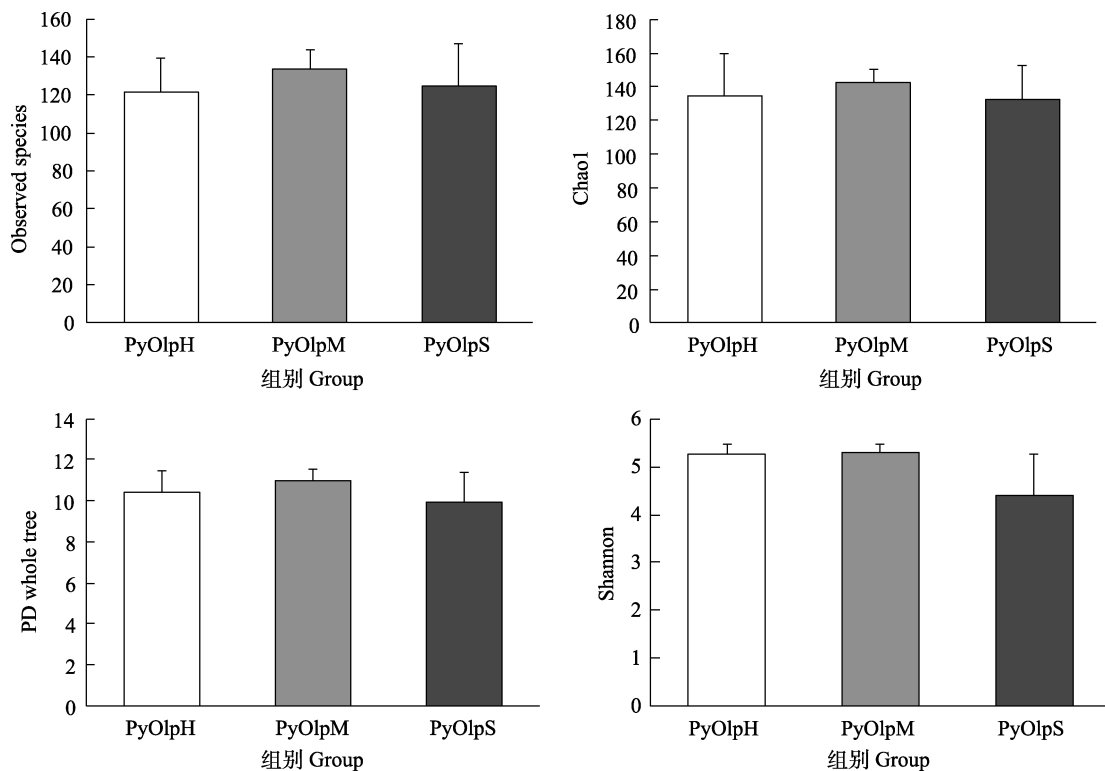


图 4 不同状态紫菜附生菌群的 α 多样性指数比较

Fig.4 Comparison of α diversity indices of epiphytic microbial communities of *N. yezoensis* in different statuses

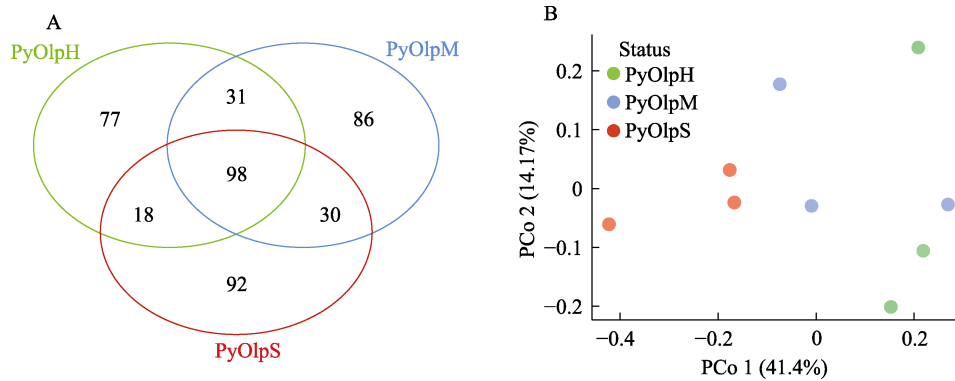


图 5 基于 OTU 的韦恩图分析(A)和主坐标分析(B)
Fig.5 Venn diagram (A) and principal co-ordinates analysis (B) based on OTU

2.4 微生物群落组成及差异分析

经过序列注释及分类信息统计, 所得高质量序列共注释出 23 门 208 属。其中, 变形菌门(Proteobacteria)中的 α -变形菌纲(α -Proteobacteria)和 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)以及厚壁菌门(Firmicutes)在所有样品中均占优势, 在 PyOlpH、PyOlpM 和 PyOlpS 组中共分别占 84.7%、83.4%和 88.0% (图 6)。 α -变形菌纲(PyOlpH: 26.91%; PyOlpM: 24.59%; PyOlpS: 20.44%) 和厚壁菌门(PyOlpH: 17.29%; PyOlpM: 9.56%; PyOlpS: 5.95%) 相对丰度随着感染程度增加呈递减趋势, 而 γ -变形菌纲相对丰度(PyOlpH: 40.5%; PyOlpM: 49.2%; PyOlpS: 61.6%) 则随着感染程度增加呈递增趋势。

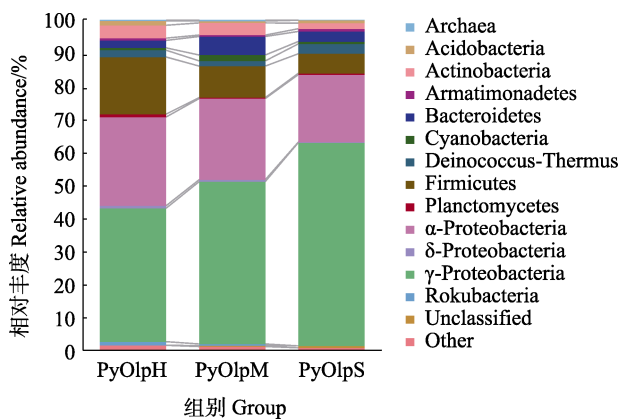


图 6 不同状态条斑紫菜附生菌群在门(或变形菌纲)水平上的相对丰度变化

Fig.6 Changes in relative abundance of epiphytic microbial communities of *N. yezoensis* in different statuses at the phylum or Proteobacterial level

从细菌属水平来看, 相对丰度前 20 的细菌属中共有 16 个属分布于 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲和厚壁菌门(图 7)。例如, α -变形菌纲中的甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和柄杆菌属(*Caulobacter*), 前二者相对丰度随着感染

程度的增加而降低, 而后者则相反; γ -变形菌纲中的贪铜菌属(*Cupriavidus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和 *Methyloversatilis* 属的相对丰度均随感染程度增加而增加; 厚壁菌门中的 *Kroppenstedtia* 属的相对丰度随感染程度增加而减少。

LefSe 分析得到的差异菌群结果显示, PyOlpM 与 PyOlpH 的附生菌群之间共有 16 个类群存在相对丰度的显著差异, 其中鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)细菌在 PyOlpH 中显著富集, 而黄单胞菌目(Xanthomonadales)则在 PyOlpM 中显著富集(图 8A)。PyOlpS 与 PyOlpH 的附生菌群之间相对丰度存在显著差异的菌群数量则达到 37 个, 如 PyOlpS 中的假单胞菌目(Pseudomonadales)和柄杆菌目(Caulobacteriales), 表明有更多的细菌类群参与到拟油壶菌的后期感染中(图 8B)。

2.5 附生细菌的共现网络分析

利用相对丰度前 20 的细菌属构建了一个节点数为 18、边数为 27 的共现网络, 每个节点的平均度为 3, 表示平均每个细菌属连接 3 个其他细菌属, 正相互作用的边数为 14 (51.85%), 负相互作用的边数为 13 (48.15%)。其中, 贪铜菌属的度为最高(8), 且与柄杆菌属、假单胞菌属和 *Methyloversatilis* 属之间存在正相互作用(图 9); 鞘氨醇单胞菌属的度次之(7), 该属细菌与甲基杆菌属、酸杆菌属(*Acidibacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)以及高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)之间存在正相互作用, 且这些细菌属均与贪铜菌属细菌或与贪铜菌属细菌存在正相互作用的细菌类群之间具有负相互作用(图 9)。

3 讨论

本研究以江苏省大丰区某栽培海区遭受拟油壶菌感染的条斑紫菜为研究对象, 分析了不同感染状态下条斑紫菜附生菌群的多样性和组成差异以及主要

	PyOlpH			PyOlpM			PyOlpS		
α -Proteobacteria_Methylobacterium	7.49%	10.07%	9.97%	12.50%	5.61%	5.15%	4.19%	5.03%	0.48%
α -Proteobacteria_Caulobacter	0.08%	4.14%	6.05%	0.26%	7.95%	4.85%	5.36%	12.05%	11.62%
γ -Proteobacteria_Cupriavidus	2.66%	3.47%	2.83%	2.71%	4.66%	6.84%	7.42%	7.49%	13.17%
α -Proteobacteria_Sphingomonas	6.78%	9.27%	8.00%	6.64%	5.61%	5.15%	3.69%	3.64%	1.62%
γ -Proteobacteria_Pseudomonas	0.88%	3.19%	2.70%	3.90%	2.67%	3.94%	5.32%	7.28%	8.01%
γ -Proteobacteria_Methyloversatilis	1.48%	0.01%	2.32%	1.99%	3.33%	5.65%	3.70%	7.33%	8.64%
Firmicutes_Kroppenstedtia	4.44%	2.96%	8.65%	7.46%	3.29%	1.12%	1.48%	3.47%	0.11%
γ -Proteobacteria_Herbaspirillum	5.13%	5.76%	1.89%	2.53%	7.43%	2.53%	1.43%	4.61%	0.06%
α -Proteobacteria_Ochrobactrum	3.11%	3.97%	4.13%	5.49%	2.62%	3.17%	2.48%	2.13%	0.18%
γ -Proteobacteria_Acinetobacter	2.23%	1.97%	3.50%	4.81%	1.18%	2.00%	1.66%	1.73%	0.67%
Deinococcus-Thermus_Thermus	0.10%	1.62%	1.59%	0.36%	2.33%	0.92%	4.74%	1.23%	1.69%
γ -Proteobacteria_Ralstonia	1.97%	0.05%	0.63%	0.01%	0.80%	4.43%	1.39%	1.23%	2.43%
Firmicutes_Thermoactinomyces	6.20%	0.03%	3.41%	2.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Bacteroidetes_Vibrionimonas	0.72%	1.99%	0.91%	3.93%	0.94%	0.33%	0.12%	1.82%	0.03%
Firmicutes_Geobacillus	0.00%	3.10%	0.02%	0.00%	2.94%	0.00%	1.97%	0.01%	2.69%
γ -Proteobacteria_Delftia	0.87%	1.78%	1.71%	0.09%	1.77%	0.26%	0.82%	0.31%	1.94%
Actinobacteria_Rhodococcus	2.26%	1.15%	0.30%	1.85%	1.48%	0.64%	1.34%	0.50%	0.01%
Cyanobacteria_Cyanobium PCC-6307	1.64%	0.01%	0.00%	1.97%	1.72%	1.27%	0.43%	0.94%	0.00%
γ -Proteobacteria_Acidibacter	1.16%	1.72%	0.93%	1.07%	1.46%	0.31%	0.17%	0.49%	0.04%
Firmicutes_Lactobacillus	5.16%	0.00%	0.33%	0.00%	0.01%	0.77%	0.44%	0.00%	0.00%
Firmicutes_Scopulibacillus	0.00%	1.29%	0.44%	0.79%	0.00%	0.34%	2.63%	0.32%	0.14%
Firmicutes_Anoxybacillus	1.49%	0.00%	0.60%	1.57%	0.00%	0.05%	0.62%	0.75%	0.85%
Firmicutes_Bacillus	0.07%	2.01%	0.36%	1.13%	0.00%	1.42%	0.10%	0.21%	0.00%
Actinobacteria_Brevibacterium	0.00%	0.98%	2.31%	0.41%	0.64%	0.15%	0.51%	0.00%	0.00%
α -Proteobacteria_Asticcacaulis	0.00%	0.00%	0.38%	0.00%	0.72%	0.01%	1.56%	0.68%	1.51%
Firmicutes_Faecalibaculum	0.00%	4.80%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
Deinococcus-Thermus_Deinococcus	0.17%	0.44%	1.83%	0.27%	0.64%	0.12%	1.00%	0.15%	0.20%
Actinobacteria_Amycolatopsis	0.68%	0.36%	0.78%	0.77%	0.38%	0.53%	0.72%	0.35%	0.03%
γ -Proteobacteria_Stenotrophomonas	0.01%	0.14%	0.21%	0.56%	1.57%	0.55%	0.00%	1.41%	0.04%
γ -Proteobacteria_Polaromonas	0.00%	1.87%	2.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

图 7 不同状态条斑紫菜附生菌群中前 30 个细菌属的相对丰度热图

Fig.7 Relative abundance heatmap of the top 30 bacterial genera in epibacterial communities of *N. yezoensis* in different health statuses

绿色表示相对丰度较高(>1%)的属, 红色表示相对丰度较低(<1%)的属

Genus with high relative abundance (>1%) are marked in green, and those with low relative abundance (<1%) are marked in red

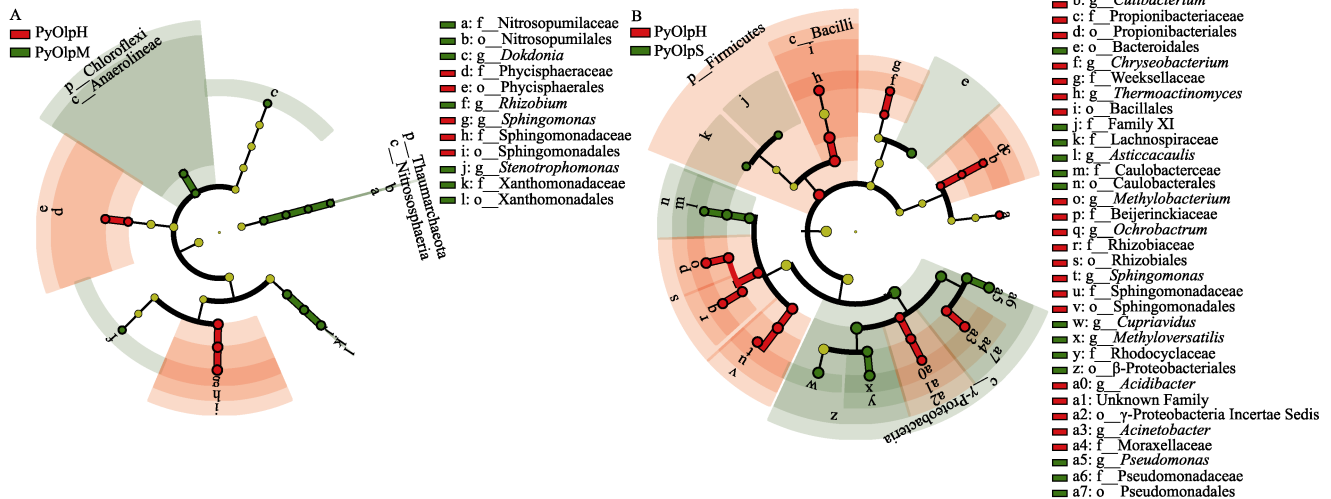


图 8 健康紫菜附生菌群与不同感染程度条斑紫菜附生菌之间的差异菌群分析

Fig.8 Analysis of differential microbial taxa between healthy *N. yezoensis* and those in different infection states

红色表示相对丰度在 PyOlpH 组显著更高的微生物类群, 绿色表示相对丰度在病烂紫菜中显著更高的类群
Microbial taxa with relative abundance significantly higher in PyOlpH are marked in red, and those with relative abundance significantly higher in diseased *N. yezoensis* are marked in green

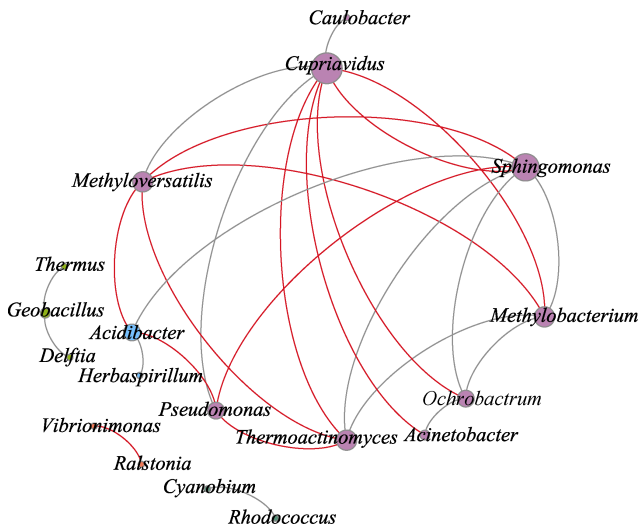


图9 前20个细菌属之间的共现网络

Fig.9 Co-occurrence network of top 20 bacterial genera

节点的大小与某一属连接其他属数量的多少成正相关;

边的粗细与 Spearman 相关系数的大小成正比,

其中灰色的边表示细菌属之间的正显著相互作用,

而红色的边则表示负显著相互作用

The size of each node is proportional to the number of connections. The thickness of the edge is proportional to the Spearman's correlation coefficient. The gray edge indicates significantly positive interaction between bacteria genera, while the red edge indicates significantly negative interaction

主要细菌类群之间的互作关系。

研究结果显示, 附生菌群的 α 多样性指数在不同状态样品之间不存在显著差异。这与赤腐病感染紫菜的菌群多样性变化较为一致(Yan *et al*, 2019)。但两项研究均发现, 初期感染样品附生菌群的 α 多样性指数高于未发生感染样品, 而且 β 多样性的结果显示了不同感染状态样品附生菌群之间存在显著差异, 表明病原的感染与菌群的紊乱密切相关。另外, 拟油壶菌病的发生与栽培环境的变化紧密相关, 如水温的升高、海水盐度的降低、水流交换不佳以及干出时间不足等(马家海, 1992; Klochkova *et al*, 2012、2016)。综合两方面, 与 Egan 等(2016)提出的观点较为符合, 即环境胁迫条件下的微生物生态失调是造成藻类病害发生的主要原因, 因此, 藻类病害的发生发展是一个复杂的微生态过程。

研究表明, 变形菌门和厚壁菌门通常是海藻表面占主导地位的2个细菌类群, 在海藻表面广泛存在的细菌中它们可被看作是“微生物的杂草种类”(microbial weed species), 并且具有多种多样的生物功能, 例如帮助宿主抵抗多种胁迫环境因子、具有高效

的产能系统以及诱导宿主的形态发生和后续的生长, 表明这些类群的细菌对藻类宿主健康的重要性(Singh *et al*, 2014)。由于绝大多数细菌在藻类特别是紫菜叶状体上的功能还没有详尽的解析, 因此, 只能通过细菌在植物等宿主或者环境中的相应功能在一定程度上解析其在本研究中的生态功能。例如, α -变形菌纲中的主要类群(如甲基杆菌属和鞘氨醇单胞菌属)以及 γ -变形菌纲中的假单胞菌属是陆生植物的叶际最常检出的微生物类群。其中, 甲基杆菌属和假单胞菌属都能分泌 AHLs (acyl homoserine lactones), 是植物叶际 QS 的重要参与者, 且后者往往对植物具有致病性, 并通过 QS 分泌胞外聚合物增强其对附着生活的适应性(Vorholt, 2012)。此外, 甲基杆菌属细菌还具有竞争利用植物叶际碳源的功能, 因此, 它可能通过 QS 或底物竞争等形式调节微生物的正常附着和聚集(Vorholt, 2012)。而善于从植物叶际吸收低浓度营养物质的鞘氨醇单胞菌属细菌则对病原假单胞菌的感染具有强烈的抑制作用, 不仅能够抑制感染症状, 还能够减弱病原的生长(Innerebner *et al*, 2011)。另外, 土壤、水体以及植物等环境中常见的贪铜菌属细菌能利用多种碳源进行生长, 并且具有抗生素和消毒剂的抗性, 甚至可导致免疫力低下的人患上严重并发症(Balada-Llasat *et al*, 2010; Khan *et al*, 2016)。这些微生物的生态功能在一定程度上解释了这些细菌类群的相对丰度变化规律, 亦即对宿主健康有益的细菌则相对丰度随着感染程度增加而减少, 不利宿主健康的细菌则反之。

除此之外, 细菌之间的共现网络图也能比较直观地反映细菌的功能和互作关系。比如, 与鞘氨醇单胞菌属细菌具有正相互作用的细菌类群(如甲基杆菌等, 图9蓝色圆圈)往往与假单胞菌和贪铜菌等病害相关的细菌类群(图9紫色圆圈)具有负相互作用, 表明二者之间具有竞争、抑制的作用。这样的负相互作用为抑病生防菌的查找提供了重要的理论指导(Poudel *et al*, 2016)。研究还发现, PyOlpM 比 PyOlpH 组的附生菌群显著富集了黄单胞菌目的细菌, 这类细菌也是植物叶际表面 QS 的参与者之一。Berendsen 等(2018)研究表明, 叶片受霜霉病原菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* 侵染的拟南芥在根际招募黄单胞菌目的黄单胞菌属、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)以及放线菌目(Actinomycetales)的微杆菌属(*Microbacterium*)等细菌协同帮助植物抵抗病害。因此可推测, 拟油壶菌对紫菜的感染也可使宿主招募某些类群的益生菌来抵抗病害。但是, 由于拟油壶菌和霜霉均为内寄生的病原, 而由益生菌诱导出

的宿主抗病力并不足以治愈已经感染的个体 (Berendsen *et al.*, 2018), 因此, 紫菜最终仍会被病原及后续生长起来的其他致病菌感染。

基于本研究结果可提出以下设想: 当环境条件变得适宜拟油壶菌感染时, 紫菜附生菌群发生紊乱并朝着利于病原及其他有害微生物附着生长的方向演变 (如甲基杆菌、鞘氨醇单胞菌丰度的不断降低, 贪铜菌和假单胞菌丰度的不断升高), 这使得拟油壶菌病原不断附着到紫菜上并感染、杀死宿主细胞; 随着病原的持续感染, 虽然紫菜会招募一些益生菌 (如黄单胞菌目细菌) 来帮助其抗病, 但不足以使其痊愈; 贪铜菌和假单胞菌等有害细菌通过不断增殖甚至产生抵抗抗生素和消毒剂的能力, 导致病害难以控制, 紫菜组织持续腐烂并凋亡。

综上所述, 本研究探究了遭受拟油壶菌感染后不同健康状态下条斑紫菜的附生菌群多样性、群落结构和主要类群之间的相互作用, 发现不同健康状态下的紫菜附生菌群存在明显差异, 且主要细菌类群之间存在显著的互作关系, 表明附生菌群的变化和互作在病害发生过程中起到了重要的作用。这些结果为阐明拟油壶菌致病的微生态机制及寻找生防细菌提供了一定的数据支持, 今后仍需要大量实验验证发病的生态机制及附生细菌的生物功能。

参 考 文 献

- BADIS Y, KLOCHKOVA T A, STRITTMATTER M, *et al.* Novel species of the oomycete *Olpidiopsis* potentially threaten European red algal cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(2): 1239–1250
- BALADA-LLASAT J M, ELKINS C, SWYERS L, *et al.* Pseudo-outbreak of *Cupriavidus pauculus* infection at an outpatient clinic related to rinsing culturette swabs in tap water. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(7): 2645–2647
- BASTIAN M, HEYMANN S, JACOMY M. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. Dublin: Third International ICWSM Conference, 2009, 361–362
- BERENDSEN R L, VISMANS G, YU K, *et al.* Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 2018, 12(6): 1496–1507
- BURKE C, STAFFAN K, TORSTEN T. Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 252–256
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336
- EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461
- EGAN S, FERNANDES N D, KUMAR V, *et al.* Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 925–938
- EGAN S, GARDINER M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 991
- GOECKE F, LABES A, WIESE J, *et al.* Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 409: 267–299
- HE L J, YANG H C, LI J, *et al.* Diagnosis of *Oplidiopsis* disease in *Pyropia yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 177–183 [何礼娟, 杨慧超, 李杰, 等. 一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 177–183]
- HUANG J, TANG X X, YAN X J, *et al.* Review and forecast of the study on the disease of kelp and laver in China. *Marine Science*, 2000, 24(9): 26–27 [黄健, 唐学玺, 严小军, 等. 我国海带和紫菜病害的研究展望. *海洋科学*, 2000, 24(9): 26–27]
- INNEREBNER G, KNIEF C, VORHOLT J A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3202–3210
- KHAN S, BEATTIE T K, KNAPP C W, *et al.* Relationship between antibiotic- and disinfectant- resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere*, 2016, 152: 132–141
- KIM G H, MOON K H, KIM J Y, *et al.* A reevaluation of algal diseases in Korean *Pyropia* (*Porphyra*) sea farms and their economic impact. *Algae*, 2014, 29(4): 249–265
- KLOCHKOVA T A, SHIM J B, HWANG M S, *et al.* Host-parasite interactions and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(1): 135–144
- KLOCHKOVA T A, SHIN Y J, MOON K H, *et al.* New species of unicellular obligate parasite, *Olpidiopsis pyropiae* sp. nov., that plagues *Pyropia* sea farms in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 73–83
- KWAK M S, KLOCHKOVA T A, JEONG S, *et al.* *Olpidiopsis porphyrae* var. *koreanae*, an endemic endoparasite infecting cultivated *Pyropia yezoensis* in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(7): 1–10
- LAROUSSE M, GALIANA E. Microbial partnerships of pathogenic Oomycetes. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(1): e1006028
- LEE S J, HWANG M S, PARK M A, *et al.* Molecular

- identification of the algal pathogen *Pythium chondricola* (Oomycetes) from *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) using ITS and *cox1* markers. *Algae*, 2015, 30(3): 217–222
- LIU Y M, MA J H, WEN Q. Simultaneous infection by red rot and olpidiops disease in laver *Porphyra haitanensis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(6): 546–550 [刘一萌, 马家海, 文茜. 坛紫菜赤腐病与拟油壶菌病并发病的初步研究. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 546–550]
- LIU Y, DE BRUIJN I, JACK A L, *et al.* Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *ISME Journal*, 2014, 8(10): 2002–2014
- MA J H, LIN Q S, MIN J, *et al.* Preliminary study on the olpidiops-disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 860–864 [马家海, 林秋生, 闵建, 等. 条斑紫菜拟油壶菌病的初步研究. *水产学报*, 2007, 31(6): 860–864]
- MA J H. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(3/4): 185–188 [马家海. 江苏省南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究. *上海水产大学学报*, 1992, 1(3/4): 185–188]
- POUDEL R, JUMPPONEN A, SCHLATTER D C, *et al.* Microbiome networks: A systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*, 2016, 106(10): 1083–1096
- R CORE Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014
- SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60
- SEKIMOTO S, KLOCHKOVA T A, WEST J A, *et al.* *Olpidiopsis bostrychia* sp. nov.: An endoparasitic oomycete that infects *Bostrychia* and other red algae (Rhodophyta). *Phycologia*, 2009, 48(6): 460–472
- SEKIMOTO S, YOKOO K, KAWAMURA Y, *et al.* Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, straminipiles), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (*Bangiales*, *Rhodophyta*). *Mycological Research*, 2008, 112(3): 361–374
- SINGH R P, KUMARI P, REDDY C R K. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1571–1586
- SINGH R P, REDDY C R K. Seaweed-microbial interactions: Key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(2): 213–230
- VAN DIJK K, NELSON E B. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5340–5347
- VORHOLT J A. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(12): 828–840
- WALTERS W, HYDE E R, BERG-LYONS D, *et al.* Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 2016, 1(1): e00009–15
- WEST J A, KLOCHKOVA T A, KIM G H, *et al.* *Olpidiopsis* sp., an oomycete from Madagascar that infects *Bostrychia* and other red algae: Host species susceptibility. *Phycological Research*, 2006, 54(1): 72–85
- WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* PCR Protocols—A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, 315–322
- YAN Y W, YANG H C, TANG L, *et al.* Compositional shifts of bacterial communities associated with *Pyropia yezoensis* and surrounding seawater co-occurring with red rot disease. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1666
- YANG L E, DENG Y Y, XU G P, *et al.* Redefining *Pyropia* (*Bangiales*, *Rhodophyta*): four new genera, resurrection of *Porphyrella* and description of *Calidia pseudolobata* sp. nov. from China. *Journal of Phycology*, 2020, 56(4): 862–879

(编辑 马瑾艳)

Epiphytic Microbial Communities Associated with *Neopyropia yezoensis* with *Olpidiopsis* Disease

YAN Yongwei¹, YANG Huichao^{1,2}, MO Zhaolan^{1,2,3}, LI Jie^{1①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Tropical Marine Germplasm Resources and Breeding Engineering, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya, Hainan 572024, China)

Abstract *Olpidiopsis* disease is one of the main diseases affecting laver cultivation in the sea, often causing large-scale rot and serious economic losses. Although the oomycetic genus *Olpidiopsis* has been identified as the pathogen, little is known regarding its mechanisms, including its interaction with epiphytic microbial communities. In the present study, diversities, structures, and major interactions of epiphytic microbial communities were analyzed using *Neopyropia yezoensis* in sea infected by *Olpidiopsis*. The *N. yezoensis* used in the experiment had different health statuses, including no infection (PyOlpH), partial infection (PyOlpM), and serious infection (PyOlpS). The results showed that no significant difference was observed for the α diversity indices among microbial communities associated with the three groups of *N. yezoensis*, but those of PyOlpM were higher than the other two. Shared operational taxonomic units (OTUs) among the three groups of communities only accounted for 22.7% of the total OTUs, in addition to significant community dissimilarity (permutational multivariate analysis of variance, $R^2=0.405$, $P<0.05$). More microbial taxa were obtained when communities associated with more seriously infected *N. yezoensis* compared to those associated with PyOlpH. In total, 208 genera belonging to 23 phyla were annotated, and α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, and Firmicutes were dominant in all samples. Sixteen of the top 20 genera were also assigned to the three groups, with their relative abundances increasing or decreasing across the infection status from none to severe. Among them, genera *Cupriavidus* and *Sphingomonas* were the most connected bacterial taxa in the co-occurrence network, and negative interactions were determined between the two taxa and their positively interacting bacterial taxa. This study provides primary datasets for clarifying the microbial ecological mechanisms and searching for probiotics for *Olpidiopsis* disease.

Key words *Neopyropia yezoensis*; *Olpidiopsis* disease; Epiphytic microbial communities; Bacterial interaction

① Corresponding author: LI Jie, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210424001

http://www.yykxjz.cn/

李欣容, 廖梅杰, 李彬, 荣小军, 畅孟阳, 王印庚, 于永翔, 张正, 范瑞用, 刘清兵. 刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 176–185

LI X R, LIAO M J, LI B, RONG X J, CHANG M Y, WANG Y G, YU Y X, ZHANG Z, FAN R Y, LIU Q B. Genomic DNA methylation levels and transcriptome differences of *Apostichopus japonicus* in response to *Vibrio splendidus* infection and their association analysis. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 176–185

刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析*

李欣容^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 李彬^{2,3} 荣小军^{2,3} 畅孟阳^{2,3}
王印庚^{2,3} 于永翔^{2,3} 张正^{2,3} 范瑞用⁴ 刘清兵⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 4. 青岛瑞滋集团有限公司 山东 青岛 266408)

摘要 为探讨病原菌胁迫下刺参(*Apostichopus japonicus*)基因组 DNA 甲基化水平和转录组表达的差异,本研究采用人工攻毒侵染胁迫,获得刺参化皮体壁组织,并以未攻毒组的健康体壁组织为对照,对刺参 2 种体壁组织进行全基因组甲基化测序(WGBS)和转录组高通量测序,解析刺参体壁基因组 DNA 甲基化差异,筛选响应病原胁迫的差异甲基化区域和差异表达基因。同时,通过基因组甲基化和转录组联合分析,筛选负相关关联基因,为解析刺参响应灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)侵染的分子机理提供基础数据。结果显示,刺参对照组和侵染组基因组总甲基化水平分别为(3.59±0.04)%和(3.87±0.27)%,侵染组甲基化水平显著升高;在发生甲基化的位点中,攻毒组和对照组的 mCpG 占比分别为 83.06%和 81.91%,mCpG 为最主要的甲基化形式。本研究共筛选出差异甲基化区域(DMRs) 626 677 个,注释到 23 706 个功能基因。转录组测序共检测到 29 290 个基因,筛选到差异表达基因 496 个,其中,上调基因 214 个,下调基因 282 个。在基因组甲基化与转录组的关联分析中,筛选到 180 个负相关关联基因,其中,差异甲基化区域位于启动子区域的负相关基因为 60 个。对负相关关联基因的 GO 和 KEGG 富集分析,筛选到相关通路和 *LRR*、*hsp20* 和 *CARD* 等关键基因。本研究将为解析刺参抗病的表观遗传调控机制提供数据,也为刺参抗病性状选育提供科学参考。

关键词 刺参; DNA 甲基化; 转录组; 关联分析

中图分类号 S968.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0176-10

仿刺参又称刺参(*Apostichopus japonicus*), 具有重要的营养价值和药用价值,是我国第五次海水养殖

* 国家重点研发计划(2018YFD0901603)、山东省农业良种工程课题(2020LZGC015)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 2021GH05)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901603), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2020LZGC015), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD40; 2021GH05)].

李欣容, E-mail: 1123295662@qq.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-24, 收修改稿日期: 2021-04-27

浪潮的代表性物种之一,其养殖业为我国沿海经济结构调整和渔民增收开辟了一条新途径(王印庚等, 2014)。在人工养殖刺参过程中,刺参的病害问题日益凸显,给刺参养殖业造成了严重的经济损失,严重制约了该产业的稳定发展。开展刺参抗病机制解析对刺参良种选育和病害防控具有重要意义。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式,在不改变 DNA 序列的前提下,改变遗传表现在调控基因表达和染色质构象等方面发挥着重要作用(Moore *et al.*, 2013)。研究表明,刺参在肠道组织再生、夏眠、化皮及倍性等过程或现象中,相关组织均有显著的基因组甲基化水平差异变化,表明甲基化在刺参相关生理过程中发挥重要的调控作用(Yang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021; 高杉等, 2017; 李晓妮, 2018; 赵业, 2015)。本研究以刺参腐皮综合征重要致病原——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)为病原对刺参苗种进行人工攻毒侵染实验,以攻毒后发病个体和未攻毒的健康个体的体壁组织为样本,采用全基因组甲基化测序技术(WGBS)和转录组高通量测序技术,分析灿烂弧菌胁迫下刺参体壁 DNA 甲基化水平变化及基因表达差异变化,并进一步对甲基化位点和转录组差异进行关联分析,筛选出关键位点及关联基因,为解析刺参响应灿烂弧菌感染的分子机制提供基础数据,也有助于为刺参抗病性状选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用健康苗种取自山东青岛瑞滋集团有限公司,选取活力良好、健康的个体,苗种规格为(50.0±2.0)g/只。苗种运回实验室后暂养3d,暂养水温为(13.0±0.5)℃,待苗种状态稳定后用于后续实验。

攻毒用菌株为本团队病原库中保存的分离自患腐皮综合征的刺参病样的灿烂弧菌菌株(AJ-Vb1801)。对该菌株用胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)固体培养基复苏,然后用TSB液体培养基扩大培养。

1.2 实验样品的采集

灿烂弧菌人工攻毒侵染与取样:根据实验目的将实验分为2组,每组设3个平行,每个平行实验苗种数量为30头,实验水槽容积为50L。对照组(PT10H)为在水质良好的自然海水中养殖的健康苗种,侵染组(PT16S)按照水体体积在养殖水槽中添加培养的灿烂弧菌菌液至终浓度 1×10^6 CFU/mL(该浓度为灿烂弧菌对刺参苗种的半致死浓度)。养殖条件:温度(13.0±0.5)℃,盐度(28.0±0.5),每天换1/3水,换水后及时添加灿烂弧

菌菌液,使其维持在 1×10^6 CFU/mL。每天换水后定时投喂刺参配合饲料,投喂量为刺参苗种体重的2%,养殖期间持续充气。实验期间,每天观察刺参苗种的生理状态,及时收集侵染组发生化皮的濒死个体,分别标记为PT16S1、PT16S2和PT16S3,在相同时间节点采集对照组健康个体,分别标记为PT10H1、PT10H2和PT10H3。剖取所采集样品的体壁组织,置于2mL冻存管后迅速放入液氮罐中,送回实验室,-80℃保存,用于后期DNA和RNA的提取。

1.3 DNA 和 RNA 的提取

以对照组和侵染组的体壁组织为材料,分别采用Omega公司的Mollusc DNA kit和QIAGEN RNeasy mini kit提取各样品体壁基因组DNA和RNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA和RNA完整性,NanoDrop核酸测定仪测定所提取核酸样品的纯度,检测合格的样品于-80℃保存备用。

1.4 全基因组 DNA 甲基化测序

将所提取的6个DNA样品送至杭州联川生物技术股份有限公司分别构建甲基化文库,并利用HiSeq4000测序平台150PE上机策略进行测序。

1.5 数据处理与比对

测序完成后对原始数据进行预处理,去除可能含有测序接头序列和低质量的测序数据(含有N的比例大于5%,以及质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整个read的20%以上的reads),得到有效数据,用于后续的生物信息学分析。

以本团队组装的刺参全基因组序列(数据待发表)为基础,对预处理后的有效测序数据使用Bismark(Krueger *et al.*, 2011)进行参考基因组序列比对,统计基因组比对结果。

1.6 刺参体壁基因组 DNA 甲基化分布特征分析

根据基因组比对分析结果,统计所测样品各类型甲基化C位点(mCpG、mCHG和mCHH)的数目,及其在全部mC的位点中所占的比例,解析物种的全基因组DNA甲基化修饰特征。

1.7 差异甲基化区域分析

使用R语言程序包中的methylKit筛选差异甲基化区域(differentially methylated regions, DMRs),默认选择1000bp windows、500bp overlap、 $FDR < 0.05$ 为差异筛选阈值,进行DMR分析。统计差异表达分析中侵染组的甲基化水平显著性升高或下降的基因数

目。对筛选到的具有 DMR 的基因进行注释,按照基因结构绘制柱状统计图。

1.8 转录组中差异表达基因的筛选

将所采集的 6 个样品的 RNA 送至杭州联川生物技术股份有限公司分别构建 cDNA 文库,采用 Illumina Novaseq™ 6000 进行测序,测序读长为双端 2×150 bp (PE150)。使用 String Tie 软件计算不同样品间各基因表达定量的结果,以 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)为单位对已知基因统计其在不同样本中的表达丰度,筛选差异表达基因(different expression genes, DEGs)。

1.9 DNA 甲基化与转录组联合分析

对转录组测序和基因甲基化测序数据进行联合分析,统计 DMRs 和 DEGs 注释的共有基因,检测这些共有基因的 DMR 甲基化水平与 DEG 表达水平之间的相关性,统计 DMR 甲基化水平与 DEG 表达水平存在负相关的基因,分别采用 GOseq 和 KOBAS 软件对筛选到的差异甲基化基因进行 GO 和 KEGG

pathway 富集分析,采用 ggplot2 软件绘制差异甲基化基因的 KEGG 散点图。

2 结果

2.1 甲基化测序结果统计

对实验获得的对照组(PT10H)和侵染组(PT16S)的 6 个样品的 WGBS 测序和数据统计分析结果见表 1。高通量测序平均每个样品产出 165 510 349 条的原始数据,对原始数据进行预处理后,截去测序数据的测序接头和去除低质量的数据,得到均值为 23.20 Gb 的有效数据,有效序列占比在 99.18%以上, Q30 以上的数据占比大于 91.96%,有 37.31%~39.81%的 mapped reads 可比对到刺参的参考基因组,说明测序数据的质量较好。

2.2 基因组中甲基化位点统计

根据基因组比对分析结果,表 2 统计了对照组和侵染组刺参体壁组织中 C 位点以及不同类型(CG、CHG 和 CHH)的平均甲基化水平。侵染组样品基因组

表 1 WGBS 测序数据统计
Tab.1 Statistics of the WGBS sequencing data

组别 Group	样品编号 Sample No.	原始数据序列数 Raw data reads	有效数据 Valid data		有效数据比例 Percentage of valid data /%	Q30/%	比对率 Mapping rate /%
			序列数 Reads	碱基数 Bases			
对照组 PT10H	PT10H1	176 325 924	176 033 898	25.21 G	99.83	92.26	37.31
	PT10H2	161 152 798	160 856 756	22.95 G	99.82	92.14	37.46
	PT10H3	166 891 706	166 500 024	23.53 G	99.77	92.67	38.28
侵染组 PT16S	PT16S1	162 682 240	161 584 352	22.61 G	99.33	92.94	39.81
	PT16S2	155 081 068	153 806 718	21.48 G	99.18	92.72	39.38
	PT16S3	170 928 362	170 077 824	23.44 G	99.50	91.96	39.40

表 2 不同类型 C 位点甲基化水平
Tab.2 Methylation level of different cytosine contexts

组别 Group	样品编号 Sample No.	mC 比例 mC percentage /%	mCpG 比例 mCpG percentage /%	mCHG 比例 mCHG percentage /%	mCHH 比例 mCHH percentage /%
对照组 PT10H	PT10H-1	3.55	24.06	0.53	0.45
	PT10H-2	3.57	24.13	0.54	0.46
	PT10H-3	3.65	24.23	0.61	0.51
	平均值 Mean	3.59±0.04*	24.14±0.07	0.56±0.04*	0.47±0.03*
侵染组 PT16S	PT16S-1	3.92	24.48	1.08	0.78
	PT16S-2	4.17	24.88	1.32	0.96
	PT16S-3	3.52	23.31	0.54	0.53
	平均值 Mean	3.87±0.27	24.22±0.67	0.98±0.33	0.76±0.18

注: *代表有显著差异($P<0.05$)。下同

Note: * represents a significant difference ($P<0.05$). The same as below

甲基化 C 位点占全部 C 位点数的(3.87±0.27)%, 对照组为(3.59±0.04)%, 说明在病原菌感染胁迫下, 基因组甲基化 C 位点占比显著升高($P<0.05$)。不同类型(CpG、CHG 和 CHH)的平均甲基化水平统计结果显示, 对照组 mCpG、mCHG 和 mCHH 占 CpG、CHG 和 CHH 的比例分别为 24.14%、0.56%和 0.47%, 而感染组的 mCpG、mCHG 和 mCHH 占 CpG、CHG 和 CHH 的比例分别为 24.22%、0.98%和 0.76%。由此可见, 对于刺参基因组来说, CpG 位点发生甲基化的比例显著高于 CHG 和 CHH。从对照组和感染组不同类型位点甲基化对比结果可以看出, 感染组的 mCHG 和 mCHH 比例显著高于对照组。

对照组和感染组基因组 DNA 不同形式甲基化 C 位点占总甲基化 C 位点的比例见图 1。如图 1 所示, 在总的 mC 位点中, 感染组和对照组 mCpG 占比分别为 83.06%和 81.91%, mCHH 占比分别为 13.41%和 14.28%, mCHG 占比分别为 3.53%和 3.81%, 说明甲基化位点主要集中在 CpG 二核苷酸序列的胞嘧啶上, CpG 甲基化是主要的甲基化形式。

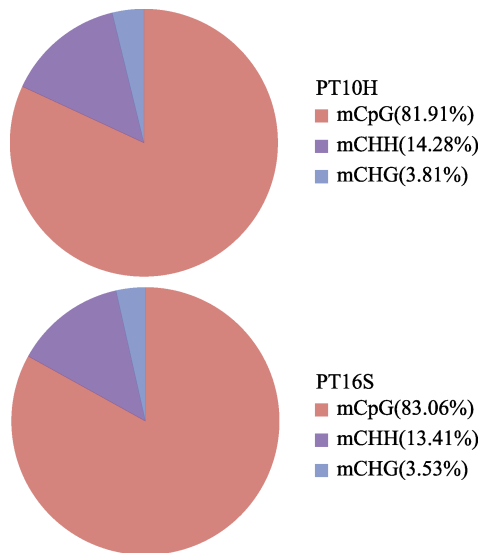


图 1 对照组(PT10H)和感染组(PT16S) mCpG、mCHG 和 mCHH 占总 mC 的百分比

Fig.1 Methylation percentage of mCpG, mCHG, and mCHH to total mC in PT10H and PT16S groups

2.3 差异甲基化区域分析

使用 R 语言程序包中的 methylKit 分析自对照组和感染组样品测序结果中筛选到的 626 677 个 DMRs。根据分组的差异比较结果, 对发生显著甲基化的基因数量的统计结果见图 2。从对照组和感染组共筛选到的启动子区域 DMRs 共有 40 329 个(6.44%), 其中, 甲基化水平升高的有 22 613 个, 下降的有

17 716 个;外显子区域存在 58 522 个 DMRs (9.34%), 其中, 升高的有 29 731 个, 下降的有 28 791 个;内含子区域 DMRs 共有 109 635 个(17.49%), 其中, 升高的有 56 603 个, 下降的有 53 032 个;基因间区 DMRs 共有 401 174 个(64.02%), 其中, 升高的有 216 152 个, 下降的有 185 022 个; CGI.CG 岛 DMRs 共有 17 017 个(2.72%), 其中, 升高的有 8877 个, 下降的有 8140 个。刺参基因间区的差异甲基化基因比例最高, CGI.CG 岛区域的差异甲基化比例最低。

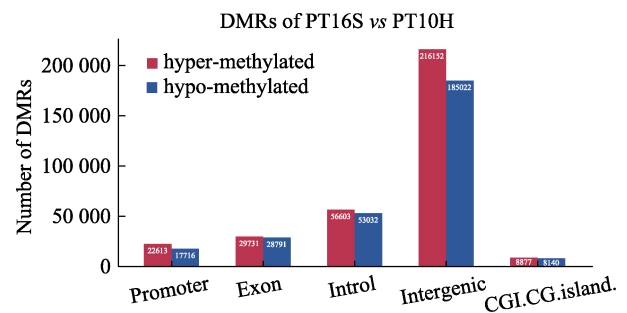


图 2 不同基因功能区域的 DMR 数量

Fig.2 The number of DMRs in different gene functional regions

2.4 转录组显著性差异基因表达分析

由对照组和感染组转录组测序分析共检测出 29 290 个基因, 对所检测的基因表达进行差异显著性分析, 共筛选到 496 个显著性差异表达基因(DEGs), 其中, 上调性基因 214 个, 下调性基因有 282 个(图 3)。从整体上来看, 下调基因数目多于上调基因数目。

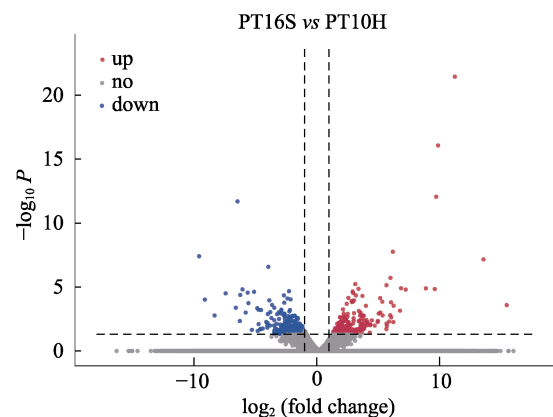


图 3 PT16S 与 PT10H 差异表达基因火山图

Fig.3 Volcano plot of DEGs between PT16S and PT10H

2.5 基因组甲基化与转录组关联分析

对 DMRs 功能基因注释筛选到的 23 706 个功能基因和 DEGs 筛选到的 496 个功能基因进行比对, 筛

选到 DMRs 和 DEGs 注释的共有基因有 261 个(图 4)。对这 261 个基因的 DMRs 差异和基因表达差异进行关联分析, 结果见表 3。共筛选到 180 个负相关关联基因, 其中, 甲基化水平高而基因表达下调的负相关关联基因有 58 个, 甲基化水平低而基因表达上调的负相关关联基因有 122 个。对所筛选的负相关关联基因差异甲基化区域进行统计, 差异甲基化区域位于启动子区域的负相关基因有 60 个。

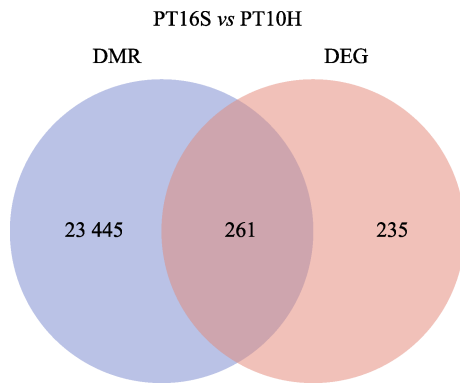


图 4 差异表达基因和差异甲基化区域共注释基因的韦恩图

Fig.4 Venn graph between the differentially expressed genes and the differentially methylated regions

对所筛选的甲基化和转录组负相关的 180 个基因进行 GO 富集分析, 结果显示(图 5), 甲基化水平与表达水平呈负相关的 180 个基因中, 有 124 个基因注释到 896 个 GO terms, 其中, 50 个 GO terms 显著富集($P < 0.05$)。富集到生物过程的 GO terms 主要包括细胞粘附、DNA 转录模板、先天性免疫应答、氧化还原过程、RNA 聚合酶 II 对转录的负调控等; 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分、细

胞质、细胞膜、细胞核等; 富集到分子功能的 GO terms 主要包括蛋白结合、金属离子结合、钙离子结合、ATP 结合、锌离子结合、DNA 结合、转运蛋白活性等。筛选到的功能基因包括免疫球蛋白、富含亮氨酸的重复序列(LRR)、有机阴离子转运蛋白多肽(OATP)、半胱天冬酶募集结构域(CARD)、黄素结合单加氧酶(almA)、CD36、血红素结合蛋白等。

利用 KEGG 数据库对差异表达基因进行 pathway 分析, 结果见图 6, 甲基化水平与基因表达水平呈负相关的有 180 个基因, 其中, 39 个富集基因注释到 112 个 KEGG 信号通路中, 有 20 个通路显著富集($P < 0.05$), 内质网中的蛋白质加工、破骨细胞分化、乙型肝炎、维生素消化吸收这 4 个通路注释基因最多, 均有 3 个负相关关联基因富集在相应通路上, 筛选到的功能基因包括 *hsp20* 和 *CD36* 等。

3 讨论

3.1 甲基化检测和基因组测序对检测效果的影响

DNA 甲基化是表观遗传学研究的重要内容, 是基因组 DNA 的一种重要修饰方式, 参与生物体或细胞的生物调控过程(Moore *et al*, 2013)。水生生物在响应温度、病原、饲料、倍性及杂种优势过程中 DNA 甲基化均发生了改变(吴彪等, 2016; 高杉等, 2017; 卓梅琴等, 2019; Han *et al*, 2021; 李炎璐等, 2019)。

目前, 水产动物研究中常用的 DNA 甲基化检测方法有基于限制性酶切预处理的甲基化敏感扩增多态性技术(MASP)和基于高通量测序的亚硫酸氢盐处理的全基因组 DNA 甲基化测序技术(WGBS)。MASP 技术具有简便、高效和可靠的特点。研究人员利用该技术探究了刺参不同群体(左之良等, 2016; 左闪等, 2021)、

表 3 基因组甲基化 DMRs 与转录组 DEGs 关联分析筛选基因统计

Tab.3 Statistics of gene number detected by association analysis between DMRs and DEGs

项目 Items	基因数目 Number of genes
差异基因总数 Total genes selected by correlation analysis	261
DNA 甲基化水平升高-基因表达下降的基因 Genes with higher DNA methylation level and decreased gene expression	58
DNA 甲基化水平降低-基因表达上升的基因 Genes with lower DNA methylation level and increased gene expression	122
启动子区域 DNA 甲基化水平升高-基因表达下降的基因 Genes with higher DNA methylation level and decreased gene expression in promoter region	25
启动子区域 DNA 甲基化水平降低-基因表达上升的基因 Genes with lower DNA methylation level and increased gene expression in promoter region	35

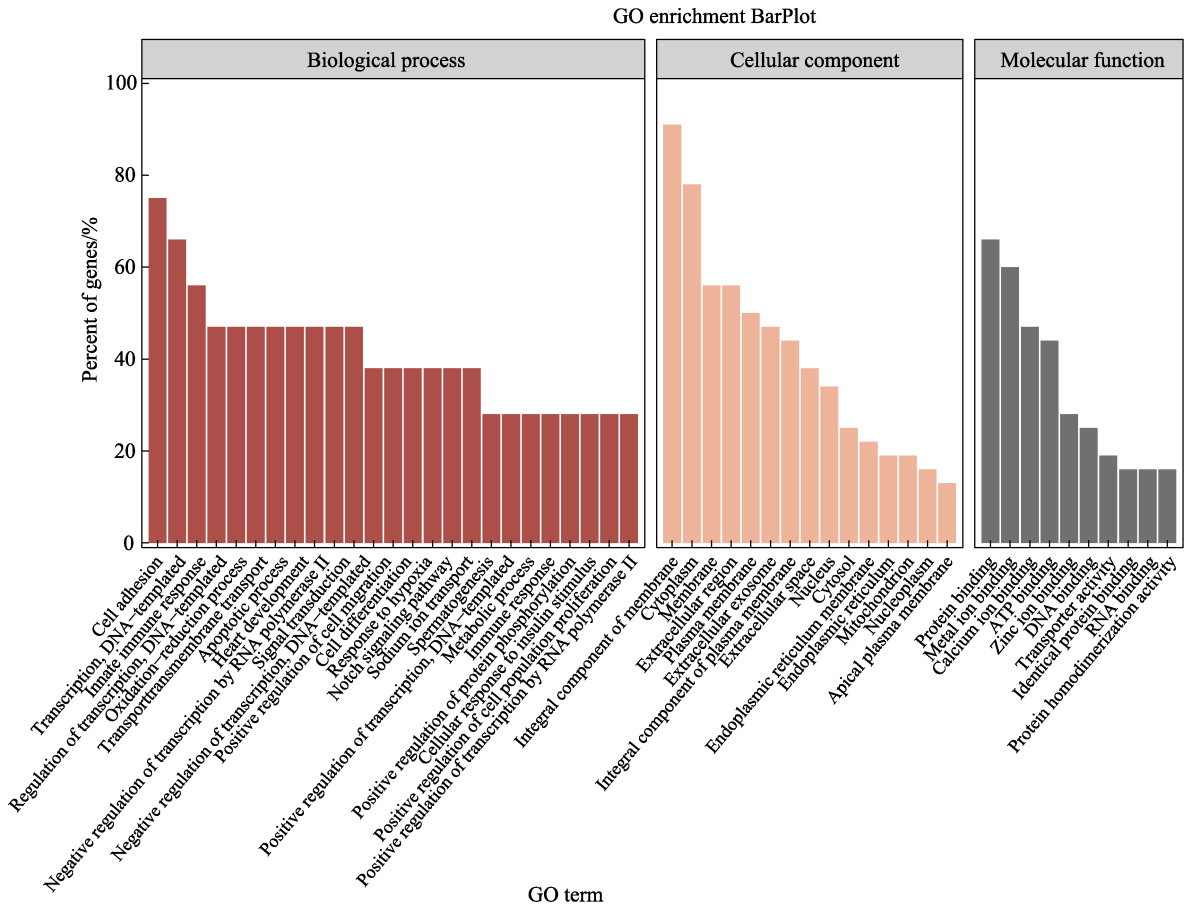


图 5 甲基化与基因表达负相关基因 GO 富集

Fig.5 GO enrichment of negative correlated genes detected by association analysis between DMRs and DEGs

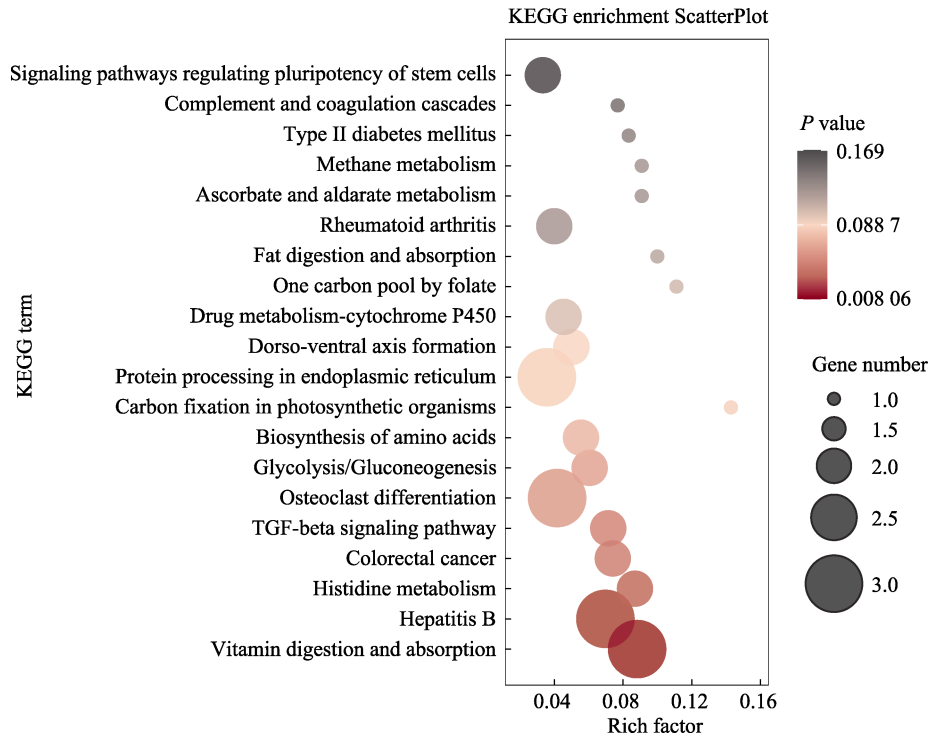


图 6 甲基化与基因表达负相关基因 KEGG 富集

Fig.6 KEGG enrichment of negative correlated genes detected by association analysis between DMRs and DEGs

不同组织(郭婷婷, 2013)、高温胁迫(李尚俊等, 2017)、夏眠(赵业, 2015)和化皮(高杉等, 2017)的甲基化水平差异。但 MASP 无法完全准确地显示基因组中甲基化情况的全貌及具体的甲基化位点的序列等信息。

随着高通量测序技术的发展, WGBS 成为检测 DNA 甲基化的最可靠技术之一, 该方法可以直观地反映全基因组 DNA 甲基化的详细信息, 可以直接提供筛选出的位点及其对应的信息序列。Yang 等(2020)运用该技术筛选到夏眠期刺参的 DMR 区域和关键功能基因; 温争争等(2021)利用 WGBS 技术完成了刺参高温胁迫下基因组 DNA 甲基化水平及模式的变化研究; Sun 等(2020)利用该技术筛选到了高浓度灿烂弧菌感染下刺参化皮组织 DMR 区域。全基因组序列信息是开展 WGBS 分析的关键, 参考基因组拼接的完整性对 DMR 区域的筛选和注释效果产生直接影响。Zhang 等(2017)和 Li 等(2018)获得 NCBI 数据库中的刺参基因组序列信息, 共包括 3821 个 Scaffolds (N50 为 786 kb)。Sun 等(2020)利用高浓度灿烂弧菌 (5×10^9 CFU/mL) 攻毒制备化皮实验材料, 利用 NCBI 中的全基因组数据比对筛选得到 116 522 个 DMRs。本团队于 2020 年采用纳米孔测序技术和染色体构象捕获技术(Hi-C)开展了刺参基因组精细图谱绘制, 拼接获得 911 Mb 的染色体水平的刺参基因组, 共定位到 23 条染色体, N50 为 39.61 Mb (相关数据未发表), 基因组拼接质量得到较大提升。

本研究利用灿烂弧菌半致死浓度(1×10^6 CFU/mL)制备化皮实验材料, 利用染色体水平基因组序列筛选得到的 DMRs 数目为 626 677 个, 显著高于 Sun 等(2020)筛选到的 116 522 个 DMRs, 所筛选的 DMRs 的差异数除了与实验条件差异有关外, 对比时所选用的基因组拼接质量是产生此差异的主要原因之一。

3.2 刺参基因组甲基化特征及其响应病原胁迫的变化

高通量测序获得的所有样品的基因组甲基化水平检测结果表明, 本研究所测定的刺参体壁组织甲基化水平为 3.52~4.17%。Yang 等(2020)测定的夏眠期刺参基因组甲基化水平在 3.5%左右; Sun 等(2020)检测刺参甲基化水平在 4%左右。可以看出, 刺参基因组整体甲基化水平较低, 这与 Tweedie 等(1997)发现的无脊椎动物基因组甲基化水平通常低于脊椎动物的结果相一致。

对刺参的不同类型 C 位点甲基化水平的统计结果可以看出, CG 类型位点的甲基化比例较高, 而 CHG 和 CHH 位点甲基化比例很低, 与目前已报道的其他海洋无脊椎动物 CG 类型甲基化水平范围(20%~

50%)相一致(曹哲明等, 2009; 于涛等, 2010; Sun *et al.*, 2014)。进一步对发生甲基化 C 位点的分型比例统计结果可以看出, mCpG 占甲基化位点的比例达到 80%以上, 表明 mCpG 是最主要的甲基化形式。与李玉强等(2018)利用 methylRAD-seq 技术对仿刺参的甲基化图谱研究结果相一致。这些结果表明海洋动物的 DNA 甲基化模式都有一定的相似性和保守性。

对病原感染刺激下基因组甲基化水平的变化可以看出, 感染组样本的甲基化水平显著高于对照组。虽然 CG 位点甲基化比例未发生显著变化, 但 CHH 和 CHG 的甲基化比例显著升高, 证明病原胁迫会引起基因组甲基化水平的升高。高杉等(2017)、Yang 等(2020)、Sun 等(2020)和温争争等(2021)研究结果也表明, 温度和高浓度病原刺激等外界胁迫会引起基因组甲基化水平的升高, 尤其是 CHH 和 CHG 的甲基化比例的升高。虽然 mCpG 是刺参最主要的甲基化形式, 但在不同刺激影响下的占比仍存在差异。本研究在病原半致死浓度刺激下, mCpG 的占比在 82%左右。Sun 等(2020)测定的在致死浓度病原刺激下, mCpG 的占比为 87%~89%, 但在温度刺激或夏眠状态下, mCpG 的占比达到 94%以上。相关对比分析证明, 不同的刺激形式造成的基因组甲基化存在差异。

3.3 刺参响应灿烂弧菌感染差异甲基化位点和差异表达基因分析

本研究利用染色体水平基因组为基础, 筛选得到 626 677 个 DMRs, 且在感染组中筛选到的高甲基化 DMR 数量大于低甲基化 DMR 数量, 这与感染组全基因组甲基化水平增高相一致。根据这些 DMR 所在的功能区域的位置统计结果可以看出, 基因间区的差异甲基化位点数量最高, 这与李玉强(2018)利用 methylRAD-seq 技术分析结果解释的甲基化标签较大比例分布于基因间区的结果相一致。对筛选的 DMR 区域进行功能基因注释得到 23 706 个功能基因, 所注释的功能基因数目也远高于 Sun 等(2020), 这可能也与实验条件的差异和比对所选用的基因组序列不同有关。转录组测序结果表明, 感染组筛选到的下调基因数目多于上调基因数目, 这个趋势与感染组筛选到高甲基化位点数目较多正好相反, 也从侧面验证了 Choy 等(2010)提出的甲基化水平的升高会抑制基因表达, 二者存在负调控关系。在所筛选到的 496 个差异表达基因中发现 DNA 甲基化转移酶的表达显著上调, 相关结果与 Yang 等(2020)和李尚俊等(2017)检测到的相关基因上调表达相一致, 也解释了该基因上调表达与基因组甲基化水平的升高直接相关。

3.4 刺参响应病原胁迫的基因组甲基化与基因表达的关联分析

基因组 DNA 甲基化作为基因的表达调控的重要方式, 在通常情况下, DNA 低甲基化会激活基因的转录, 而高甲基化则抑制基因的转录(Bird, 2002)。如早期的海胆(*Sphaerechinus granularis*)甲基化研究报告了 DNA 甲基化对于海胆发育具有重要意义(Tosi *et al.*, 1995)。本研究自甲基化和转录组关联分析中筛选到 261 个共同注释的基因, 其中 180 个为负相关基因, 占比为 68.97%, 说明所筛选到的基因其 DNA 甲基化对基因表达发挥了重要作用。这些负相关基因是后期解析刺参表观调控需要重点关注的对象。

本研究对所筛选的 180 个负相关基因进行 GO 和 KEGG 分析。在甲基化和转录组负相关的 180 个基因的 GO 富集分析中, 筛选到生物进程、细胞成分和分子功能多个 GO terms 中的富含亮氨酸的重复序列 LRR 基因, 该基因包含许多抗病基因, 能参与固有免疫(Gou *et al.*, 2010)。富集到的 CARD 蛋白参与先天性免疫应答、细胞质、ATP 结合、乙型肝炎、RIG-I 样受体信号通路、麻疹、甲型流感等通路, 进而参与包括炎症反应、免疫、分化、细胞生长、肿瘤发生和凋亡等许多生物过程(Beg *et al.*, 1994)。此外, 筛选到的免疫球蛋白能够避免免疫系统的过分激活, 降低炎症反应。虽然在 KEGG 通路中富集的负相关基因数量仅为 39 个, 但筛选到的 *Hsp20* 和 *CD36* 基因参与免疫调控、细胞粘附等多种生理和病理过程(Li *et al.*, 2015; 魏书磊等, 2013)。这些重要的功能基因将成为解析刺参响应病原感染分子机理的重要关注点。

综上所述, 本研究以染色体水平的基因组序列为基础, 通过对病原感染后化皮和健康样品体壁组织的 WGBS 和转录组测序分析, 筛选到相应的差异甲基化位点和差异表达基因, 进一步通过关联分析筛选到刺参响应病原感染的关键基因及其甲基化特征, 相关结果将为解析刺参抗病调控机理奠定基础。

参 考 文 献

BEG A A, BALDWIN A S. Activation of multiple NF-kappa B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene*, 1994, 9(5): 1487-1492

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 2002, 16(1): 6-21

CAO Z M, YANG J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(6): 2011-2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分

析. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011-2016]

CHOY M K, MOVASSAGH M, GOH H, *et al.* Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 519

GAO S, YANG A F, DONG Y, *et al.* MSAP analysis of DNA methylation in the body wall of *Apostichopus japonicus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 637-642 [高杉, 杨爱馥, 董颖, 等. 仿刺参“化皮病”体壁组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 637-642]

GOU X P, HE K, YANG H, *et al.* Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 19

GUO T T. The method to assess genome DNA methylation of *Apostichopus japonicus* by HPLC and MSAP analysis in different tissues. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [郭婷婷. 刺参不同组织基因组 DNA 甲基化状态 MSAP 分析及 HPLC 方法的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

HAN L S, SUN Y, CAO Y, *et al.* Analysis of the gene transcription patterns and DNA methylation characteristics of triploid sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 7564

KRUEGER F, ANDREWS S R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 2011, 27(11): 1571-1572

LI J K, WU X W, TAN J, *et al.* Molecular cloning of the heat shock protein 20 gene from *Paphia textile* and its expression in response to heat shock. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(4): 919-927

LI S J, SUN G H, LI X Y, *et al.* Characteristics of epigenetic regulation of related genes under high temperature stress in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 470-476 [李尚俊, 孙国华, 李雪燕, 等. 高温胁迫下仿刺参表观遗传调控相关基因的表达特征. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 470-476]

LI X N. Analysis of DNA methylation regulation and function of candidate genes during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, 2018 [李晓妮. 刺参肠道再生的 DNA 甲基化调控解析及再生候选基因的功能分析. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所) 博士研究生学位论文, 2018]

LI Y L, CHEN C, CHEN J G, *et al.* DNA methylation analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and their F₁ hybrid. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 98-104 [李炎璐, 陈超, 陈建国, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 98-104]

LI Y Q, WANG R J, LI Y L, *et al.* Genome-wide profiling of

- DNA methylation in *Apostichopus japonicus* based on methylRAD-Seq. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2018, 48(9): 41–50 [李玉强, 王睿甲, 李语丽, 等. 基于 MethylRAD-Seq 技术对仿刺参 DNA 甲基化图谱的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(9): 41–50]
- LI Y, WANG R, XUN X, *et al.* Sea cucumber genome provides insights into saponin biosynthesis and aestivation regulation. Cell Discovery, 2018, 4(1): 29
- MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23–38
- SUN H J, ZHOU Z C, DONG Y, *et al.* Insights into the DNA methylation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in response to skin ulceration syndrome infection. Fish and Shellfish Immunology, 2020, 104: 155–164
- SUN Y, HOU R, FU X, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. PloS One, 2014, 9(1): e86232
- TOSI L, ANIELLO F, GERACI G, *et al.* DNA methyltransferase activity in the early stages of a sea urchin embryo-evidence of differential control. FEBS Letters, 1995, 361(1): 115–117
- TWEEDIE S, CHARLTON J, CLARK V, *et al.* Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(3): 1469–1475
- WANG Y G, RONG X J, LIAO M J, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- WEI S L. Expression and functional analysis of CD36 gene in zebrafish. Master's Thesis of China Ocean University, 2013 [魏书磊. 斑马鱼(*Danio rerio*)重组 CD36 基因的原核表达及功能研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- WEN Z Z, ZUO S, CHEN M, *et al.* DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 46–54 [温争争, 左闪, 陈梦, 等. 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 46–54]
- WU B, YANG A G, SUN X J, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 140–146]
- YANG Y J, ZHENG Y Q, SUN L N, *et al.* Genome-wide DNA methylation signatures of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during environmental induced aestivation. Genes, 2020, 11(9): 1020
- YU T, YANG A G, WU B, *et al.* Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Journal of Fisheries of China, 2010, 34(9): 1335–1342 [于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析. 水产学报, 2010, 34(9): 1335–1342]
- ZHANG X J, SUN L, YUAN J B, *et al.* The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration. PLoS Biology, 2017, 15(10): e2003790
- ZHAO Y, CHEN M Y, STOREY K B, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 181: 26–32
- ZHAO Y. Study on gene expression patterns and basic characteristics of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 [赵业. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 夏眠期间基因表达模式及 DNA 甲基化基础特征研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2015]
- ZHUO M Q, YANG S B, LING S C, *et al.* Effects of dietary lipid on lipid metabolism, methylation and expression of PI3KCa in the ovary of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Journal of Fisheries of China, 2019, 43(10): 2186–2196 [卓梅琴, 杨水波, 凌仕诚, 等. 饲料脂肪对黄颡鱼卵巢脂类代谢以及 PI3KCa 甲基化和转录水平的影响. 水产学报, 2019, 43(10): 2186–2196]
- ZUO S, WEN Z Z, ZHOU H X, *et al.* Evaluation of epigenetic and genome sequence diversity in sea cucumber *Apostichopus japonicus* selected population based on MSAP technology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 38–45 [左闪, 温争争, 周红学, 等. 基于 MSAP 技术的刺参选育群体基因组表观与序列遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 38–45]
- ZUO Z L, TAN J, WU B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white A. *japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 93–100 [左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 93–100]

Genomic DNA Methylation Levels and Transcriptome Differences of *Apostichopus japonicus* in Response to *Vibrio splendidus* Infection and Their Association Analysis

LI Xinrong^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3①}, LI Bin^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, CHANG Mengyang^{2,3},
WANG Yingeng^{2,3}, YU Yongxiang^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, LIU Qingbing⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Qingdao Ruizi Company, Qingdao, Shandong 266408, China)

Abstract DNA methylation is an important epigenetic modification that plays a key role in gene expression regulation. In this study, two groups of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) were prepared. One group had skin ulceration syndrome body wall (PT16S) under stress from *Vibrio splendidus* infection at a concentration of 1×10^6 CFU/mL (LD₅₀); the other group had a healthy body wall (PT10H). Genomic DNA methylation levels and gene expression differences between the two groups were detected using whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) and transcriptome sequencing. The key gene ontology (GO) terms and KEGG terms engaged in the immune response were selected using association analysis. The results showed that the total methylation levels of the *A. japonicus* genome of PT10H and PT16S were (3.59±0.04)% and (3.87±0.27)%, respectively. The methylation levels of the *A. japonicus* genome under pathogen challenge significantly increased; mCpG accounted for 83.06% and 81.91% of all the methylated sites in PT16S and PT10H, respectively, indicating that mCpG was the most important methylation form in the sea cucumber. A total of 626 677 differentially methylated regions (DMRs) were screened and annotated into 23 706 functional genes. A total of 496 differentially expressed genes were screened, including 214 up-regulated and 282 down-regulated genes. A total of 180 negatively correlated genes were isolated using association analysis between genomic methylation and transcriptome, of which 60 genes had DMRs located in promoter regions. Based on GO and KEGG enrichment of the 180 negatively correlated genes, key genes such as *LRR*, *Hsp20*, and *CARD* were selected to play a critical role in the immune response. The results would provide primary data for the epigenetic regulatory mechanisms of *A. japonicus* and provide a theoretical reference for *A. japonicus* breeding.

Key words *Apostichopus japonicus*; DNA methylation; Transcriptome; Association analysis

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210305001

http://www.yykxjz.cn/

李靖, 石莹, 韩兵, 郑炯, 冯若燕. 灯光诱饵技术对深水网箱养殖鱼类品质的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 186–195
LI J, SHI Y, HAN B, ZHENG J, FENG R Y. Effect of light trapping technology on fish quality in deep water cage fish culture. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 186–195

灯光诱饵技术对深水网箱养殖鱼类品质的影响*

李 靖 石 莹 韩 兵^① 郑 炯 冯若燕

(青岛市渔业技术推广站 山东 青岛 266071)



摘要 为评估太阳能灯光诱饵技术在深水网箱养殖鱼类品质改善方面的应用效果,本研究在青岛金沙滩海域的深水网箱中设计并安装太阳能灯光诱饵设备,通过“灯光诱饵”吸引活体饵料聚集于网箱内,从而为实验大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)和真鲷(*Pagrus major*)提供天然饵料,全程无人工投饵,使其在自然状态下,拟半野生化养殖至上市。大黄鱼、鲈鱼和真鲷经过 5 个月的实验网箱及传统网箱养殖后,通过测定其脂肪、脂肪酸和氨基酸含量判断其品质。结果显示,在安装灯光诱饵设备的影响下,网箱养殖大黄鱼、鲈鱼和真鲷的感官性状显著好于传统网箱养殖鱼类,11 月 3 种鱼体肥满度比 6 月均显著下降($P<0.05$)。灯光诱饵网箱养殖大黄鱼和真鲷肌肉内粗脂肪含量分别比传统网箱养殖低 75.24%和 46.81%,差异极显著($P<0.01$),鲈鱼差异不显著($P>0.05$)。灯光诱饵网箱养殖大黄鱼、鲈鱼和真鲷肌肉内 DHA 含量高于传统网箱养殖鱼类,差异极显著($P<0.01$);总脂肪酸含量、棕榈酸含量低于传统网箱养殖鱼类,差异极显著($P<0.01$)。灯光诱饵网箱养殖的 3 种鱼的肌肉内的呈味氨基酸、呈鲜味氨基酸、呈甘味氨基酸、总氨基酸和非必需氨基酸含量均升高,其中大黄鱼变化最显著,实验组比对照组的呈味氨基酸、呈鲜味氨基酸和呈甘味氨基酸含量分别高 11.78%、9.17%和 19.57%,差异显著($P<0.05$)。研究表明,太阳能灯光诱饵深水网箱养鱼技术虽然降低了养殖鱼类的生长速度,但可以改善养殖鱼类品质,且养殖投入明显降低,养殖收入显著提高,该方法可显著提升产出效益,因此,可作为一种绿色健康养殖模式进行推广应用。

关键词 灯光诱饵系统;深水网箱;鱼类;脂肪;脂肪酸;氨基酸

中图分类号 S967.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0186-10

深水网箱作为建设现代化海洋牧场的一项重要组成部分,可有效拓展养殖空间,减轻陆基环境压力,提高养鱼质量,提升生产效率,是国家积极倡导的一种绿色、健康、高效的养殖模式,成为助推渔业转型升级,实现高质量发展的重要途径之一。传统深远海网箱模式下,由于自然海域天然饵料无法满足网箱鱼类的饵料需求,因此多采用人工投饵方式进行养殖,并配套相关管理人员和投饵渔船,造成了大量人力、

饲料和能源的投入,同时存在养殖海域环境污染的隐患。在投饵模式下生长的鱼类,由于其索饵耗能少,其在体型和肉质等方面与野生鱼类均存在较大差异(Alsavar *et al*, 2002; 郭全友等, 2019; 阮成旭等, 2017; 缪伏荣等, 2007; 段青源等, 2000)。随着人们生活水平的提高,对高品质鱼类的需求日益增加。野生鱼类由于具有低脂肪、口感佳的特点而备受青睐,但野生鱼类的捕获量远远无法满足市场需求。因此,

* 青岛市市级财政专项项目(ZFCG2019000740)资助 [This work was supported by Special Financial Projects of Qingdao (ZFCG2019000740)]. 李 靖, E-mail: 12296521@qq.com

① 通讯作者: 韩 兵, E-mail: yujizhan123@163.com

收稿日期: 2021-03-05, 收修改稿日期: 2021-04-21

亟需探索建立一种提高鱼类品质的新的养殖模式。

水生生物行为学研究表明, 灯光对趋光性的鱼类、虾类、头足类都有明显的诱集作用, 同时也提高了其摄食强度。刘超等(2012)研究发现, 在淡水网箱上方设置照明灯可诱集饵料生物, 提高网箱区饵料生物密度, 满足鱼类摄食需要, 促进生长速度。杜飞雁等(2017)发现, 在海水中灯光诱集对中小型浮游动物群落也产生了较为明显的生态学效应, 灯光可使浮游动物物种丰富度和多样性水平明显提高, 但尚未改变浮游动物的群落结构。本研究基于相关研究设计了灯光诱饵深水抗风浪网箱养鱼技术, 该技术充分利用海水中的中上层鱼类和浮游动植物的趋光特性, 在网箱中安装太阳能光诱饵设备, 夜间通过灯光诱集饵料生物作为饵料源, 成为网箱养殖鱼类竞争性摄食的一种零投饵拟半野生化养殖的新型养殖模式。海水鱼类光谱敏感曲线是短波长范围为 525~530 nm 的绿光, 且根据不同光源在海水中的传播特征(张延青等, 2020), 选择绿色 LED 灯作为光源, 被吸引饵料以玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)群、鲷鱼(*Engraulis japonicus*)群及虾群为主。前期的安装测试结果表明, 在网箱中安装灯光诱饵系统对养殖海域环境无污染(李靖等, 2020), 但安装该系统对养殖鱼类品质的影响尚无相

关报道。

本研究选取我国主要的 3 种海水网箱养殖鱼类[大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)和真鲷(*Pagrus major*)]为研究对象, 在安装有灯光诱饵系统的网箱中进行养殖实验, 以传统投饵网箱为对照组, 测定 2 种不同养殖模式下养殖鱼类肌肉中营养成分(粗脂肪、脂肪酸和氨基酸)的含量并进行营养评价, 进一步分析投入产出比, 为养殖模式的推广应用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 灯光诱饵深水抗风浪网箱结构及安装布局

灯光诱饵深水网箱周长为 40 m, 由深水网箱、结构框架、浮式平台、太阳能板及水下集鱼灯、缆绳及监控装置组成, 整体结构如图 1 所示。集鱼灯是短波长范围为 525~530 nm 的绿光 LED 灯, 根据光伏板的状态自动感应, 当光伏组件电压低于 DC15 V, 连续时间大于 10 min, 系统默认天黑状态后, 启动水下 LED 灯, 开灯延时 8 h 后, 关闭。以未安装灯光诱捕装置的相同规格的网箱作为对照网箱。实验所用网箱安装在青岛金沙滩外海海域。

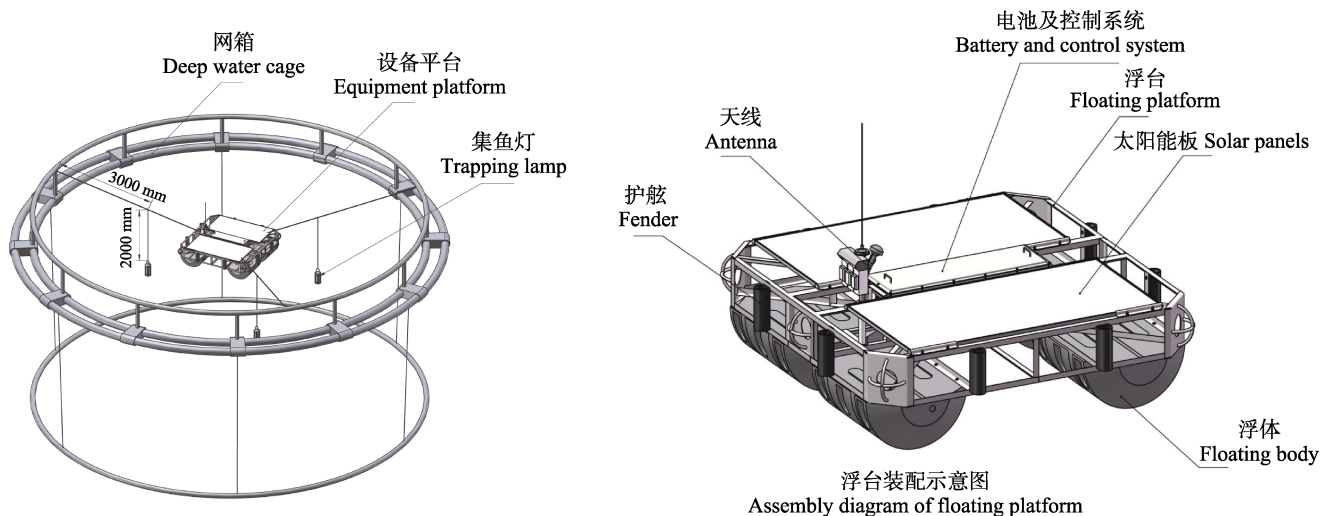


图1 灯光诱饵系统及网箱装置效果图

Fig.1 Design sketch of deep water cage equipped with light trapping system

1.2 养殖苗种选择、投放与管理

2019年5月27日, 在福建选购健康的大黄鱼、鲈鱼和真鲷的大规格苗种, 苗种规格分别为(807.50±4.32)、(782.00±7.31)和(771.00±6.28) g/尾, 利用活鱼运输船运输至金沙滩海域。5月30日在3个灯光诱饵深水网箱按照养殖密度为 10 kg/m³, 分别投放大黄

鱼、鲈鱼和真鲷的大规格鱼苗, 根据网箱规格计算养殖水体体积, 投放密度分别为 6000、3000 和 3000 尾/箱。同期, 在 3 个对照网箱中按照相同的密度投放相应的大黄鱼、鲈鱼和真鲷鱼苗作为对照组。在养殖管理工艺方面, 3 个灯光诱饵深水网箱不投饵, 而 3 个对照网箱则每天投喂蛋白质含量为 40% 的颗粒饲料, 大黄鱼、鲈鱼和真鲷网箱中的日平均投喂量分别

为 40~60、25~35 和 20~30 kg/d。

1.3 养殖鱼类生长测定与肥满度计算

分别于 2019 年 6 月 8 日、7 月 8 日、9 月 10 日和 11 月 8 日自 3 个实验网箱中各随机抽取 20 尾养殖鱼苗, 观察鱼体形态, 测量鱼苗体长和体重, 按照下列公式计算养殖鱼的肥满度(K):

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

式中, W 为体重, L 为体长。2019 年 11 月 8 日在对照网箱和实验网箱中随机抽取 3 尾鱼进行解剖, 观察其肝脏形态及腹腔内脂肪的状态。

1.4 养殖鱼的营养品质评价

1.4.1 样品处理 11 月 8 日自实验组和对照组网箱中随机抽取相应养殖鱼 3 尾刮去鱼体鳞片, 剪取其肌肉组织, 取每组每条鱼肌肉 50 g, 充分研磨混合后作为样品, 每组设置 6 个平行。

1.4.2 检测方法 按照 GB5009.6-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中第二法酸水解法, 样品经盐酸水解后用无水乙醚提取, 测定脂肪含量; 按照 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》, 样品经盐酸水解后, 经过氨基酸分析仪测定氨基酸含量; 采用 GB5009.168-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》第一法内标法, 样品经水解-乙醚提取液提取其中脂肪后, 利用气相色谱仪测定其脂肪酸含量。

1.5 养殖效益分析

实验根据传统网箱养殖模式与灯光诱饵抗风浪网箱养殖模式的投入与产出进行养殖效益分析, 其中, 纯利润值=总收入-总成本; 总成本=苗种费+饲料费+人工费+设备折旧费。

1.6 数据处理和统计分析

实验数据采用单因子方差分析(one-way ANOVA), 多重比较用 Duncan's 进行差异显著性检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, 结果用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 结果与分析

2.1 灯光诱饵对养殖鱼生长及肥满度的影响

实验用 3 种鱼苗为人工繁育养殖的大规格鱼苗, 投放前均表现为体型肥大, 鱼肚鼓胀。实验结束时, 经过 5 个月的养殖, 对照网箱鱼体体型肥大, 而灯光诱捕深水网箱养殖的鱼体整体变薄瘦, 体型修长, 其中大黄鱼变化最为显著(图 2)。对实验组和对照组收获的鱼进行解剖, 发现对照组大黄鱼样品存在轻度脂肪肝现象, 肝脏颜色呈粉红色, 而采用灯光诱饵的实验组到 11 月收获时肝脏明显小于实验组, 脂肪肝症状较轻(图 3); 对照组的鲈鱼样品腹内有样如猪板油状脂肪, 而采用灯光诱饵的实验组样品腹内猪板油状脂肪明显较少(图 4)。对实验期 3 种鱼的体长、体重和肥满度的测定结果见图 5、图 6 和图 7, 可以看出: 经过 5 个月的养殖, 大黄鱼、鲈鱼和真鲷 3 种鱼在灯光诱饵深水网箱养殖条件下, 体长分别增加 4.83%、24.94% 和 23.82%, 体重分别增长 2.69%、58.97% 和 31.43%, 肥满度分别降低 23.08%、17.69% 和 29.51%; 在普通网箱养殖条件下, 养殖大黄鱼、鲈鱼和真鲷的体长分别增加 11.41%、29.37% 和 29.36%, 体重分别增长 52.11%、105.85% 和 74.29%, 肥满度分别降低 1.3%、2.76% 和 -3.90%。相比较而言, 在灯光诱饵深水网箱养殖条件下, 养殖鱼类的体长和体重增加率小于对照网箱, 且肥满度大幅降低。

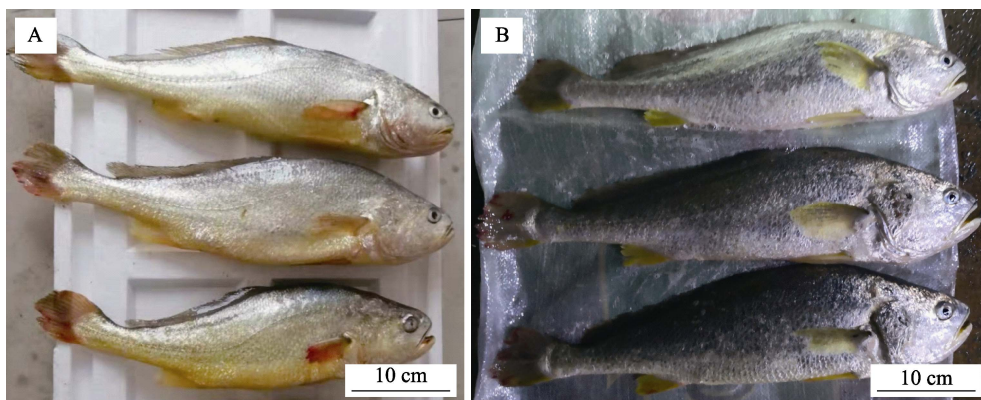


图 2 灯光诱饵网箱养殖大黄鱼体型变化图(A 为对照组, B 为实验组)

Fig.2 Comparison of body shape of *P. crocea* cultured in light trapping technology group and control group (A: Control group; B: Treatment group)

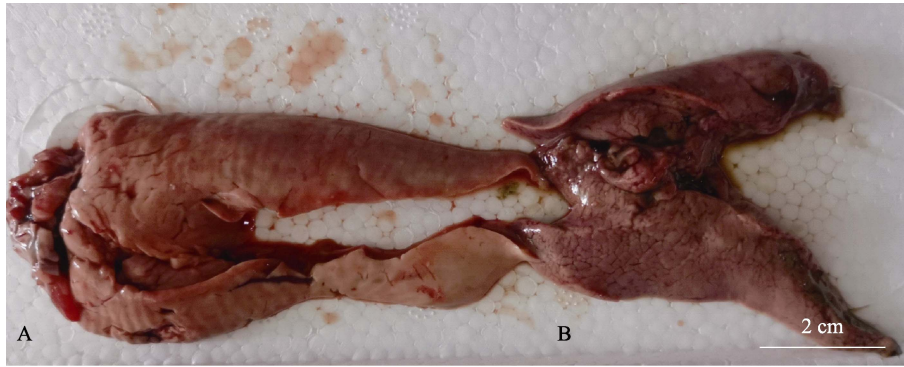


图 3 灯光诱饵网箱养殖前后大黄鱼肝脏解剖图(A 为对照组, B 为实验组)

Fig.3 Comparison of liver of *P. crocea* cultured in light trapping technology group and control group (A: Control group; B: Treatment group)

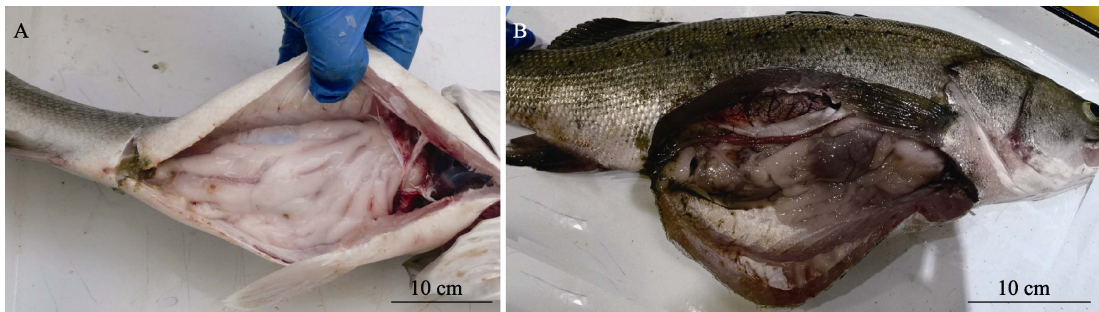


图 4 灯光诱饵网箱养殖前后鲈鱼腹内油状脂肪比较(A 为对照组, B 为实验组)

Fig.4 Comparison of intraperitoneal fat of *L. japonicus* cultured in light trapping technology group and control group (A: Control group; B: Treatment group)

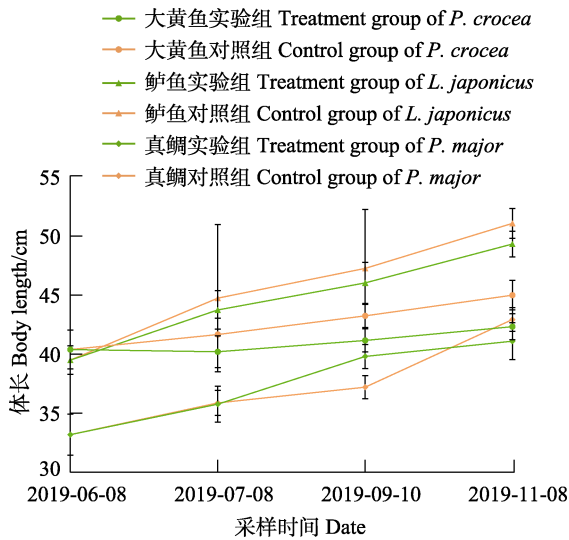


图 5 实验期内 3 种养殖鱼的体长增长

Fig.5 Increase of body length of the three test fish species during the experiment

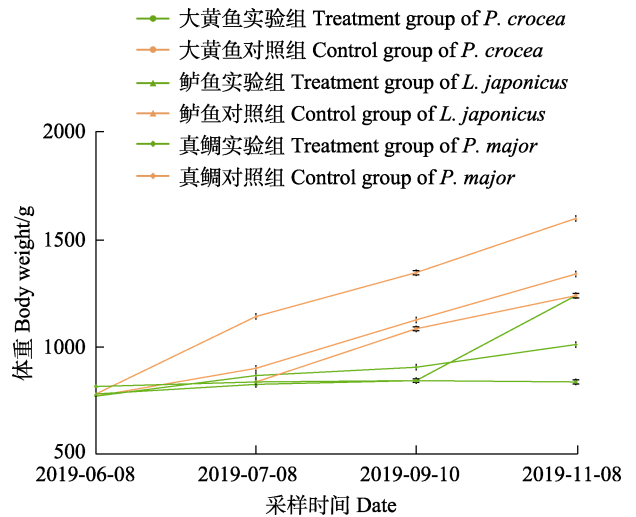


图 6 实验期内 3 种养殖鱼的体重增长

Fig.6 Increase of body weight of the three test fish species during the experiment

2.2 灯光诱饵对养殖鱼肌肉脂肪含量的影响

对照网箱和灯光诱饵网箱养殖的 3 种鱼的肌肉脂肪含量测定结果见表 1。由表 1 可以看出, 与对照组采用人工投喂的网箱养殖鱼相比, 采用灯光

诱饵模式养殖的大黄鱼和真鲷肌肉的脂肪含量分别为(2.60±0.03)和(2.60±0.02) g/100 g, 分别比传统网箱养殖大黄鱼和真鲷脂肪含量低 75.24%和 46.81%, 差异极显著($P < 0.01$); 而 2 种养殖模式下鲈鱼肌肉的脂肪含量差异不显著($P > 0.05$)。

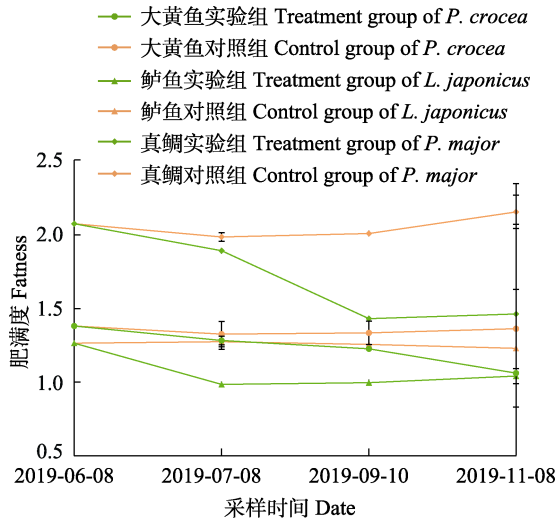


图7 实验期内3种鱼的肥满度变化

Fig.7 Changes of fatness of the three test fish species during the experiment

表1 养殖鱼类肌肉内脂肪含量

Tab.1 Intramuscular fat content of the cultured fishes

鱼种 Fish species	测试结果 Test result/(g/100 g)	
	对照组 Control group	实验组 Treatment group
大黄鱼 <i>P. crocea</i>	10.5±0.095	2.6±0.03**
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	1.5±0.07	1.5±0.04
真鲷 <i>P. major</i>	4.7±0.04	2.5±0.02**

注：对照组为普通网箱养殖鱼类，实验组为灯光诱饵深水网箱养殖鱼类，*表示实验组数据与对照组相比差异显著($P<0.05$)，**表示实验组数据与对照组相比差异极其显著($P<0.01$)。下同

Notes: In the control group, fish were cultured in common cage. In the experimental group, fish were cultured in deep water cage with light trapping. * indicates that there are significant differences between the treatment group and the control group ($P<0.05$); ** indicates that there are highly significant differences between the treatment group and the control group ($P<0.01$). The same as below

2.3 灯光诱饵对养殖鱼肌肉脂肪酸含量的影响

对2种模式下养殖的3种鱼的脂肪酸检测结果见表3，大黄鱼、鲈鱼和真鲷分别检测出脂肪酸20、14和18种，3种养殖鱼体内十四碳酸(C14:0，豆蔻酸)、十六碳酸(C16:0，棕榈酸)、顺-9-十八碳一烯酸甲酯(C18:1n-9)和顺4, 7, 10, 13, 16, 19, 17-二十二碳六烯酸(C22:6n3, DHA)含量比重较高。经过5个月养殖，实验组大黄鱼、鲈鱼和真鲷的十六碳酸含量比对照组分别降低79%、97%和75%，差异极显著($P<0.01$)；

DHA含量分别比对照组升高3.7、24和10倍，差异极显著($P<0.01$)；总脂肪酸含量比对照组分别降低51%、87%和62%，差异极显著($P<0.01$)。

2.4 灯光诱饵对养殖鱼肌肉的氨基酸含量的影响

对2种模式下养殖的3种鱼肌肉氨基酸含量测定结果见表3。本研究中，3种鱼的肌肉内共检测到16种氨基酸，氨基酸总含量大小依次为真鲷>鲈鱼>大黄鱼；肌肉内各呈味氨基酸含量从高到低依次为谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)。经过5个月的养殖，3种鱼肌肉内的呈味氨基酸、呈鲜味氨基酸、呈甘味氨基酸、总氨基酸、必需氨基酸含量均升高，其中变化最显著的是大黄鱼，实验组比对照组的呈味氨基酸、呈鲜味氨基酸及呈甘味氨基酸含量分别高11.78%、9.17%和19.57%，差异显著($P<0.05$)。

2.5 养殖效益分析

2种模式下养殖的3种鱼的效益对比结果见表4。本研究在5月购进规格为0.50~0.75 kg的大黄鱼鱼种12000尾、鲈鱼鱼种6000尾、真鲷鱼种6000尾，总计24000尾，每种鱼分别平均置于普通网箱和灯光诱饵深水网箱中养殖。鱼苗购进价均为48元/kg，普通养殖模式下商品鱼大黄鱼、鲈鱼和真鲷的价格分别为60、60和76元/kg，纯利润分别为13.15、9.55和6.68万元。而灯光诱饵抗风浪网箱养殖模式下所养殖的鱼类由于体型和口感均优于投饵方式养殖的鱼类，其售出单价高于普通投饵养殖模式，商品大黄鱼、鲈鱼和真鲷的售价分别为120、100和120元/kg，纯利润分别为35.47、23.21和23.64万元。由此可见，在灯光诱饵抗风浪网箱养殖模式下3种鱼的经济效益均高于普通网箱养殖模式。

3 讨论

3.1 灯光诱饵光谱选择及其对养殖鱼生长和体型的影响

在养殖过程中，鱼体的形态、肥瘦等体表特征可直接体现鱼的品质，对鱼类的养殖起到直观的反馈。段青源等(2000)研究发现，野生大黄鱼较养殖大黄鱼体型更修长，且养殖大黄鱼的肝体比较野生大黄鱼偏大，这与Mairesse等(2005)发现的密集型养殖条件下鲈鱼肝体比较高的结果一致。沈伟良等(2017)年研究发现，改变养殖环境水流、养殖空间大小、饲料可在一定程度上实现养殖大黄鱼的形态改良。本研究中，3种鱼体长和体重均增长，肥满度降低，达到“瘦身”

改良作用。大黄鱼 11 月体重略有下降, 分析原因可能是天气渐冷, 养殖鱼进食量减少, 可食用的浮游生物也在减少, 鱼摄食不足, 经常处于饥饿或半饥饿状态, 但 3 种鱼肥满度降低说明鱼瘦身成功, 从表观上达到比较理想的状态。解剖发现, 灯光诱饵组养殖鱼的肝脏颜色和大小正常, 说明灯光诱饵养殖可达到模拟野生生长的效果。本研究选取绿色光源光谱作为灯光诱饵的光谱。近年来, 陆续有研究表明, 在不同光谱影响下, 鱼类肌肉品质存在差别。吴亮等(2016)研究发现, 绿光环境有利于豹纹棘鲈(*Plectropomus leopardus*)幼鱼的摄食、生长和存活。刘松涛等(2021)

发现, 绿色 LED 光谱对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)幼鱼的生长发育具有良好的促进作用, 绿色光谱影响下的红鳍东方鲀的体重、饲料转化率和消化酶活性都高于红、黄、蓝、白光谱。费凡等(2019)用全光谱光、蓝光、绿光、黄光和红光实验发现, 绿光对欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)营养品质有着促进作用, 其脂肪含量、氨基酸含量、多不饱和脂肪酸、DHA 和二十碳五烯酸(EPA)含量均高于其他光谱组。以上研究说明, 绿光光谱能促进海水鱼类的养殖品质。本研究的绿色灯光诱饵系统可能对 3 种鱼的养殖品质改善起到一定的促进作用。

表 2 养殖鱼肌肉内脂肪酸含量
Tab.2 Fatty acid contents in muscle of cultured fishes

测试指标 Test items	测试结果 Test results/(g/100 g)					
	大黄鱼 <i>P. crocea</i>		鲈鱼 <i>L. japonicus</i>		真鲷 <i>P. major</i>	
	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group
十四碳酸 C14:0	0.12±0.01*	0.28±0.02	0.06±0.01	0.04±0.01	0.05*±0.01	0.13±0.01
十五碳酸 C15:0	0.01±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01
十六碳酸(棕榈酸) C16:0	0.61±0.02**	2.91±0.06	0.20±0.01**	10.22±0.03	0.20±0.01**	0.79±0.04
顺-9 十六碳一烯酸 C16:1	0.44±0.11*	1.27±0.21	0.08±0.012	0.07±0.01	0.05±0.02*	0.20±0.03
十七碳酸 C17:0	0.03±0.01	0.04±0.01	0	0	0.01±0.01	0.02±0.01
顺-10 十七碳一烯酸 C17:1	0.02±0.01	0.06±0.02	0	0	0	0.01±0.01
十八碳酸 C18:0	0.23±0.03	0.47±0.08	0.03±0.01	0.04±0.02	0.06±0.02*	0.25±0.04
顺-9 十八碳一烯酸 C18:1	0.81±0.02*	0.20±0.03	0.17±0.03	0.2±0.01	0.18±0.02	0.81±0.05*
顺,顺-9, 12-十八碳二烯酸 C18:2n6c	0.19±0.02*	0.70±0.02	0.02±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01	0.17±0.03*
二十碳酸 C20:0	0.01±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
顺-11-二十碳一烯酸 C20:1	0.08±0.02	0.10±0.02	0.03±0.01	0.01±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01
顺,顺,顺-9, 12, 15-十八碳三烯酸 C18:3n3	0.10±0.03	0.12±0.02	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.10±0.02
二十一碳酸 C21:0	0.02±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
顺,顺,顺-11, 14-二十碳二烯酸 C20:2	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
二十二碳酸 C22:0	0.02±0.01	0.02±0.01	0	0.01±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01
顺 11, 14, 17-二十碳三烯酸 C20:3n3	0.05±0.01	0.05±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0	0.07±0.02
顺 5,8,11,14,-二十碳四烯 C20:4n6	0.07±0.01	0.17±0.03	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.04±0.01
二十三碳酸 C23:0	0.03±0.01	0.07±0.02	0	0.02±0.01	0.01±0.01	0.05±0.02
顺 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸 C20:5n3	0.24±0.05	0.41±0.11	0.08±0.02	0.06±0.02	0.05±0.01	0.23±0.05
顺 4, 7, 10, 13, 16, 19, 17-二十 二碳六烯酸 C22:6n3DHA	0.43**±0.03	0.09±0.01	0.51±0.05**	0.02±0.01	0.44±0.04**	0.04±0.02
脂肪酸总含量 Total fatty acid content	3.50**±0.52	7.09±0.76	1.33±0.28**	10.78±1.67	1.14±0.13**	2.98±0.21

注: 十四碳酸为豆蔻酸, 十六碳酸为棕榈酸, 顺 4, 7, 10, 13, 16, 19, 17-二十二碳六烯酸(C22:6n3)为 DHA

Notes: Tetradecanoic acid is myristic, Hexadecenoic acid is palmitic acid, and cis-4, 7, 10, 13, 16, 19, 17-docosahexaenoic acid (c22:6n3) is DHA

表3 养殖鱼类肌肉内氨基酸含量
Tab.3 Amino acid contents in muscle of cultured fishes

测试指标 Test items	测试结果 Test result/(g/100 g)					
	大黄鱼 <i>P. crocea</i>		鲈鱼 <i>L. japonicus</i>		真鲷 <i>P. major</i>	
	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group
天冬氨酸 Asp	1.88±0.18	1.73±0.16	1.97±0.09	1.92±0.16	2.07±0.21	1.96±0.17
谷氨酸 Glu	3.00±0.10	2.74±0.21	3.21±0.16	3.13±0.21	3.16±0.32	2.98±0.20
甘氨酸 Gly	0.96±0.16	0.79±0.14	1.03±0.11	0.9±0.15	0.95±0.15	0.82±0.04
丙氨酸 Ala	1.24±0.20	1.05±0.11	1.26±0.13	1.05±0.20	1.17±0.21	1.22±0.15
精氨酸 Arg	1.08±0.18	1.00±0.14	1.17±0.20	1.14±0.08	1.17±0.20	1.17±0.13
丝氨酸 Ser	0.71±0.05	0.63±0.06	0.77±0.07	0.72±0.06	0.77±0.06	0.68±0.05
苏氨酸 Thr	0.82±0.09	0.76±0.09	0.87±0.05	0.85±0.07	0.91±0.10	0.88±0.04
缬氨酸 Val	0.84±0.14	0.82±0.02	0.87±0.09	0.84±0.07	0.97±0.06	0.96±0.06
异亮氨酸 Ile	0.85±0.11	0.78±0.12	0.85±0.10	0.86±0.11	0.95±0.12	0.91±0.04
亮氨酸 Leu	1.38±0.20	1.29±0.10	1.45±0.14	1.44±0.15	1.53±0.21	1.51±0.13
苯丙氨酸 Phe	0.7±0.08	0.64±0.07	0.73±0.20	0.71±0.13	0.76±0.22	0.74±0.10
赖氨酸 Lys	1.72±0.19	1.62±0.11	1.98±0.21	1.83±0.20	1.96±0.23	1.86±0.14
酪氨酸 Tyr	0.60±0.12	0.57±0.09	0.59±0.05	0.61±0.11	0.65±0.14	0.66±0.11
组氨酸 His	0.43±0.08	0.41±0.08	0.53±0.12	0.45±0.15	0.54±0.05	0.53±0.02
脯氨酸 Pro	0.84±0.13	0.59±0.10	0.82±0.05	0.26±0.07	0.98±0.13	0.39±0.01
蛋氨酸 Met	0.59±0.07	0.54±0.06	0.58±0.03	0.6±0.11	0.63±0.18	0.59±0.06
呈鲜味氨基酸 UAA	4.88±0.30*	4.47±0.41	5.18±0.17*	5.05±0.24	5.23±0.34	4.95±0.32
呈甘味氨基酸 SAA	2.20±0.20*	1.84±0.22	2.29±0.04	1.95±0.25	2.12±0.22	2.04±0.32
呈味氨基酸 FAA	8.16±0.48*	7.30±0.51	8.64±0.80	8.14±0.58	8.52±0.57	8.16±0.35
总氨基酸 TAA	17.63±0.20*	15.96±0.56	18.68±1.02	17.31±0.95	19.17±1.30*	17.87±1.32
必需氨基酸 EAA	6.31±1.0	5.92±0.73	6.75±0.70	6.53±1.35	7.08±1.52	6.86±0.92
非必需氨基酸 NEAA	11.02±0.69*	10.04±0.81	11.93±0.65*	10.78±1.01	12.09±1.80*	11.01±1.06

注：呈味氨基酸包括 Asp、Glu、Arg、Ala、Gly；呈鲜味氨基酸为 Glu 和 Asp；呈甘味氨基酸为 Gly 和 Ala

Notes: Flavor amino acids include Asp, Glu, Arg, Ala and Gly; Umami amino acids include Glu and Asp; Sweet amino acids include Gly and Ala

表4 2种模式鱼类养殖效益对比表
Tab.4 Comparison of the profits of two fish farming patterns/RMB

成本和利润 Cost and profits	大黄鱼 <i>P. crocea</i>		鲈鱼 <i>L. japonicus</i>		真鲷 <i>P. major</i>	
	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group	实验组 Treatment group	对照组 Control group
	苗种费 Fry cost	230 000	230 000	110 000	110 000	110 000
饲料费 Feed cost	0	61 710	0	59 677	0	41 527
人工费 Labor cost	11 800	20 730	11 800	20 730	11 800	20 730
设备折旧费 Equipment depreciation	6100	2500	6100	2500	6100	2500
总成本 Ttotal cost	247 900	314 940	127 900	192 907	127 900	174 757
总收入 Total revenue	602 600	446 400	360 000	288 400	364 300	241 600

3.2 灯光诱饵对养殖鱼肌肉脂肪含量影响及营养评价

段青源等(2000)研究表明, 养殖大黄鱼的体脂肪含量比野生大黄鱼的高出 1.9 倍。陈度煌等(2019)研究表明, 养殖大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肌肉内粗脂肪含量显著高于野生鱼。采用普通网箱养殖的鱼类肌肉脂肪含量较高, 这与常规网箱养殖饲料脂肪含量高且投喂充足、养殖密度过大直接相关。Watanabe 等(1982)首次提出, 鱼体脂肪一般会随着饲料脂肪含量的增加而升高。张显娟等(2001)研究也发现, 高脂肪含量的饲料会导致鱼体脂肪含量升高, 另一方面作为饵料的鲜冻小杂鱼饲料很难保证其新鲜度, 脂肪氧化和环境恶化都将导致肝脏损害, 诱发脂肪肝, 这也是养殖鱼类脂肪含量较高的原因之一。而野生大黄鱼生活在广阔的海洋, 捕食活的小鱼, 这不仅保证食物的新鲜度, 且由于活跃的捕食活动, 增加了能量消耗, 因此脂肪在体内积累减少, 肌肉脂肪含量明显降低。本研究中, 灯光诱饵装置的网箱中无人工投饵, 通过灯光吸引杂鱼小虾到网箱中, 养殖鱼类通过捕捉这些活的鱼虾为食。利用这一方式, 网箱养殖的鱼类不仅改变了食物的种类, 同时消耗了能量, 避免了脂肪的堆积, 因此大黄鱼和真鲷肌肉内脂肪含量变化与普通网箱养殖组差异极显著($P < 0.01$)。而本研究中的鲈鱼肌肉内脂肪含量改变不显著, 分析原因可能是鲈鱼腹内脂肪堆积过多, 在进行半饥饿野化瘦身时, 首先消耗腹内脂肪, 具体结果还有待进一步研究。

3.3 灯光诱饵对养殖鱼类肌肉脂肪酸含量影响及营养评价

脂肪酸在有充足氧供给的情况下, 可氧化分解为 CO_2 和 H_2O , 释放大量能量, 是机体主要能量来源之一。DHA 是一种不饱和脂肪酸, 主要来源于海藻和鱼类, 是最重要的膜磷脂成分, 影响神经递质通路、突触传递和信号转导, 可保护机体免受氧化损伤。研究表明, 鱼肉脂肪酸含量较低, 且多为不饱和脂肪酸, 是人类优质的脂肪酸来源之一。研究结果显示, 采用灯光诱饵模式养殖的 3 种鱼类肌肉脂肪酸中十六碳酸、十八碳酸及 DHA 含量与对照组相比差异显著($P < 0.01$), 与段青源(2000)、颜孙安等(2015)研究结果一致。推测, 这可能是因为灯光诱饵网箱内的鱼能捕捉到更多富含多不饱和脂肪酸的海洋活饵料, 因此其 DHA 等多不饱和脂肪酸含量增加。EPA 和花生四烯酸的含量并无显著性差异, 但 3 种鱼对照组的花生四烯酸含量均高于实验组, 推测原因可能是由于配合饲

料中添加了花生四烯酸。由此可以看出, 本研究中的 3 种鱼自南方传统投饵网箱养殖北运至青岛进行半饥饿野化瘦身之后, 体内 DHA 含量显著增加、棕榈酸含量显著减少, 这种模式下养殖获得的鱼类品质更加优良, 对人体更有益。因此, 灯光诱饵网箱养殖是一种更利于人类饮食健康的养殖方式。

3.4 灯光诱饵对养殖鱼肌肉氨基酸含量影响及营养评价

氨基酸是蛋白质的最基本单位, 通常分为必需氨基酸和非必需氨基酸。研究表明, 食品味道鲜美的程度主要由其呈味氨基酸(包括 Asp、Glu、Arg、Ala 和 Gly)的组成和含量所决定。近年来研究表明, 网箱养殖大黄鱼呈味氨基酸总量、氨基酸含量显著低于野生大黄鱼(颜孙安, 2015; 阮成旭等, 2017), 从而导致普通网箱养殖鱼类会出现土腥味, 口感不佳。刘峰等(2018)研究发现, 饥饿可对大黄鱼幼鱼的氨基酸和脂肪酸含量造成影响, 并提出通过适当的饥饿处理可改变肌肉中氨基酸和脂肪酸含量, 并改善大黄鱼的肉质风味的策略。3 种鱼实验组和对照组相比呈味氨基酸、呈鲜味氨基酸、呈甘味氨基酸及总氨基酸含量均显著提高($P < 0.05$), 这是由于本研究中的鱼类通过灯光诱饵获取活体食物, 自然饵料丰度不足, 鱼类处于半饥饿状态, 可能会改变其氨基酸含量及种类比重, 从而改善其口感, 进一步说明这种养殖模式可提高养殖鱼类的食用品质。

3.5 经济效益与社会效益

本研究通过灯光诱饵的方法, 改变传统网箱养殖投喂冰鲜杂鱼和配合饲料的养殖模式, 与普通网箱养殖模式相比, 养殖鱼类生长速度有所降低, 但全程零投饵降低了养殖成本, 提高了养殖鱼的品质, 养殖商品鱼的单价显著高于普通投饵养殖鱼类。另外, 由于养殖过程中不需要人工投饵, 饲料成本和人工成本均显著降低, 因此, 灯光诱饵模式养殖的鱼类总体收益显著高于普通养殖模式, 更加符合目前“提质增效”的养殖理念。同时, 此种养殖模式作为海洋牧场的组成部分, 还可促进海洋牧场的多元化、健康发展, 示范带动效应强, 高质量发展特征明显; 另外, 养殖鱼类捕捉活体饵料, 避免了野生杂鱼的滥捕、颗粒饵料对养殖海区及周围海区的污染, 符合“绿色生态”水产养殖新理念的要求。

综上所述, 利用太阳能灯光诱饵深水网箱养殖模式可为养殖鱼类模拟野生环境捕食状态。由于养殖全程不投喂饵料, 鱼类经过半饥饿野化瘦身, 成品鱼体

型修长, 肥满度降低, 脂肪含量降低, 且鱼肌肉内总氨基酸含量、呈味氨基酸含量、呈鲜味氨基酸含量、呈甘味氨基酸含量和 DHA 含量均升高; 口感提升, 采用此方法养殖的鱼类品质高于普通网箱养殖鱼类, 养殖效益也显著提升, 此种养殖模式可作为一种绿色健康养殖模式进行推广。

参 考 文 献

- ALASALVAR C, TAYLOR K D A, ZUBCOV E, *et al.* Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 2002, 79(2): 145–150
- CHEN D H, HE G S, LIU Y H, *et al.* Comparison of muscle nutrients between wild and cultured *Micropterus salmoides*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(22): 94–96, 115 [陈度煌, 何国森, 刘银华, 等. 野生与养殖大口黑鲈肌肉营养成分的比较. *安徽农业科学*, 2019, 47(22): 94–96, 115]
- DU F Y, WANG L G, WANG X H, *et al.* Effects of light trap on meso-and micro-zooplankton communities in the waters of Nansha Islands, South China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 556–565 [杜飞雁, 王亮根, 王雪辉, 等. 灯光诱集对中小型浮游动物群落的生态学效应. *水产学报*, 2017, 41(4): 556–565]
- DUAN Q Y, ZHONG H Y, SI L G, *et al.* Comparative analyses of biochemical composition in net cultured and wild *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2000, 19(2): 125–128 [段青源, 钟惠英, 斯列刚, 等. 网箱养殖大黄鱼与天然大黄鱼营养成分的分析比较. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2000, 19(2): 125–128]
- FEI F, REN J L, DAI M Y, *et al.* Effects of five kinds of light color environments on nutritional quality of *Dicentrarchus labrax*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(5): 2431–2441 [费凡, 任纪龙, 代明允, 等. 5 种光色环境对欧洲舌齿鲈营养品质的影响. *动物营养学报*, 2019, 31(5): 2431–2441]
- GUO Q Y, XIN X L, JIANG C J, *et al.* Quality characteristics and differences of wild and cultured large yellow croakers (*Larimichthys crocea*). *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(10): 92–101 [郭全友, 邢晓亮, 姜朝军, 等. 野生和养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)品质特征与差异性探究. *现代食品科技*, 2019, 35(10): 92–101]
- LI J, SHI Y, ZHENG J, *et al.* Impact of light bait deep-water anti-wind and wave cage fish culture technology on the environment of aquaculture sea area. *China Fisheries*, 2020(7): 61–63 [李靖, 石莹, 郑炯, 等. 灯光诱饵深水抗风浪网箱养鱼技术对养殖海域环境的影响. *中国水产*, 2020(7): 61–63]
- LIU C, JI H, WANG T, *et al.* Feeding experiment of cage reared paddlefish with light trapping techniques. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2012, 33(5): 59–62 [刘超, 吉红, 王涛等. 基于网箱灯光诱饵技术的匙吻鲟养殖试验. *家畜生态学报*, 2012, 33(5): 59–62]
- 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 S T, LI Y H, LI X, *et al.* Effects of LED spectra on growth, feeding, and digestive enzyme activities of juvenile *Takifugu rubripes*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 1011–1019 [刘松涛, 李伊晗, 李鑫, 等. 不同 LED 光谱对红鳍东方鲀幼鱼生长发育、摄食及消化酶活性的影响. *中国水产科学*, 2021, 28(8): 1011–1019]
- MAIRESSE G, THOMAS M, GARDEUR J N, *et al.* Appearance and technological characteristics in wild and reared Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (L.). *Aquaculture*, 2005, 246(1/2/3/4): 295–311
- MIAO F R, LIU J, WANG D H, *et al.* Meat quality of *Pseudosciaena crocea* cultivated by different methods. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 22(4): 372–377 [缪伏荣, 刘景, 王淡华, 等. 不同养殖模式大黄鱼肉质性状的分析研究. *福建农业学报*, 2007, 22(4): 372–377]
- RUAN C X, YUAN C G, TAO C L, *et al.* Influence of culture patterns on flesh quality of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 623–627 [阮成旭, 袁重桂, 陶翠丽, 等. 不同养殖模式对大黄鱼肉质的影响. *水产科学*, 2017, 36(5): 623–627]
- SHEN W L, WU X F, SHENTU J K, *et al.* The effects of different diets and culture. Environments on the morphological variations in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 70–77 [沈伟良, 吴雄飞, 申屠基康, 等. 不同饵料及养殖环境对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态差异的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 70–77]
- WATANABE T. Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1982, 73(1): 3–15
- WU L, WU H X, MA J Z, *et al.* Effect of light color on feeding, growth, and survival of *Plectropomus leopardus* juveniles. *Marine Sciences*, 2016, 40(11): 44–51 [吴亮, 吴洪喜, 马建忠, 等. 光色对豹纹鳃棘鲈幼鱼摄食、生长和存活的影响. *海洋科学*, 2016, 40(11): 44–51]
- YAN S A, YAO Q H, LIN X X, *et al.* Nutrient profile of large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea* Richardson) grown under different aquacultural settings. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(8): 736–744 [颜孙安, 姚清华, 林香信, 等. 不同养殖模式大黄鱼肌肉营养成分比较. *福建农业学报*, 2015, 30(8): 736–744]
- ZHANG Y Q, QIN F, FEI F, *et al.* Analysis of propagation

characteristics of LED light source in aquaculture water. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 153–161 [张延青,

秦菲, 费凡, 等. LED光源在海水养殖水体中传播特征解析. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 153–161]

(编辑 马瑰艳)

Effect of Light Trapping Technology on Fish Quality in Deep Water Cage Fish Culture

LI Jing, SHI Ying, HAN Bing^①, ZHENG Jiong, FENG Ruoyan
(Qingdao Fishery Technology Extension Station, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract To study the influence of light trapping technology on the quality of fishes cultured in deep-water cages, light trapping equipment was designed and installed in deep-water cages in Qingdao. Light trapping equipment involves green LED light (wavelength 525~530 nm) installed on the cage to attract live prey in the sea, providing natural food for the cultured fishes inside the cage. In this study, three important fish species were selected: *Pseudosciaena crocea*, *Lateolabrax japonicus*, and *Pagrosomus major*. Since there were no artificial feedings throughout the culture period, the fishes are in a semi-wild growth state. The quality of the cultured fish was determined by measuring the fat, fatty acid, and amino acid content of the specimens in the treatment cages (equipped with light trapping equipment) and traditional cages (with artificial feedings and without light trapping equipment) after a 5-months' culture period. The results showed that the sensory characteristics of *P. crocea*, *L. japonicus*, and *P. major* in the treatment cages were significantly better than the fishes in traditional cages. The body fat of the three fishes cultured by light trapping technology were significantly lower than those of the control groups ($P<0.05$). The crude fat contents in the muscles of *P. crocea* and *P. major* cultured in treatment cages was 75.24% and 46.81%, which were significant lower than those of traditional cage culture fishes ($P<0.01$). There was no significant difference in the crude fat content in the muscle of *L. japonicus* ($P>0.05$). The docosahexaenoic acid content in the muscles of *P. crocea*, *L. japonicus*, and *P. major* in treatment cages were extremely significant higher than those in fishes cultured in traditional cages ($P<0.01$). Moreover, the total fatty acid content and palmitic acid content were significantly lower than those in fishes cultured in traditional cages ($P<0.01$). Under the influence of light trapping equipment, the indices including the contents of taste amino acids, umami amino acids, sweet amino acids, total amino acids, and non-essential amino acids in the muscles of the three fish species in the treatment group were significantly higher than those of the traditional groups ($P<0.05$). And the contents of flavored amino acids, umami flavored amino acids and sweet flavored amino acids in *P. crocea* in the treatment groups increased 11.78%, 9.17%, and 19.57% than those in traditional groups. Moreover, the difference was significant. All the results show that although the deep-water net cage fish culture technology with light trapping reduces the growth rate of cultured fish, but it can improve the fish quality and increase output efficiency. The system could be used to promote and apply a green and healthy aquaculture model.

Key words Light trapping system; Deep water cage; Fish; Fat; Fatty acid; Amino acid

① Corresponding author: HAN Bing, E-mail: yujizhan123@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210522002

http://www.yykxjz.cn/

蔡丽君, 郭全友, 马东林, 王海华, 杨絮, 马本贺, 黄海潮, 郑尧. 池塘和稻田养殖模式对泥鳅营养品质的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 196–206

CAI L J, GUO Q Y, MA D L, WANG H H, YANG X, MA B H, HUANG H C, ZHENG Y. Effects of pond-cultivation and paddy-cultivation modes on nutritional quality of loach. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 196–206

池塘和稻田养殖模式对泥鳅营养品质的影响*

蔡丽君^{1,2} 郭全友^{2①} 马东林² 王海华^{3,4,5} 杨絮²
马本贺^{3,4,5} 黄海潮² 郑尧²

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 201306;
3. 江西省水产科学研究所 江西 南昌 330039; 4. 农业农村部湖泊渔业资源环境科学观测实验站
江西 南昌 330039; 5. 南昌市特种水产繁育与健康养殖重点实验室 江西 南昌 330039)

摘要 为探究不同养殖模式对台湾泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus* ssp.)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)营养品质的影响,本研究分析了池塘和稻田养殖模式下,台湾泥鳅和泥鳅的形体性状、营养成分和品质差异,并探讨了这些指标间的相关性。结果显示,台湾泥鳅的肥满度显著高于泥鳅,其中,池塘养殖模式下的台湾泥鳅(*P. dabryanus* ssp. pond-cultivated, PPOC)肥满度(1.00±0.01)显著高于池塘养殖模式下的泥鳅(*M. anguillicaudatus* pond-cultivated, MPOC) (0.50±0.01) ($P<0.05$)。泥鳅的粗蛋白含量显著高于台湾泥鳅($P<0.05$),而粗脂肪含量显著低于台湾泥鳅($P<0.05$),其中,稻田养殖模式下的泥鳅(*M. anguillicaudatus* paddy-cultivated, MPAC)粗蛋白含量最高,达(21.09±0.57)%。除内聚性外,台湾泥鳅的质构特性显著高于泥鳅($P<0.05$);养殖模式对2种泥鳅的形体性状有显著影响,PPOC肥满度显著高于稻田养殖模式下的台湾泥鳅(*P. dabryanus* ssp. paddy-cultivated, PPAC) ($P<0.05$),MPOC肥满度显著低于MPAC ($P<0.05$)。池塘养殖模式下2种泥鳅的致动脉粥样化指数和血栓形成指数显著低于稻田养殖的相同品种($P<0.05$),硬度(PPOC)>硬度(PPAC),弹性(MPOC)<弹性(MPAC) ($P<0.05$),稻田养殖模式的2种泥鳅的谷氨酸、精氨酸、组氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸高于池塘模式的相同品种(TAV>1)。主成分分析结果显示,形体性状与营养品质密切相关,肥满度与体长体高比呈负相关(-0.996),与质构特征、粗脂肪含量呈正相关,与水分、灰分、粗蛋白含量呈负相关。基于肥满度、质构等指标,PPOC最适合作为泥鳅加工原料。

关键词 台湾泥鳅; 泥鳅; 养殖模式; 形体特征; 营养品质

中图分类号 TS254.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0196-11

台湾泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus* ssp.)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)均隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、花鳅亚科

(Cobitinae),是药食同源的美味佳肴,素有“水中人参”的美誉,广泛分布于中国、日本和朝鲜等地(Wang et al, 2018; 张晓霞, 2019)。作为经济型淡水养殖鱼

* 国家重点研发计划(2018YFD0901704)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD68)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901704), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD68)]. 蔡丽君, E-mail: Leahclj@163.com

① 通讯作者: 郭全友, 研究员, E-mail: dhsguoqy@163.com

收稿日期: 2021-05-22, 收修改稿日期: 2021-06-11

类, 泥鳅 2019 年产量为 35.69 万 t, 其中, 我国江西产量最多, 达 7.91 万 t, 占全国泥鳅产量的 22.17% (农业农村部渔业渔政管理局, 2020)。目前, 常见泥鳅品种有泥鳅(俗称青鳅、真泥鳅)、台湾泥鳅和中华沙鳅(*Botia supercilialis*)等(张晓霞, 2019)。台湾泥鳅生长快、肥满度高, 而泥鳅体形较小、营养价值高, 二者已成为我国主养的泥鳅品种。

养殖泥鳅品质受环境的影响较大。目前, 泥鳅养殖有池塘、稻田和套养(莲藕塘、虾蟹塘、蛙池等)等模式(Yang *et al*, 2018、2019), 以池塘和稻田养殖模式为主(张晓霞, 2019)。其中, 稻田养殖模式作为由水稻和泥鳅 2 部分组成的典型综合养殖系统, 与池塘模式相比, 其饵料更为丰富, 养殖密度低, 生存环境更接近于野生。Yang 等(2017、2018)研究表明, 稻田养殖模式下泥鳅酮体增重更多, 前肠的超氧化物歧化酶和中肠溶菌酶活性更高, 肠道消化酶活性水平有所提高。除此之外, 不同品种泥鳅其生长速率、形体、质构、营养和风味等存在差异(Johnston *et al*, 2006; 张殿福等, 2020)。黄菊等(2015)研究发现, 台湾泥鳅生长性能优于真泥鳅和大鳞副泥鳅(*P. dabryanus*)。大鳞副泥鳅油润多汁、肉质鲜美, 北方泥鳅(*Misgurnus bipartitus*)肉质细嫩(许元峰等, 2020)。目前, 许多学者分析了野生泥鳅(韩光明等, 2016)、亲本杂交泥鳅(尤宏争等, 2017)、池养台湾泥鳅及大鳞副泥鳅(韩光明等, 2016; 戴璐怡等, 2021)等品质的差异性, 但对泥鳅、台湾泥鳅在不同养殖模式下肌肉的营养品质差异鲜有报道。

本研究以台湾泥鳅和泥鳅为对象, 分析其在池塘和稻田 2 种典型养殖模式下的营养品质差异, 并采用多元统计分析解析其潜在原因, 以期筛选适宜的泥鳅加工原料提供基础数据, 服务于泥鳅加工业。

1 材料与方法

1.1 实验材料

池塘养殖模式下的台湾泥鳅(*P. dabryanus* ssp. pond-cultivated mode, PPOC)源自江西省水产科学研究所泥鳅黄鳝科研实验基地, 稻田养殖模式下的台湾泥鳅(*P. dabryanus* ssp. paddy-cultivated, PPAC)源自江西省龙泰水产养殖有限公司, 池塘养殖模式下的泥鳅(*M. anguillicaudatus* pond-cultivated, MPOC)源自江西省上饶市玉山县淑山家庭农场, 稻田养殖模式下的泥鳅(*M. anguillicaudatus* paddy-cultivated, MPAC)源自江西省上饶市信州区朝晖苗木种植农民专业合作社。

上述 4 种样品为 18 月龄鲜活泥鳅, 养殖期间每日投喂 2 次人工饲料, 每日手撒投喂量为养殖泥鳅总重的 3% (根据天气及摄食情况略有增减), 并每 15 d 消毒、检查水质和泼洒 1 次微生态制剂调水, 做好病害防治, 于 2020 年 11 月 1 日活体运至实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 形体指标测定 将鲜活泥鳅进行 24 h 饥饿处理后, 加入适量冰块和水, 静置 15~20 min, 泥鳅进入休眠状态后, 测量其体长、体高和体重, 计算体长体高比(ratio of body length to height, RLH)及肥满度(condition factor, CF)(GB/T 18654.4-2008), 见式(1)和式(2)。重复 6 次, 取平均值。

$$RLH=L/H \quad (1)$$

$$CF=(W/L^3)\times 100 \quad (2)$$

式中, L 为体长(cm); H 为体高(cm); W 为体重(g)。

1.2.2 营养指标测定 基本营养成分测定: 水分采用 105℃ 恒重法测定(GB 5009.3-2016); 灰分测定采用马弗炉 550℃ 高温灼烧法(GB 5009.4-2016); 粗蛋白质含量测定采用微量凯氏定氮法测定(GB 5009.5-2016); 粗脂肪含量测定采用索氏抽提法(GB 5009.6-2016)。重复 3 次, 取平均值。

脂肪酸含量测定根据 GB 5009.168-2016《食品中脂肪酸的测定》中水解法提取, 并利用 37 种脂肪酸甲酯混标(Sigma 公司, 美国)等试剂, 通过 Agilent 7890A 气相色谱(安捷伦科技(中国)有限公司), 测定脂肪酸甲酯含量, 经转换系数计算得出。测试参数如下: 毛细管色谱柱(柱长为 100 m, 内径为 0.25 mm, 膜厚为 0.2 μm); 进样器温度为 270℃, 检测器温度为 280℃; 进样体积为 1 μL, 分流比为 100:1; 升温程序: 初始温度为 100℃, 保持 13 min, 以 10℃/min 升温至 180℃, 保持 6 min, 再以 1℃/min 升温至 200℃, 保持 20 min, 最后以 4℃/min 升温至 230℃, 保持 10.5 min。重复 2 次, 取平均值。

1.2.3 品质指标测定 质构测定: 泥鳅经去头、去皮、去内脏后, 沿脊柱切取完整肉块(图 1)。分别取 10 mm×7 mm×4 mm 和 30 mm×7 mm×4 mm 的泥鳅背部肌肉(中部), 采用 TMS-PRO 质构仪(FTC 公司, 美国)进行质构剖面分析模式(TPA)下的挤压和剪切试验。挤压试验参数: 测试速度为 30 mm/min, 形变量为 50%, 回程距离为 30 mm; 剪切试验参数: 测试速度为 30 mm/min, 回程距离为 30 mm。重复 6 次, 取平均值。



图1 泥鳅质构测量位置示意图

Fig.1 Schematic diagram of texture measured positions of loach TPA

游离氨基酸测定参考周纷等(2019)的方法,称取样品 2.0 g,加入 15 mL 质量分数为 5%的三氯乙酸溶液并匀浆,样品超声 5 min 后静置 2 h,然后离心(10 000 r/min、4℃、10 min)并移取上清液 5 mL 于烧杯中,用 6 mol/L NaOH 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 2.0,最后用超纯水定容至 10 mL,用 0.22 μm 水相滤膜过滤后打入进样瓶待上机测定。采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦科技(中国)有限公司)测试参数如下:分离柱(4.6 mm×60.0 mm),树脂为阳离子交换树脂;分离柱温度为 57℃;1 通道流速为 0.4 mL/min;2 通道流速为 0.35 mL/min;流动相: pH 为 3.2、3.3、4.0、4.9 的柠檬酸钠和柠檬酸的混合缓冲液以及质量分数为 4%的茚三酮缓冲液。重复 2 次,取平均值。

1.2.4 脂肪酸和游离氨基酸的评价方法 致动脉粥样化指数(index of atherogenic, IA)、血栓形成指数(index of thrombogenic, IT) (楼乔明等, 2016)用于评估养殖泥鳅对人类心血管疾病发生的影响, 见式(3)和式(4); 滋味强度值(taste activity value, TAV) (周纷等, 2019)用于评价养殖泥鳅的呈味特性, 见式(5)。

$$IA = (C_{12:0} + C_{14:0} + C_{16:0}) / (\Sigma MUFA + \Sigma PUFA) \quad (3)$$

$$IT = (C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0}) / [0.5 \times \Sigma MUFA + 0.5 \times n-6 \Sigma PUFA + 3 \times n-3 \Sigma PUFA + (n-3 \Sigma PUFA / n-6 \Sigma PUFA)] \quad (4)$$

$$TAV(\text{mg/mL}) = C/T \quad (5)$$

式中, $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:0}$ 为月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸分别占总脂肪酸含量的比例(%); $\Sigma MUFA$ 为单不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的总和(%); $\Sigma PUFA$ 为多不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的总和(%); $n-3 \Sigma PUFA$ 为多不饱和脂肪酸中 $n-3$ 的总和;

$n-6 \Sigma PUFA$ 为多不饱和脂肪酸中 $n-6$ 的总和; C 为滋味物质的绝对含量(mg/100 g); T 为该滋味物质的味道阈值(mg/100 mL)。

1.3 数据处理

数据采用平均值±标准差表示,由 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较检验进行显著性评价($P < 0.05$);将 PPOC、PPAC、MPAC 和 MPOC 的 12 个指标标准化处理后进行主成分分析(马龙等, 2013);通过 Graphpad Prism 7.0 软件制作游离氨基酸热图以及 Origin 2021 软件制作载荷图。

2 结果与分析

2.1 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的形体特征

由表 1 可知,除体长和体高比外,台湾泥鳅形体指标均显著大于泥鳅。肥满度与体长体高比呈负相关,可能与品种、养殖密度和投喂量等密切相关,即 PPOC 肥满度最大(1.00±0.01),而体高体长比最小(6.53±0.16),相比 MPOC 肥满度大 2 倍。PPOC 体重、体高和肥满度均显著高于 PPAC ($P < 0.05$),体长体高比则相反;MPOC 肥满度(0.50±0.01)显著低于 MPAC (0.73±0.03) ($P < 0.05$),MPOC 体长体高比显著高于 MPAC ($P < 0.05$)。

2.2 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的营养差异

2.2.1 基本营养成分差异 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅、泥鳅的营养成分差异较为明显(表 2)。台湾泥鳅水分、灰分和粗蛋白含量显著低于泥鳅 ($P < 0.05$),粗脂肪则相反($P < 0.05$),其中,MPAC 粗蛋白含量最高为(21.09±0.57)%,PPOC 粗蛋白含量最低为(17.00±0.28)%。从养殖模式上看,台湾泥鳅除粗脂肪外,其水分、灰分和粗蛋白含量趋势均为 PPOC < PPAC ($P < 0.05$),而泥鳅除水分和灰分外 ($P > 0.05$),粗蛋白含量呈 MPAC < MPOC ($P < 0.05$),表明稻田模式泥鳅的营养成分含量高于池塘。

2.2.2 脂肪酸差异 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅共检测出 22 种脂肪酸,其中 8 种饱和脂肪酸(SFA)、5 种单不饱和脂肪(MUFA)和 9 种多不饱和脂肪酸(PUFA)(表 3)。PPOC 的 $\Sigma PUFA$ 显著高于 MPOC ($P < 0.05$),PPAC 的 $\Sigma PUFA$ 显著低于 MPAC ($P < 0.05$),不饱和脂肪酸含量(UFA)也呈现相同趋势。

表 1 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的形体比较
Tab.1 Body comparison of *P. dabryanus* ssp. and *M. anguillicaudatus* respectively pond-cultivated and paddy-cultivated

样品 Sample	指标 Index				
	体重 Weight/g	体长 Length/cm	体高 Height/cm	体长体高比 Ratio of body length to height	肥满度 Condition factor
PPOC	67.45±2.22 ^a	18.47±0.62 ^a	2.83±0.13 ^a	6.53±0.16 ^d	1.00±0.01 ^a
PPAC	51.50±2.22 ^b	18.50±0.50 ^a	2.34±0.11 ^b	7.58±0.23 ^c	0.84±0.03 ^b
MPOC	8.66±0.69 ^c	11.99±0.23 ^b	1.15±0.06 ^c	10.82±0.38 ^a	0.50±0.01 ^d
MPAC	10.52±0.26 ^c	11.52±0.18 ^b	1.33±0.04 ^c	8.65±0.32 ^b	0.73±0.03 ^c

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$), 下同

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), the same as below

表 2 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的基本营养成分含量(湿基, %)
Tab.2 Nutritional comparisons of muscle of *P. dabryanus* ssp. and *M. anguillicaudatus* respectively pond-cultivated and paddy-cultivated (wet mass, %)

样品 Sample	指标 Index			
	水分 Moisture	灰分 Ash	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat
PPOC	70.90±0.55 ^c	1.51±0.01 ^c	17.00±0.28 ^d	3.33±0.12 ^a
PPAC	73.14±0.49 ^b	1.87±0.08 ^b	18.60±0.24 ^c	3.43±0.10 ^a
MPOC	77.21±0.21 ^a	2.61±0.08 ^a	19.67±0.68 ^b	0.85±0.03 ^b
MPAC	76.23±0.44 ^a	1.77±0.04 ^b	21.09±0.57 ^a	1.14±0.04 ^b

PPOC 脂肪酸种类为 18 种, PPAC 脂肪酸种类为 22 种, MPOC 脂肪酸种类为 11 种, MPAC 脂肪酸种类为 20 种, 表明稻田养殖模式下 2 种泥鳅的脂肪酸种类多于池塘养殖的相同品种。PPOC 的 Σ UFA 显著高于 PPAC ($P<0.05$), MPOC 的 Σ UFA 显著低于 MPAC ($P<0.05$)。PPOC 的 EPA+DHA (9.69±0.09)% 显著高于 PPAC (6.50±0.00)% ($P<0.05$), MPOC 的 EPA+DHA (13.76±0.12)% 显著高于 MPAC (5.70±0.06)% ($P<0.05$); PPAC 的 n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA 是 PPOC 的 3.05 倍, MPOC 的 n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA 是 MPAC 的 1.37 倍。PPOC 的 IA 和 IT 显著低于 PPAC ($P<0.05$), MPOC 的 IA 和 IT 显著低于 MPAC ($P<0.05$)。

2.3 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的品质差异

2.3.1 质构特性差异 表 4 为池塘和稻田养殖模式对台湾泥鳅与泥鳅肌肉质构特性的影响。除内聚性外, 台湾泥鳅的 5 项质构指标均显著高于泥鳅 ($P<0.05$)。PPOC 硬度、内聚性和弹性等 6 个指标均显著高于 PPAC ($P<0.05$), 而 MPOC 弹性、咀嚼性、内聚性和剪切力均显著低于 MPAC ($P<0.05$), 内聚性规律与之相反($P<0.05$)。此外, 弹性、咀嚼性和剪切力的规律一致, 即 PPOC>PPAC>MPAC>MPOC

($P<0.05$); 硬度与胶黏性规律一致, 即 PPOC>PPAC>MPOC≈MPAC。整体来看, 养殖模式对台湾泥鳅差异显著, PPOC 的质构特性显著高于 PPAC ($P<0.05$), 而泥鳅此规律并不明显。

2.3.2 游离氨基酸差异 如图 2 所示, 每种泥鳅样品都检测出 17 种游离氨基酸, 且每种游离氨基酸含量都呈现出 MPAC>PPAC>MPOC>PPOC, 表明同一养殖模式下, 泥鳅肌肉的游离氨基酸含量大于台湾泥鳅; 稻田养殖模式下 2 种泥鳅肌肉游离氨基酸含量高于池塘养殖的相同品种。然而, 游离氨基酸含量越高不一定对食品的味道贡献越大, 通常利用滋味强度值 (TAV) 表示某一滋味物质对整体滋味的贡献程度。当某一游离氨基酸的 TAV>1 时, 表明该物质有滋味活性, 且对整体滋味具有显著贡献(周纷等, 2019; Chen *et al.*, 2007)。MPOC、MPAC、PPAC 与 PPOC 的呈味物质分别为 5、5、5 和 4 种, 表明泥鳅的滋味贡献物质多于台湾泥鳅。4 种样品的呈味物质中均有 Glu、Arg、His 和 Met (TAV>1), 其中, Glu 的 TAV 值最大 (2.61~4.27) 且呈现鲜味, Arg、His 和 Met 呈现苦味。

2.4 池塘与稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的特征主成分分析

主成分分析是利用降维原理, 将多个指标转化成

表3 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的脂肪酸组成及含量
Tab.3 Amino acid composition of muscle of *P. dabryanus* ssp. and *M. anguillicaudatus* respectively pond-cultivated and paddy-cultivated (%)

脂肪酸 Fatty acid	PPOC	PPAC	MPOC	MPAC
C6:0	—	—	1.83±0.07 ^a	0.56±0.01 ^b
C12:0	—	0.35±0.01	—	—
C14:0	1.38±0.00 ^b	3.43±0.04 ^a	—	1.46±0.01 ^b
C15:0	0.35±0.00 ^c	2.32±0.01 ^a	—	0.93±0.00 ^b
C16:0	15.74±0.01 ^d	19.87±0.05 ^a	17.75±0.01 ^c	18.93±0.12 ^b
C17:0	—	2.27±0.08 ^a	—	0.83±0.01 ^b
C18:0	2.54±0.00 ^d	4.38±0.02 ^b	6.26±0.02 ^a	4.02±0.05 ^c
C23:0	0.92±0.00 ^d	5.18±0.01 ^a	4.20±0.01 ^b	1.72±0.02 ^c
C16:1n7	7.67±0.02 ^b	12.26±0.10 ^a	3.38±0.02 ^d	6.48±0.04 ^c
C17:1n7	0.39±0.00 ^c	2.60±0.00 ^a	—	0.63±0.00 ^b
C18:1n9c	21.41±0.03 ^a	17.43±0.03 ^c	19.26±0.15 ^b	21.54±0.00 ^a
C20:1	0.75±0.00 ^b	0.44±0.01 ^c	—	1.41±0.05 ^a
C22:1n9	0.42±0.00 ^c	—	1.21±0.00 ^a	0.96±0.01 ^b
C18:2n6c	30.53±0.02 ^a	10.20±0.06 ^d	27.81±0.00 ^b	25.48±0.29 ^c
C18:3n6	0.99±0.01 ^b	0.62±0.01 ^c	—	1.32±0.12 ^a
C18:3n3	3.97±0.06 ^c	7.79±0.01 ^a	1.70±0.00 ^d	5.15±0.08 ^b
C20:3n6	2.01±0.01 ^b	1.07±0.00 ^d	2.83±0.05 ^a	1.52±0.02 ^c
C20:2	0.77±0.00 ^d	1.34±0.00 ^a	—	0.92±0.01 ^b
C20:3n3	—	0.59±0.01	—	—
C22:2n6	0.47±0.01 ^a	0.50±0.00 ^a	—	—
C20:5n3(EPA)	1.79±0.01 ^b	3.08±0.00 ^a	—	1.54±0.01 ^c
C22:6n3(DHA)	7.90±0.08 ^b	3.41±0.00 ^d	13.76±0.12 ^a	4.16±0.05 ^c
EPA+DHA	9.69±0.09 ^b	6.50±0.00 ^c	13.76±0.12 ^a	5.70±0.06 ^d
ΣSFA	20.93±0.00 ^d	37.80±0.01 ^a	30.04±0.07 ^b	28.44±0.13 ^c
ΣMUFA	30.63±0.03 ^c	32.74±0.06 ^a	23.85±0.13 ^d	31.01±0.10 ^b
ΣPUFA	48.44±0.03 ^a	28.62±0.07 ^d	46.11±0.06 ^b	40.10±0.23 ^c
n-3 ΣPUFA	13.67±0.03 ^c	14.88±0.02 ^b	15.46±0.12 ^a	10.85±0.14 ^d
n-6 ΣPUFA	31.99±0.01 ^a	11.33±0.05 ^d	27.81±0.00 ^b	26.80±0.41 ^c
n-3 ΣPUFA/n-6 ΣPUFA	0.43±0.00 ^c	1.31±0.00 ^a	0.56±0.00 ^b	0.41±0.01 ^d
ΣUFA	79.07±0.00 ^a	61.36±0.01 ^d	69.96±0.07 ^c	71.11±0.13 ^b
致动脉粥样化指数 IA	0.27±0.00 ^c	0.55±0.00 ^a	0.25±0.00 ^d	0.35±0.00 ^b
血栓形成指数 IT	0.27±0.00 ^d	0.41±0.00 ^a	0.33±0.00 ^c	0.39±0.00 ^b

注：同行不同小写字母表示显著差异($P<0.05$)

Note: Different small letters in the same row denote significantly different ($P<0.05$)

少数几个互不相关的综合指标,并可反映较多的原来变量信息(马龙等,2013)。目前,主成分分析方法已运用于分析鱼类形体或品质间相关性,韩慧宗等(2016)运用该方法发现,12、15、18月龄许氏平鲱(*Sebastes schlegeli*)的8个形体指标间具有密切联系。胡芬等(2011)采用主成分分析方法研究不同季节湖北5种淡水鱼的质构特性与基本成分间的相关性。本研

究中,泥鳅形体性状、质构特性和营养成分存在密切的相关性(相关系数绝对值 >0.5),说明各指标之间存在信息上的重叠,适合进行主成分分析。图3中水分(X_9)在PC1上具有最大的载荷,其特征值(λ)为10.018($\lambda \geq 1$),方差贡献率为83.485%,内聚性(X_4)在PC2上具有较大的载荷,特征值(λ)为1.143($\lambda \geq 1$),方差贡献率为9.522%,二者累计方差贡献率为93.01%

表 4 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的质构特性比较
Tab.4 Comparison of texture properties of *P. dabryanus* ssp. and *M. anguillicaudatus* respectively pond-cultivated and paddy-cultivated

样品 Sample	指标 Index					
	硬度 Hardness/N	内聚性 Cohesiveness/Ratio	弹性 Springiness/mm	胶粘性 Gumminess/N	咀嚼性 Chewiness/mj	剪切力 Shear force/N
PPOC	40.00±1.16 ^a	0.46±0.01 ^a	0.97±0.02 ^a	18.35±0.37 ^a	18.32±0.26 ^a	25.61±0.71 ^a
PPAC	38.04±0.07 ^b	0.27±0.00 ^d	0.52±0.02 ^b	11.45±0.24 ^b	5.92±0.06 ^b	22.47±0.82 ^b
MPOC	17.85±0.25 ^c	0.31±0.01 ^c	0.20±0.00 ^d	5.39±0.14 ^c	1.05±0.03 ^d	8.09±0.37 ^d
MPAC	16.39±0.37 ^c	0.35±0.01 ^b	0.31±0.00 ^c	5.81±0.11 ^c	1.80±0.05 ^c	9.69±0.14 ^c

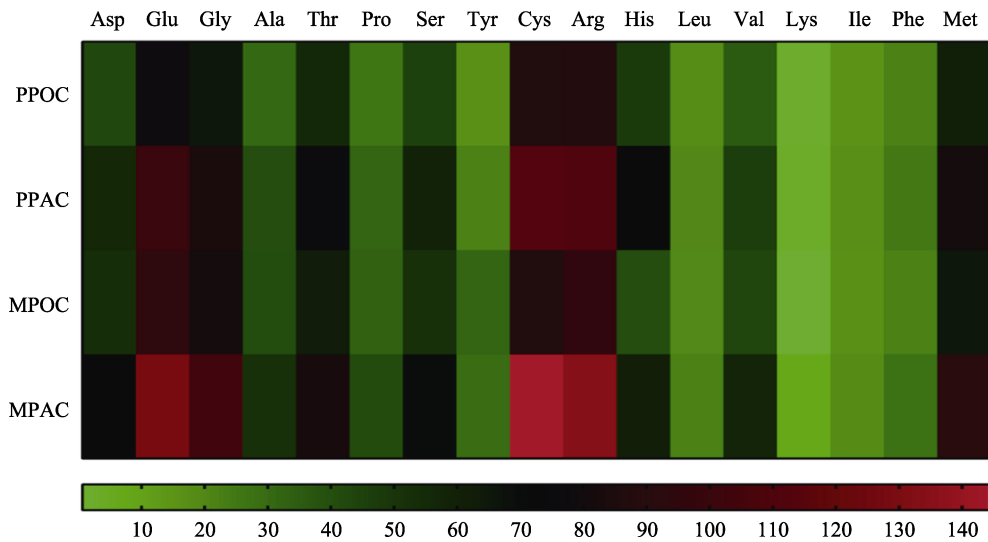


图 2 池塘与稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的游离氨基酸热图
Fig.2 Free amino acid heatmap of *P. dabryanus* ssp. and *M. anguillicaudatus* pond-cultivated and paddy-cultivated

(>85%), 较好地反映了泥鳅形体性状与营养品质间的差异性, 有望作为优选泥鳅适合养殖模式的评价依据。而且弹性、肥满度和粗脂肪等 7 者间正相关程度高, 水分含量、体长体高比、粗蛋白及灰分四者间正相关程度高, 这二者间存在负相关(图 3)。每个指标

的主成分特征向量是载荷矩阵除以对应主成分(PC1、PC2)特征值的平方根(马龙等, 2013)。其特征向量为对应指标(X_i)前的系数, 将每项特征向量与其标准化数据相乘后相加, 可构建出主成分(F_1 、 F_2)与所列 12 个指标间的表达式(6)(7):

$$F_1 = -0.30X_1 + 0.30X_2 + 0.29X_3 + 0.19X_4 + 0.31X_5 + 0.31X_6 + 0.30X_7 + 0.31X_8 - 0.31X_9 - 0.25X_{10} - 0.27X_{11} + 0.29X_{12} \quad (6)$$

$$F_2 = -0.04X_1 + 0.09X_2 - 0.36X_3 + 0.7X_4 + 0.14X_5 + 0.02X_6 + 0.2X_7 - 0.24X_8 + 0.07X_9 - 0.29X_{10} + 0.18X_{11} - 0.37X_{12} \quad (7)$$

3 讨论

3.1 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的形体特征

形体性状作为生物的宏观表型特征, 是水产动物分类的依据之一(韩慧宗等, 2016)。台湾泥鳅和泥鳅

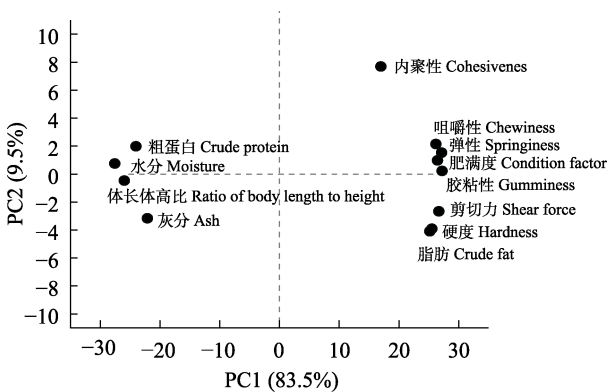


图 3 主成分载荷图
Fig.3 Load of principal component analysis

体形均为前端圆筒型和后端侧扁型,眼小且头部光滑、无鳞片,须5对,体表易分泌黏液,耐低温。与此同时,种间和个体间体色差异较大,通常台湾泥鳅腹部偏黄,泥鳅则偏白,该现象除品种外,还与生存环境有关(张晓霞,2019),尤其受土质颜色影响。本研究测得台湾泥鳅的肥满度与冯彬彬等(2019)研究3~6月龄的台湾泥鳅相一致,但其体长为(11.60±1.68)cm、体高为(1.80±0.29)cm,与本研究测得数值差别较大,其原因可能为台湾泥鳅生长快,在3~6月龄时已达到最佳的肥满度,因此,随着体长、体高的增长,肥满度变化不明显。PPAC体长体高比大于PPOC,提高了13.85%,可能与这2种养殖模式食物供给及捕获难易程度不同有关,稻田模式更贴近野生环境(Shin *et al.*, 2018),小部分食物可从稻田中直接获取(如虫、植物碎屑等),而大部分通过食物竞争,提高泥鳅的运动能力并使能量消耗增加,因而PPAC的体形较PPOC瘦长,验证了鱼类摄食与运动代谢存在相关性。泥鳅形体比台湾泥鳅更小而瘦长,与其泥鳅游泳能力和钻土能力均强于台湾泥鳅有关(Wang *et al.*, 2018)。黄菊等(2015)研究发现,真泥鳅肥满度为0.63±0.01,与本研究结果相似且其进一步研究了真泥鳅、大鳞副泥鳅及台湾泥鳅的生长性能与营养成分间的相关性,3种泥鳅都具有较好营养价值,其中,真泥鳅最高,台湾泥鳅最低,但台湾泥鳅生长速度显著快于另外2种,表明营养价值和生长性能存在内在联系。以上表明,不同养殖模式不仅影响形体,且对其营养成分造成一定影响。

3.2 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的营养差异

通常认为,营养成分是水产品品质的重要指标,粗蛋白和粗脂肪含量可反映其营养价值高低(张殿福等,2020)。本研究中,台湾泥鳅粗蛋白含量低于泥鳅;台湾泥鳅脂肪含量处于正常范围(2%~4%)(尤宏争等,2017;戴璐怡等,2021),泥鳅脂肪含量(0.8%~1.5%)与韩光明等(2016)研究一致,2种泥鳅肌肉水分和粗脂肪含量呈负相关,该结论与张殿福等(2020)研究结果一致。不同养殖模式也会造成营养品质的差异(韩光明等,2016)。本研究中,除粗脂肪外,PPAC肌肉水分、灰分及粗蛋白含量显著高于PPOC($P<0.05$);除水分、粗脂肪外,MPAC粗蛋白含量显著高于MPOC($P<0.05$),灰分反之($P<0.05$),说明稻田模式养殖环境可能使其自身粗蛋白含量增加。

脂肪酸含量在合理范围内,能对人体产生积极作用,尤其是不饱和脂肪酸,具有降低高密度脂蛋白血

清胆固醇的作用,能大大降低高血压、心脏病、中风等高发疾病的发病率,因而备受关注(宋红梅等,2020)。本研究发现,脂肪酸主要成分有C16:0、C18:1n9c和C18:2n6c,分别是SFA、MUFA和PUFA中主要的成分,该结果与戴璐怡等(2021)一致。根据FAO/WHO推荐的日常膳食n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA值为0.1~0.2(刘庆华等,2017),本研究中,PPAC的n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA(1.31±0.00)%显著高于MPAC(0.41±0.01)%($P<0.05$),PPOC的n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA(0.43±0.00)%显著低于MPOC(0.56±0.00)%($P<0.05$)。IA、IT值越小,表明不饱和脂肪酸含量越高,对人体越有益,通常牛肉的IA、IT分别为0.72、1.06,羊肉的IA、IT分别为1.00、1.58(楼乔明等,2016)。本研究中,PPOC和MPOC的IA分别为0.27±0.00、0.25±0.00,表明MPOC能更好的抑制动脉粥样硬化;PPOC和MPOC的IT分别为0.27±0.00、0.33±0.00,表明PPOC能更好的防止血栓形成。另外,稻田养殖模式下2种泥鳅脂肪酸种类多于池塘养殖的相同品种,可能由于泥鳅属于杂食性淡水鱼类,PPAC和MPAC更易摄入各种食物,通过消化吸收,产生更多种脂肪酸。本研究中,n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA_(PPOC)<n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA_(PPAC);n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA_(MPOC)>n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA_(MPAC),说明不同品种泥鳅可能因适合的养殖环境不同而造成n-3 Σ PUFA/n-6 Σ PUFA值差异较大。DHA有助于增强学习和思维能力,EPA具有一定的抗炎和免疫调节作用(Johnston *et al.*, 2006),因而,EPA+DHA常作为反映其营养功效的指标之一。本研究中,EPA+DHA_(MPOC)>EPA+DHA_(PPOC)>EPA+DHA_(PPAC)>EPA+DHA_(MPAC)($P<0.05$),与黄菊等(2015)结论不一致,由此可推测,同一养殖EPA+DHA含量不仅与泥鳅年龄、肥满度等有关,且和养殖模式有关,即池塘养殖模式可能更易合成EPA和DHA。IA_(PPAC)>IA_(PPOC),IA_(MPAC)>IA_(MPOC),IT规律与之相同,表明泥鳅与禽类相比,不饱和脂肪酸含量高,对调节血脂、抑制动脉粥样硬化和阻止血栓形成起到积极作用。综上所述,泥鳅的营养价值高于台湾泥鳅,PPOC和MPOC肌肉更易合成DHA、EPA。

3.3 池塘和稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅的品质差异

质构特性会影响消费者的购买行为和食用者的直观感受,通过TPA模拟人嘴巴的咬合动作对样品进行2次压缩以探究样品被咀嚼时的变化,综合分析食品结构及其所含营养成分间的相关性,可弥补感官

评分的不足(Nishinari *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020; Larsen *et al.*, 2016)。本研究中, 台湾泥鳅的硬度、弹性、胶黏性、咀嚼性和剪切力远大于泥鳅($P<0.05$), 说明质构与其品种、遗传、摄食运动等内在因素有关(Periago *et al.*, 2005), 其中, 泥鳅质构的实验结果与袁向阳等(2017)的结果一致, 且硬度和弹性最能影响鱼肉品质(吴永祥等, 2021)。PPOC 硬度是 MPOC 的 2.24 倍, PPOC 弹性是 MPOC 的 4.85 倍; PPAC 硬度是 MPAC 的 2.32 倍, PPAC 弹性是 MPAC 的 1.68 倍。陈伟等(2021)研究发现, 弹性与鱼肉中的水分、脂肪存在一定的相关性。台湾泥鳅弹性比泥鳅高, 这与台湾泥鳅体重、体长、肥满度显著高于泥鳅有关, 该结论与 Wang 等(2018)发现一致。此外, 硬度_(PPOC)>硬度_(PPAC) ($P<0.05$), 而 MPOC 略大于 MPAC ($P>0.05$), 弹性_(PPOC)>弹性_(PPAC) ($P<0.05$), 弹性_(MPOC)<弹性_(MPAC) ($P<0.05$), 表明 PPOC 和 MPAC 硬度较大, 抵抗牙齿挤压力较强, 肌肉纤维断裂力也随之增强, 胶黏性大, 肉质紧实, 耐咀嚼, 口感更佳。

游离氨基酸是氨基酸中一类可增强食品滋味的物质, 根据其氨基酸呈味特性不同, 主要分为甜味、鲜味、苦味和硫味(周纷等, 2019; Zhang *et al.*, 2016)。本研究发现, 每种游离氨基酸都具有 MPAC>PPAC, MPOC>PPOC, 这可能与泥鳅钻土能力强有关, 因泥鳅作为杂食性鱼类, 在淤泥层中可汲取丰富的营养, 通过肠道的消化、蠕动, 更好地吸收从而转化成更多滋味物质。MPOC 呈味物质 5 种, 即 Glu、Arg、His、Val 和 Met (TAV>1), 分别为 3.12、1.90、1.98、1.07、2.44 和 2.17 mg/mL, PPOC 呈味物质 4 种, 即 Glu、Arg、His、Met (TAV>1), 分别为 2.16、1.75、2.37 和 2.05 mg/mL, 表明与台湾泥鳅相比, 泥鳅的呈味特征更明显。稻田养殖模式下 2 种泥鳅的 17 种游离氨基酸含量均显著高于池塘养殖的相同品种, 表明稻田养殖模式下的泥鳅, 其肌肉风味比池塘养殖的更加突出, 该结论与池塘和稻田养殖模式下建鲤(*Cyprinus carpio* var. jian)(赵柳兰等, 2021)的研究结果一致。稻田模式下泥鳅的呈味物质多于池塘(TAV>1), 表明稻田模式的营养种类更加丰富, 合成更多的游离氨基酸, 产生较多滋味物质。本研究中, 2 种泥鳅主要由苦味氨基酸占主导地位, Arg 虽呈苦味, 但具有提高呈味复杂性及鲜度的作用, His 可增强某些海产品中的“肉香”风味特征(张秀洁等, 2019), 且 2 种泥鳅的苦味氨基酸含量虽较高, 但其不具有味觉活性, 易被甜味和鲜味物质所掩盖(周纷等, 2019; Chen *et al.*, 2007), 可能具有较好的鲜味和相应特征风味, 可为

后续在实际烹调与产品开发时风味调控提供参考。

4 结论

本研究以池塘与稻田养殖模式下台湾泥鳅和泥鳅为研究对象, 分析其形体特征、营养成分和品质差异的影响, 结果得出, 台湾泥鳅的肥满度大于泥鳅, 其中, PPOC 肥满度(1.00±0.01)显著高于 MPOC (0.50±0.01) ($P<0.05$), 与台湾泥鳅相比, 泥鳅粗蛋白含量更高, 粗脂肪含量更低, 其中 MPAC 粗蛋白含量最高, 达(21.09±0.57)%, 除内聚性外, 台湾泥鳅的质构特性显著高于泥鳅; 其次, PPOC 肥满度显著高于 PPAC, MPOC 肥满度显著低于 MPAC, 池塘养殖模式下 2 种泥鳅的 IA、IT 显著低于稻田养殖的相同品种, 稻田养殖泥鳅的肌肉比池塘养殖泥鳅的肌肉更具有呈味特性。本研究可为筛选适宜的泥鳅加工原料提供基础数据。

参 考 文 献

- Bureau of Fishery and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 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]
- CHEN D W, ZHANG M. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Food Chemistry, 2007, 104(3): 1200–1205
- CHEN W, CHEN J S. Food texture and properties. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 377–384 [陈伟, 陈建设. 食品的质构及其性质. 中国食品学报, 2021, 21(1): 377–384]
- DAI L Y, LIN S L, YE J Y, *et al.* Effects of different lipid diets on the growth, fatty acid composition and texture of muscle from *Paramisgurnus dabryanus* ssp. Freshwater Fisheries, 2021, 51(1): 76–82 [戴璐怡, 林胜利, 叶建勇, 等. 不同脂肪源饲料对台湾泥鳅生长、肌肉脂肪酸组成和质构的影响. 淡水渔业, 2021, 51(1): 76–82]
- FENG B B, ZHANG Q K, GAO X M, *et al.* Growth characteristics of large-sized fingerlings *Paramisgurnus dabryanus* ssp. in pond culture. Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering), 2019, 32(6): 43–48 [冯彬彬, 张清科, 高心明, 等. 池塘养殖条件下台湾泥鳅大规格鱼种的生长特性. 宁波大学学报(理工版), 2019, 32(6): 43–48]
- HAN G M, BI J H, TANG H J, *et al.* Nutritional component analysis in muscles of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* from Shaobo Lake. Journal of

- Jimei University (Natural Science), 2016, 21(5): 330–337 [韩光明, 毕建花, 唐鹤军, 等. 邵伯湖区泥鳅与大鳞副泥鳅肌肉营养组成分析. 集美大学学报(自然科学版), 2016, 21(5): 330–337]
- HAN H Z, JIANG H B, WANG F, *et al.* Principal component and path analysis of morphological traits of selective groups at different month ages of *Sebastes schlegeli*. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1163–1172 [韩慧宗, 姜海滨, 王斐, 等. 许氏平鲈不同月龄选育群体形态性状的主成分与通径分析. 水产学报, 2016, 40(8): 1163–1172]
- HU F, LI X D, XIONG S B, *et al.* Texture properties of freshwater fish and their correlation with nutritional components. Food Science, 2011, 32(11): 69–73 [胡芬, 李小定, 熊善柏, 等. 5 种淡水鱼肉的质构特性及与营养成分的相关性分析. 食品科学, 2011, 32(11): 69–73]
- HUANG J, CHU Z J, DENG S G, *et al.* Comparison of growth performance and nutritive value of three species of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*, local *Paramisgurnus dabryanus* and Taiwan *Paramisgurnus dabryanu*). Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2015, 34(1): 32–35, 44 [黄菊, 储张杰, 邓尚贵, 等. 三种泥鳅生长性能及营养成分的比较. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2015, 34(1): 32–35, 44]
- JOHNSTON I A, LI X J, VIEIRA V L A, *et al.* Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon. Aquaculture, 2006, 256(1): 323–336
- LARSEN D, TANG J Y, FERGUSON L, *et al.* Textural complexity is a food property—shown using model foods. International Journal of Food Properties, 2016, 19(7): 1–33
- LIU Q H, HUANG S, YUE W C, *et al.* Effects of *Elodea nuttallii* on growth and nutritional quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 91–99 [刘庆华, 黄姝, 岳武成, 等. 伊乐藻对中华绒螯蟹生长和营养品质的影响. 中国水产科学, 2017, 24(1): 91–99]
- LOU Q M, ZHANG W, LIU L L, *et al.* Analysis and nutritional evaluation of fatty acids in fish skin of *Theragra chalcogramma*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(2): 332–337 [楼乔明, 张问, 刘连亮, 等. 狭鳕鱼皮脂肪酸组成分析及其营养评价. 核农学报, 2016, 30(2): 332–337]
- MA H F, LIU Y J, TU X H, *et al.* Optimization of test conditions for TPA texture properties of avocado flesh. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 526(1): 1–8
- MA L, WU J, WU L L, *et al.* Principal component analysis of texture profile properties of spiced beef. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 111–113, 117 [马龙, 武杰, 吴玲玲, 等. 酱牛肉质构特性主成分分析. 食品工业科技, 2013, 34(8): 111–113, 117]
- NISHINARI K, FANG Y P. Perception and measurement of food texture: Solid foods. Journal of Texture Studies, 2018, 49(2): 160–201
- PERIAGO M J, AYALA M D, LÓPEZ-ALBORS O, *et al.* Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Aquaculture, 2005, 249(1): 175–188
- SHIN H S, SONG Y J, KWON S I, *et al.* Monthly change of the length-weight relationship of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) population in paddy fields by farming practices. Korean Journal of Environmental Biology, 2018, 36(1): 1–10
- SONG H M, QU Z W, WANG X J, *et al.* Analysis and assessment for nutritional components of the muscle of *Datnioides pulcher*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 177–184 [宋红梅, 屈政委, 汪学杰, 等. 印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 177–184]
- WANG J Q, FU G H, LI W Y, *et al.* The effects of two free-floating plants (*Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*) on burrow morphology and water quality characteristics of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) habitat. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(1): 22–29
- WANG J, PEI X L, LIU H Y, *et al.* Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 544–550
- WANG L, WU L, LIU Q, *et al.* Improvement of flesh quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed supranutritional dietary selenium yeast is associated with the inhibited muscle protein degradation. Aquaculture Nutrition, 2018, 24(4): 1351–1360
- WU Y X, WANG T T, ZHANG M T, *et al.* Microbial diversity and quality characteristics of Huizhou stinky mandarin fish and the antioxidant activity of its enzymolysis products. Food Science, 2021, 42(2): 128–134 [吴永祥, 王婷婷, 张梦婷, 等. 徽州臭鳃鱼微生物多样性、品质特性及其酶解产物抗氧化能力分析. 食品科学, 2021, 42(2): 128–134]
- XU Y F, HU W. The analysis of the meat quality of *Paramisgurnus dabryanus*, *Misgurnus anguillicaudatus* and *Misgurnus bipartitus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(6): 1–8 [许元峰, 胡炜. 大鳞副泥鳅、泥鳅和北方泥鳅肉质比较分析. 水生生物学报, 2020, 44(6): 1–8]
- YANG S, DU J, DUAN Y L, *et al.* Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. BMC Microbiology, 2018, 18: 113–125
- YANG S, DU J, LUO J, *et al.* Effects of different diets on the intestinal microbiota and immunity of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(5): 1327–1338
- YANG S, DUAN Y L, ZHANG J, *et al.* Observational comparisons of intestinal microbiota characterizations, immune enzyme activities, and muscle amino acid compositions of loach in paddy fields and ponds in Sichuan

- Province. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2017, 101(11): 4775–4789
- YOU H Z, SHAO P, GAO J Z, *et al.* Comparative analysis of muscular nutrients in export-grade hybrid loach *Paramisgurnus dabryanus* ♀× Taiwan loach ♂ and their parent. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(2): 198–204 [尤宏争, 邵蓬, 高建忠, 等. 出口级黄板鳅(♀)×台湾泥鳅(♂)杂交种及其亲本肌肉营养成分分析比较. 大连海洋大学学报, 2017, 32(2): 198–204]
- YUAN X Y, WANG Z Z, YANG C, *et al.* Comparison of the body color, texture, activities of viscera digestive enzymes, antioxidant enzymes and ATP enzymes of two cultured population of *Misgurnus anguillicaudatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 121–127 [袁向阳, 王志铮, 杨程, 等. 两种养殖模式下泥鳅养成品体色、质构及其脏器消化酶、抗氧化酶和 ATP 酶活力的差异. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 121–127]
- ZHANG D F, WU L, ZHANG X Z, *et al.* Nutrient components and texture profiles in the flesh of Atlantic salmon, triploid rainbow trout, and golden trout. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 186–194 [张殿福, 吴雷, 张学振, 等. 大西洋鲑、三倍体虹鳟和金鳟的肌肉营养成分与品质特性. 中国水产科学, 2020, 27(2): 186–194]
- ZHANG K J, WU N, WANG X C, *et al.* Effects of 3 feeding modes on the volatile and nonvolatile compounds in the edible tissues of female Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Food Science*, 2016, 81(4): S968–S981
- ZHANG X J, GUO Q Y, WANG L M, *et al.* Composition and evaluation of flavor substances in the cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(20): 242–249 [张秀洁, 郭全友, 王鲁民, 等. 养殖大黄鱼滋味和气味物质组成及评价. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 242–249]
- ZHANG X X. Study on the morphological characteristic and related physiological functions of *Misgurnus anguillicaudatus* cohort juvenile with different weight-gaining performance. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2019, 1–72 [张晓霞. 池养泥鳅同生群幼鱼中不同增重性能群体间形质与相关生理功能的差异研究. 浙江海洋大学硕士研究生学位论文, 2019, 1–72]
- ZHAO L L, LONG Y N, LUO J, *et al.* Analysis and comparison of intestinal microbiota, immune enzyme activities, and muscle flavor of Jian carp in two culture modes. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(1): 48–56 [赵柳兰, 龙亚男, 罗杰, 等. 池塘和稻田两种养殖模式下建鲤肠道菌群、免疫酶活性及肌肉氨基酸比较分析. 中国水产科学, 2021, 28(1): 48–56]
- ZHOU F, ZHANG Y X, ZHANG L, *et al.* Differences in taste components in by-products of chilled large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Science*, 2019, 40(16): 193–199 [周纷, 张艳霞, 张龙, 等. 冰鲜大黄鱼不同副产物中滋味成分差异分析. 食品科学, 2019, 40(16): 193–199]

(编辑 陈 辉)

Effects of Pond-Cultivation and Paddy-Cultivation Modes on Nutritional Quality of Loach

CAI Lijun^{1,2}, GUO Quanyou^{2①}, MA Donglin², WANG Haihua^{3,4,5}, YANG Xu²,
MA Benhe^{3,4,5}, HUANG Haichao², ZHENG Yao²

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

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 201306, China;

3. Jiangxi Fisheries Research Institute, Nanchang, Jiangxi 330039, China; 4. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources Environment in Poyang Lake, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanchang, Jiangxi 330039, China;

5. Nanchang Key Laboratory of Special Aquaculture Breeding and Healthy Aquaculture, Nanchang, Jiangxi 330039, China)

Abstract To explore the effects of different culture mode on the nutritional quality of loaches, differences in body characteristics, nutritional composition, and quality of *Paramisgurnus dabryanus* ssp. and *Misgurnus anguillicaudatus* pond-cultivated and paddy-cultivated were evaluated, and the correlation between body characteristics and nutritional quality were discussed. The results showed that the fatness of *P. dabryanus* ssp. pond-cultivated (PPOC) (1.00 ± 0.01) was significantly higher than that of *M. anguillicaudatus* pond-cultivated (MPOC) (0.50 ± 0.01) ($P<0.05$). The crude protein content of *M. anguillicaudatus* was significantly higher than that of *P. dabryanus* ssp. ($P<0.05$), while the crude fat content of *M. anguillicaudatus* was significantly lower than that of *P. dabryanus* ssp. ($P<0.05$). *M. anguillicaudatus* paddy-cultivated (MPAC) had the highest crude protein content (21.09 ± 0.57)%. The texture properties of *P. dabryanus* ssp. were significantly better than those of *M. anguillicaudatus* ($P<0.05$), except for cohesiveness. The culture model had a significant effect on the body characteristics of loaches. The fatness of PPOC was significantly higher than that of PPAC ($P<0.05$), and the fatness of MPOC was significantly lower than that of MPAC ($P<0.05$). The atherogenic and thrombogenic indices of the two pond-cultivated loaches were significantly lower than those paddy-cultivated ($P<0.05$). $\text{Hardness}_{(\text{PPOC})} > \text{hardness}_{(\text{PPAC})}$, and $\text{springiness}_{(\text{MPOC})} < \text{springiness}_{(\text{MPAC})}$ ($P<0.05$). Glutamate, arginine, histidine, valine, and methionine levels were higher in paddy-cultivated mode than those of in pond-cultivated mode ($\text{TAV}>1$). The results of principal component analysis showed that there was a close relationship between body characteristics and nutritional quality. Fatness was negatively correlated with the ratio of body length to height (-0.996), positively correlated with TPA characteristics and crude fat content, and negatively correlated with moisture content, ash content, and crude protein content. Based on the indexes of fatness and texture *et al*, PPOC is the most suitable raw material for loach processing.

Key words *Paramisgurnus dabryanus* ssp.; *Misgurnus anguillicaudatus*; Cultivation mode; Body characteristics; Nutritional quality

① Corresponding author: GUO Quanyou, E-mail: dhsguoqy@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210316001

http://www.yyqxjz.cn/

王善宇, 简冲, 王灵昭, 杜云建, 曹荣. 镀冰衣在保持凡纳滨对虾冻藏过程脂质稳定性的作用. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 207-213

WANG S Y, JIAN C, WANG L Z, DU Y J, CAO R. Effect of ice glazing on the lipid stability of *Litopenaeus vannamei* during frozen storage. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 207-213

镀冰衣在保持凡纳滨对虾冻藏过程 脂质稳定性的作用*



王善宇^{1,2} 简冲² 王灵昭² 杜云建² 曹荣^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

2. 江苏海洋大学食品科学与工程学院 江苏 连云港 222005)

摘要 水产品冻藏过程中脂质变化是引起品质劣化的重要原因,为探究凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)冻藏过程脂质变化以及冰衣对脂质的影响,将其进行镀冰衣处理后在-20℃冻藏180 d,定期取样分析解冻损失率、蒸煮损失率、总脂含量、脂质组成、酸价(acid value, AV)、过氧化值(peroxide value, POV)和硫代巴比妥酸反应物含量(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)等指标的变化。结果显示,随着冻藏时间的延长,对照组和冰衣组样品的解冻损失率、蒸煮损失率呈上升趋势。从冻藏30 d开始,冰衣组的解冻损失率极显著低于对照组($P<0.01$),冰衣组冻藏60 d及更长时间的样品,其蒸煮损失率极显著低于对照组($P<0.01$),表明镀冰衣可以提高冻藏凡纳滨对虾的持水能力。冻藏期间,对照组和冰衣组总脂含量变化不大,但脂质组成均发生显著变化,磷脂和甘油三酯含量下降,游离脂肪酸含量上升,胆固醇含量相对稳定。两组样品脂质氧化指标的变化规律基本一致,AV和TBARS在冻藏期间不断上升,POV在冻藏前60 d先升高后下降,之后缓慢增加,但冰衣组脂质氧化的各项指标均低于对照组,表明镀冰衣有助于保持凡纳滨对虾冻藏过程中脂质的稳定性。

关键词 凡纳滨对虾; 冻藏; 冰衣; 脂质; 保水性; 稳定性

中图分类号 TS254.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0207-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)营养价值高且味道鲜美,深受消费者喜爱。作为三大养殖虾类品种之一,2019年凡纳滨对虾国内产量达181.56万t(农业农村部渔业渔政管理局等,2019),在渔业经济中的地位举足轻重。虾类通常含有较高的水分和蛋白质,易受外源微生物和内源酶的影响而腐败变质。除鲜销外,冷冻是其最主要的贮藏方式(邓尚贵等,2019)。

冷冻可以减缓水产品腐败,延长货架期。然而,水产品冻藏过程中往往会出现干耗、脂肪氧化水解以及蛋白冷冻变性等品质劣化的现象。镀冰衣是冷冻水产品生产中广泛采用的一种工艺手段,可有效减缓干耗(雷雨田等,2018)。近年来,关于水产品冻藏品质的研究主要集中在蛋白变性机制及其控制技术方面,如李燕等(2018)研究发现,镀冰衣能显著延缓

* 国家重点研发计划(2018YFD0901004)资助 [This work was supported by National Key Research and Development Plan (2018YFD0901004)]. 王善宇, E-mail: 1132023546@qq.com

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

收稿日期: 2021-03-16, 收修改稿日期: 2021-03-21

南美白对虾(*Penaeus vannamei*)的感官品质劣变,降低了解冻损失和蒸煮损失,抑制了总挥发性盐基氮(TVB-N)的增加和盐溶蛋白的减少;李学英等(2014)研究发现,−30℃及以下有利于南极磷虾(*Euphausia superba*)蛋白在冻藏中的稳定性;曹荣等(2016)研究发现,日本枪乌贼(*Loligo japonica*)肌原纤维蛋白含量随冻藏时间的延长快速下降。目前,对水产品冻藏过程中脂质变化的研究相对较少(Aydin *et al.*, 2014),尤其是镀冰衣在保持脂质稳定性方面的研究报道更少。

本研究以凡纳滨对虾为研究对象,分别对冰衣组 and 对照组在−20℃冻藏过程中的保水性、总脂含量、脂质组成以及脂质氧化情况进行检测分析,研究结果有助于丰富水产品冻藏过程品质变化规律的基础理论,同时为凡纳滨对虾冷冻品质控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜活凡纳滨对虾的体长为(11.50±0.28) cm,体重为(14.60±1.20) g,购于山东省青岛市埠东海鲜市场,充氧保活条件下运至实验室,选取规格一致、形态完整的个体,加冰猝死,将其平整放于托盘上,置于−50℃超低温冰箱中快速冻结。

总胆固醇(TC)试剂盒和甘油三酯(TG)试剂盒购于中生北控生物科技股份有限公司;氯仿、甲醇、硝酸、高氯酸、钼酸钠、氯化钠、无水硫酸钠、醋酸铜、吡啶、正庚烷、95%乙醇、氢氧化钠、硫氰酸钾、氯化亚铁、还原铁粉、硫酸联氨、浓硫酸、异丙醇、1,1,3,4-四乙氧基丙烷和 Triton X-100 等均为分析纯,购于青岛青科赛尔生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); KQ-300V 型超声波震荡器(江苏昆山市超声仪器有限公司); N-1001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); DS-1 型高速组织粉碎机(上海标本模型厂); CS110-4 型冷冻干燥机(上海基因科技有限公司); UV-2802 型紫外/可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司); IKA T18 型高速分散机(德国 IKA 公司); 5804 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 将冻结好的凡纳滨对虾随机分成 2 组,一组直接分装于样品袋中作为对照组,另外一组放入预先制备的冰水混合物中,冰水混合物的

温度控制在 0~4℃,浸泡 10 s,冰衣量控制在 10%左右,镀冰衣后,分装于样品袋中作为镀冰衣组。2 组样品置于−20℃冰箱内,冻藏时间为 180 d。在冻藏 0、30、60、120 和 180 d 时,随机选取样品封装于样品袋中,流水解冻后进行检测。

1.3.2 解冻损失率测定方法 将凡纳滨对虾取出称重(M_1),置于培养皿(预先铺好滤纸),于室温自然解冻 2~3 h,取出、擦干表面水分后称重(M_2),按以下公式计算。

$$\text{解冻损失率}(\%) = (M_1 - M_2) / M_1 \times 100$$

1.3.3 蒸煮损失率测定方法 取出凡纳滨对虾样品,准确称量并记录 M_1 ,解冻完成后,置于蒸煮袋中封口,放入 85℃水浴 15 min 后取出,冷却后用滤纸吸干表面水分称量 M_2 ,按以下公式计算。

$$\text{蒸煮损失}(\%) = (M_1 - M_2) / M_1 \times 100$$

1.3.4 总脂含量测定方法 参照 Vasta 等(2012)的方法。将整虾匀浆,取 20 g 样品,加入 200 mL 氯仿-甲醇,振荡浸提 2 h,加入适量生理盐水,混匀后静置过夜。收集下层氯仿层,以无水硫酸钠干燥,旋蒸浓缩后,得到总脂样品,准确称量,即为总脂含量。

1.3.5 总胆固醇、甘油三酯含量测定 将总脂用异丙醇-Triton X-100 (9 : 1, v/m)溶液稀释到合适浓度,按试剂盒说明测定样品中总胆固醇和甘油三酯含量。

1.3.6 磷脂含量测定方法 称取适量总脂样品,用硝酸-高氯酸混合液(4 : 1, v/v)进行湿法消化,消化液基本无色时作为消化终点。采用钼蓝比色法测定总脂中的磷脂含量。

1.3.7 游离脂肪酸含量的测定 采用铜皂比色法(万楚筠等, 2006)。将总脂样品用氯仿溶解并定容至 50 mL,取一定量样液氮气吹干,加入 3 mL 正庚烷溶解,振荡 1 min 后加入 1 mL 铜试剂(5%乙酸铜溶液,吡啶调 pH 至 6.1),振荡 2 min,静置 10 min 后取上层有机相,于 715 nm 处测定样品吸光值,以油酸为对照绘制标准曲线,计算总脂中的游离脂肪酸含量。

1.3.8 酸价(AV)测定方法 依据 GB 5009.229-2016《食品安全国家标准 食品中酸价的测定》,采用热乙醇指示剂滴定法,结果表示为 mg/g。

1.3.9 过氧化值(POV)测定方法 依据 GB/T 5009.37-2003《食用植物油卫生标准的分析方法》中的比色法对试样中的 POV 测定,结果表示为 meq/kg。

1.3.10 硫代巴比妥酸反应值(TBARS)测定方法 依据 GB 5009.181-2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》,采用分光光度法测定,结果表示为 mg/kg。

1.4 数据处理

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理, 每个实验重复 2 次, 每次取 3 个平行样进行测定, 结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。组间差异采用 *t* 检验分析。

2 结果与分析

2.1 冻藏过程解冻损失率、蒸煮损失率变化

水产品水分含量高, 在冻藏过程中由于蛋白变性、肌肉组织结构改变、持水力下降等原因, 在解冻和蒸煮过程中会损失一部分水分。同时, 一些水溶性维生素、矿物质等营养成分也随着水分的流失而损失。通常用解冻损失率和蒸煮损失率反映水产品冻藏品质的稳定性(Benjakul *et al*, 2009)。

凡纳滨对虾冻藏过程解冻损失率、蒸煮损失率如图 1 所示。随着冻藏时间的延长, 对照组和冰衣组样品的解冻损失率不断上升, 这与冻藏过程中生成的冰晶破坏细胞结构造成汁液流失有关。从冻藏 30 d 开始, 冰衣组的解冻损失率极显著低于对照组($P<0.01$), 说明镀冰衣处理对于保持虾肉组织完整性具有积极作用。对照组蒸煮损失率的变化趋势与解冻损失率相近, 都是在冻藏前期明显上升。蒸煮损失不仅包含了

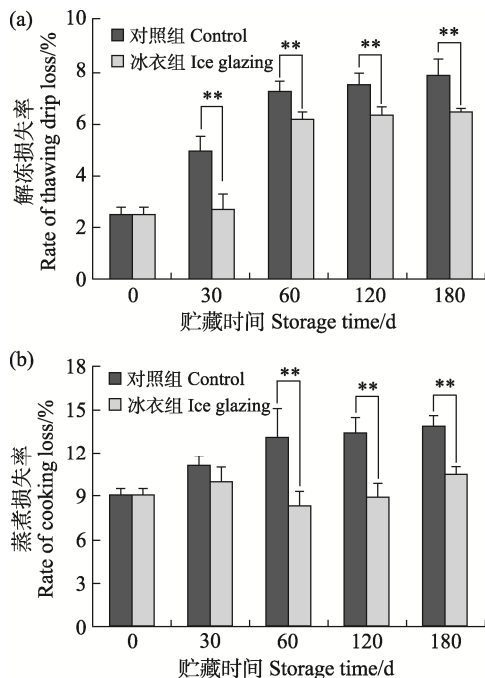


图 1 凡纳滨对虾冻藏过程解冻损失率(a)和蒸煮损失率(b)的变化

Fig.1 Changes in thawing loss rate and cooking loss rate of *L. vannamei* during frozen storage

** : 差异极显著($P<0.01$)

** : Highly significant difference ($P<0.01$)

解冻过程中的汁液流失, 还包含虾肉受热后变性导致的水分流失(Gokoglu *et al*, 2018)。冰衣组冻藏 60 d 及更长时间的样品, 其蒸煮损失率极显著低于对照组($P<0.01$), 说明镀冰衣可以提高凡纳滨对虾虾肉冻藏过程的持水能力, 降低蒸煮损失, 这与雷雨田等(2018)的研究结果基本一致。

2.2 冻藏过程脂质总量变化

凡纳滨对虾冻藏过程中的总脂含量变化见图 2, 鲜虾的总脂含量为 2.92 g/100 g, 这与李婉君等(2015)、王昕岑(2015)的研究结果略有不同, 这可能与虾的品种、规格、捕捞季节和饲料等因素有关。随着冻藏时间的延长, 2 组样品的总脂含量都略有下降, 这与武华等(2014)的研究结果一致。冰衣组的总脂含量略高于对照组, 但无显著差异($P>0.05$)。总脂含量的下降可能与贮藏过程脂质发生氧化分解有关。另外, 冻藏中, 虾肉中的冰晶逐渐增大, 破坏了虾肉组织的整体结构, 解冻过程中脂肪伴随汁液流失而减少, 在一定程度上影响总脂含量(谭明堂等, 2020)。冰衣组解冻损失率极显著低于对照组($P<0.01$) (图 1), 可能也是冰衣组总脂含量略高于对照组的原因之一。

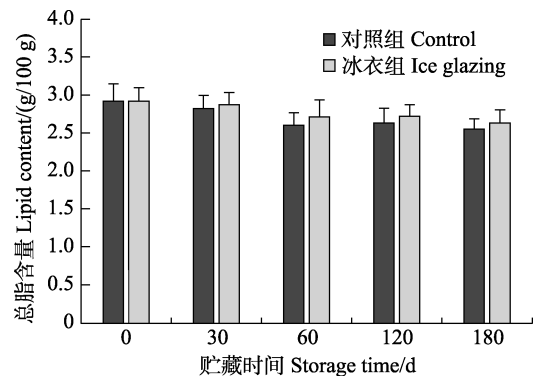


图 2 凡纳滨对虾冻藏过程总脂含量变化
Fig.2 Changes in lipid contents of *L. vannamei* during frozen storage

2.3 冻藏过程脂质主要组分含量变化

凡纳滨对虾脂质主要由磷脂、甘油三酯、游离脂肪酸和总胆固醇组成, 鲜虾中各脂质组分所占比例见图 3。鲜虾中脂质以磷脂为主, 比例达 42.53%, 其次是甘油三酯和游离脂肪酸, 胆固醇所占比例最小。

凡纳滨对虾冻藏过程中, 磷脂、甘油三酯、游离脂肪酸和总胆固醇的含量变化见图 4。随着冻藏时间的延长, 2 组样品的磷脂和甘油三酯含量呈减少趋势, 游离脂肪酸含量有所增加, 胆固醇含量相对稳定, 这与 Aubourg 等(2010)、Takeungwongtrakul 等(2012)的研究结果类似。尽管水产品品质在冻藏状态下比较稳

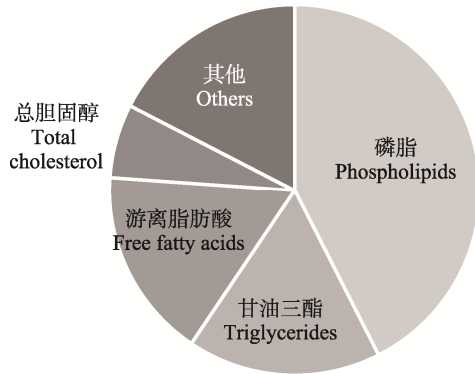


图3 鲜虾中脂质主要组分比例
Fig.3 Proportions of lipid components in fresh shrimp

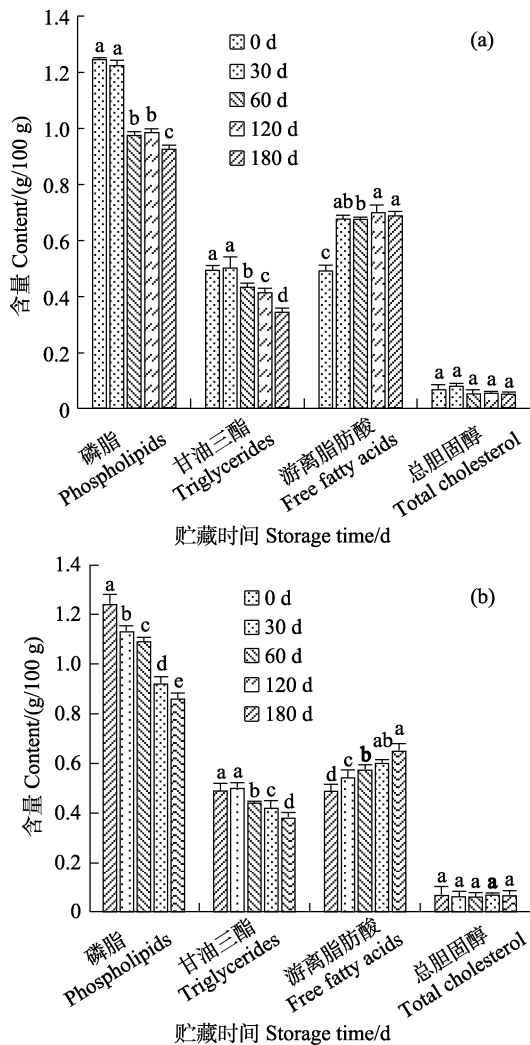


图4 凡纳滨对虾冻藏过程中对照组(a)和冰衣组(b)脂质主要组分含量变化

Fig.4 Changes in the major lipid components of *L. vannamei* during frozen storage

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

定,但仍会发生蛋白变性和脂质水解等反应,如甘油三酯水解成甘油二酯和甘油一酯,磷脂水解成甘油、磷酸和脂肪酸等,造成游离脂肪酸含量增加(王晓旭等,2016)。与对照组相比,冰衣组主要脂质组分的变化更加平缓,这可能与冰衣在一定程度上隔绝了氧气,进而减缓了脂质的氧化分解有关。另外,镀冰衣对内源性脂肪酶活性和微生物也有一定的抑制作用(Gallieer *et al.*, 2013)。

2.4 冻藏过程酸价(AV)变化

AV是衡量脂质水解程度的指标,可以表征样品中游离脂肪酸含量的多少(Barthet *et al.*, 2008)。由图5可知,2组样品在冻藏过程中,AV均随贮藏时间的延长而上升。冻藏180 d时,对照组和冰衣组的AV由6.82 mg/g分别升高至22.79 mg/g和22.26 mg/g,表明凡纳滨对虾冻藏后期脂质水解程度严重。在冻藏前30 d,冰衣组的AV极显著低于对照组($P < 0.01$),表明镀冰衣在冻藏前期可以提升脂质的稳定性。

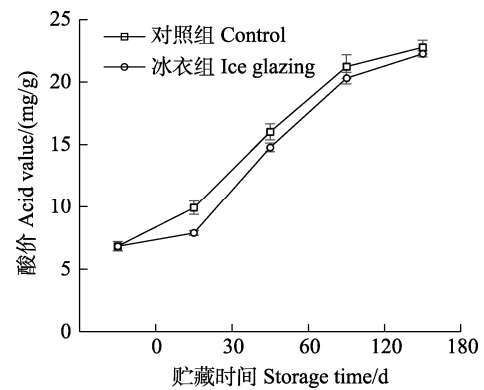


图5 凡纳滨对虾冻藏过程AV变化
Fig.5 Changes in AV of *L. vannamei* during frozen storage

2.5 冻藏过程过氧化值(POV)变化

POV反映脂质初级氧化程度(张燕平等,2013)。从图6可以看出,冻藏前30 d,POV有所升高,说明脂质发生氧化,生成氢过氧化物。冻藏60 d时,POV显著降低,这与氢过氧化物易进一步分解生成醛、酮等小分子化合物有关。60 d后,POV缓慢升高,说明氢过氧化物的生成速度大于分解速度,这与程文健等(2013)在蓝圆鲈(*Decapterus maruadsi*)鱼片贮藏中的研究结果基本一致。吕飞等(2016)研究发现,竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)随贮藏时间的延长,POV呈上升趋势。而Aubourg (1999)发现,蓝鳕鱼(*Sparus aurata*)冻藏过程中,POV呈先升高后降低的趋势,且在不同的贮藏温度,POV的变化规律也有差异。在

冻藏前 60 d, 冰衣组 POV 显著低于对照组($P<0.05$), 说明镀冰衣在一定程度上阻碍了氢过氧化物的生成, 有利于保持凡纳滨对虾贮藏过程中脂质的稳定。

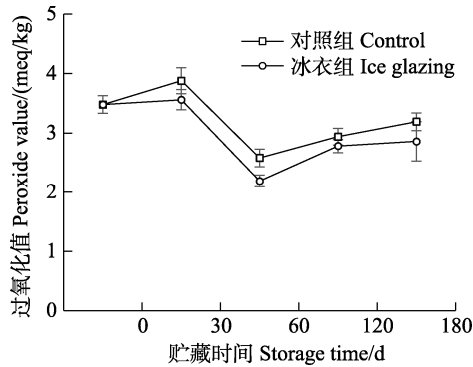


图 6 凡纳滨对虾冻藏过程 POV 变化

Fig.6 Changes in POV of *L. vannamei* during frozen storage

2.6 冻藏过程 TBARS 含量变化

水产品富含不饱和脂肪酸, 易发生氧化酸败, 生成丙二醛(MDA)等小分子化合物。TBARS 可通过测定 MDA 含量评价脂质次级氧化程度(Maqsood *et al.*, 2010)。由图 7 可知, 凡纳滨对虾 TBARS 含量随冻藏时间的延长呈增加趋势。对照组 60 d 对应的 TBARS 含量较 30 d 有一定程度的减少, 这可能与部分脂质氧化产物和蛋白质发生反应有关。脂质氧化和蛋白质氧化都是自由基链式反应, 氧化反应可以在蛋白质和脂质间相互转移, 脂质氧化产生的醛类可以与赖氨酸反应生成吡咯衍生物, 与蛋氨酸、半胱氨酸等反应生成砜、亚砜和二硫化物衍生物等(王兆明等, 2018)。冰衣组的 TBARS 含量显著低于对照组($P<0.05$), 表明镀冰衣可以延缓脂质的次级氧化, 减少 MDA 的生成, 这与郑振霄等(2016)的研究结果一致。

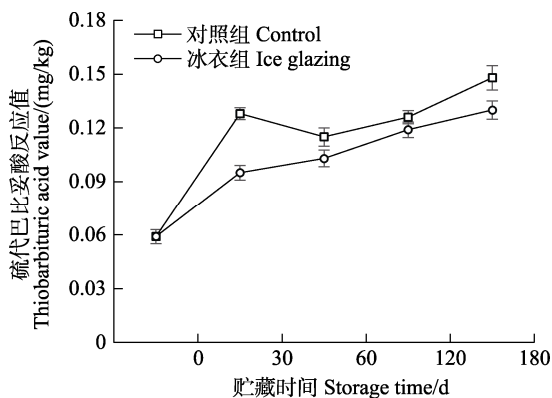


图 7 凡纳滨对虾冻藏过程 TBARS 变化

Fig.7 Changes in TBARS content of *L. vannamei* during frozen storage

3 结论

凡纳滨对虾在 -20°C 冻藏 180 d 期间, 解冻损失率和蒸煮损失率呈上升趋势, 总脂含量变化不大, 但脂质组成发生明显变化, 磷脂和甘油三酯含量显著下降, 游离脂肪酸含量显著增加, 胆固醇含量相对稳定。随贮藏时间的延长, AV 和 TBARS 含量都呈增加趋势。POV 在冻藏前 60 d 先升高后下降, 之后缓慢增加。冰衣组脂质氧化的各项指标均低于对照组, 在维持凡纳滨对虾冻藏过程脂质稳定性方面具有重要作用。

参 考 文 献

- AUBOURG S P, ÁLVAREZ V, PENA J. Lipid hydrolysis and oxidation in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) slaughtered and chilled under different icing conditions. *Grasas y Aceites*, 2010, 61(2): 183–190
- AUBOURG S P. Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Research International*, 1999, 32(7): 497–502
- AYDIN I N, GOKOGLU N. Effects of temperature and time of freezing on lipid oxidation in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during frozen storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116(8): 996–1001
- BARTHET V J, GORDON V, DAUN J K. Evaluation of a colorimetric method for measuring the content of FFA in marine and vegetable oils. *Food Chemistry*, 2008, 111(4): 1064–1068
- BENJAKUL S, BINSAN W, VISESSANGUAN W, *et al.* Effects of flavourzymes on yield and some biological activities of Mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp. *Journal of Food Science*, 2009, 74(2): S73–S80
- Bureau of Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *China Fisheries Statistical Yearbook*. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- CAO R, WANG F Y, ZHAO L, *et al.* Quality changes of Japanese squid (*Loligo japonica*) during freezing storage at different temperatures. *Advances in Fisheries Science*, 2016, 37(4): 97–103 [曹荣, 王凤玉, 赵玲, 等. 日本枪乌贼 (*Loligo japonica*) 不同温度冻藏过程中的品质变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 97–103]
- CHENG W J, ZHU Q J, AN R, *et al.* Fat oxidation characteristics of blue trevally fish fillets during storage and selection of antioxidants. *Fujian Fisheries*, 2011, 33(5): 31–35 [程文健, 朱麒靖, 安然, 等. 蓝圆鲹鱼片贮藏期内脂肪氧化特性研究及抗氧化剂的筛选. *福建水产*, 2011, 33(5): 31–35]
- DENG S G, MAO X Z, YU H. Deep processing technology of

- shrimp. Beijing: Science Press, 2019 [邓尚贵, 毛相朝, 余华. 虾深加工技术. 北京: 科学出版社, 2019]
- GALLIEER S, SHAW E, CUTHBERT J, *et al.* Hydrolysis of milk phospholipid and phospholipid-protein monolayers by pancreatic phospholipase A₂. *Food Research International*, 2013, 54(1): 718–725
- GOKOGLU N, TOPUZ O K, YERLIKAYA P, *et al.* Effects of freezing and frozen storage on protein functionality and texture of some cephalopod muscles. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2018, 27(4): 1–8
- LEI Y T, SHI J, GUI P, *et al.* Effects of ice-coated tea polyphenols on quality changes of *Penaeus vannamei* in frozen storage. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(6): 92–99 [雷雨田, 石径, 桂萍, 等. 冰衣结合茶多酚对南美白对虾冻藏中品质变化的影响. 中国农业大学学报, 2018, 23(6): 92–99]
- LI W J. Comparison of nutrition and flavor components between *Euphausia superba* and *Penaeus vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [李婉君. 南极磷虾与南美白对虾营养与滋味成分比较. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LI X Y, LIU H S, YANG X S, *et al.* The effect of freezing storage temperature on Antarctic krill quality changes. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(6): 191–195 [李学英, 刘会省, 杨宪时, 等. 冻藏温度对南极磷虾品质变化的影响. 现代食品科技, 2014, 30(6): 191–195]
- LI Y, FANG Y D, LUO Y K, *et al.* The effect of ice coat on the storage quality of frozen *Penaeus vannamei*. *Meat Research*, 2018, 32(5): 39–44 [李燕, 方艺达, 罗永康, 等. 冰衣对冷冻南美白对虾贮藏品质的影响. 肉类研究, 2018, 32(5): 39–44]
- LÜ F, WEI Q Q, HU Z J, *et al.* Effect of cold sea water pretreatment time on frozen storage quality of jack mackerel. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2016, 30(7): 1373–1378 [吕飞, 魏倩倩, 胡卓瑾, 等. 冷海水预处理时间对竹筴鱼冻藏品质的影响. 核农学报, 2016, 30(7): 1373–1378]
- MAQSOOD S, BENJAKUL S. Comparative studies of four different phenolic compounds on *in vitro* antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*, 2010, 119(1): 123–132
- TAKEUNGWONGTRAKUL S, BENJAKUL S, H-KITTIKUN A. Lipids from cephalothorax and hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Compositions and deterioration as affected by iced storage. *Food Chemistry*, 2012, 134(4): 2066–2074
- TAN M T, WANG J F, YU W H, *et al.* The effect of compound ice-coat fresh-keeping agent on squid quality during frozen storage. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(6): 148–154 [谭明堂, 王金锋, 余文晖, 等. 复配冰衣保鲜剂对鱿鱼冻藏期间品质的影响. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 148–154]
- VASTA V, PAGANO R I, LUCIANO G, *et al.* Effect of morning vs. afternoon grazing on intramuscular fatty acid composition in lamb. *Meat Science*, 2012, 90(1): 93–98
- WAN C Y, HUANG F H, LI W L. Ascorbic acid-molybdenum blue photometric method for the determination of phospholipids in oils and fats. *China Oils and Fats*, 2006, 31(4): 46–49 [万楚筠, 黄凤洪, 李文林. 抗坏血酸-钼蓝光度法测定油脂中磷脂含量的研究. 中国油脂, 2006, 31(4): 46–49]
- WANG X C. Shotgun analysis and hydrolysis mechanism of phospholipids during storage of aquatic products. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [王昕岑. 水产品贮藏过程中磷脂的鸟枪法分析及水解机理研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- WANG X X, WANG X C, LIANG D, *et al.* Simulating exploration of the hydrolysis mechanism of *Litopenaeus vannamei* phospholipids during storage. *Journal of Fisheries*, 2016, 40(7): 1123–1132 [王晓旭, 王昕岑, 梁栋, 等. 模拟探究凡纳滨对虾磷脂在贮藏过程中的水解机理. 水产学报, 2016, 40(7): 1123–1132]
- WANG Z M, HE Z F, LI H J. The effect of lipid and protein oxidation on meat quality and the research progress of interactive oxidation mechanism. *Food Science*, 2018, 39(11): 295–301 [王兆明, 贺稚非, 李洪军. 脂质和蛋白质氧化对肉品品质影响及交互氧化机制研究进展. 食品科学, 2018, 39(11): 295–301]
- WU H, HONG H, LUO Y K, *et al.* The effect of frozen storage temperature on lipid characteristics of bighead carp fillet. *Journal of China Agricultural University*, 2014, 19(6): 173–178 [武华, 洪惠, 罗永康, 等. 冻藏温度对鳊鱼片脂质特性变化的影响. 中国农业大学学报, 2014, 19(6): 173–178]
- ZHANG Y P, CEN Q Q, DAI Z Y, *et al.* Preliminary study on hot-air drying process model and fat oxidation law of plum fish. *Chinese Journal of Food Science*, 2013, 13(9): 39–47 [张燕平, 岑琦琼, 戴志远, 等. 梅鱼热风干燥工艺模型及脂肪氧化规律初探. 中国食品学报, 2013, 13(9): 39–47]
- ZHENG Z X, ZHOU P, FENG J L, *et al.* Effects of three preservation methods on mackerel freshness during storage. *Chinese Journal of Food Science*, 2016, 16(1): 181–187 [郑振霄, 周聃, 冯俊丽, 等. 3种保鲜方法对鲐鱼贮藏期间鲜度的影响. 中国食品学报, 2016, 16(1): 181–187]

Effect of Ice Glazing on the Lipid Stability of *Litopenaeus vannamei* During Frozen Storage

WANG Shanyu^{1,2}, JIAN Chong², WANG Lingzhao², DU Yunjian², CAO Rong¹①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China;
2. College of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract Lipid changes during the freezing process is the primary reason for the deteriorating quality of aquatic products. To explore the lipid changes in the shrimp *Litopenaeus vannamei* during frozen storage and the effect of ice coating on lipids, the glazed shrimp were stored at -20°C for 180 d and sampled regularly for the analysis of the thawing loss rate, cooking loss rate, total fat content, lipid composition, acid value (AV), peroxide value (POV), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results showed that the thawing and cooking loss rates of shrimp increased during frozen storage, which were significantly lower in the ice-coated group than in the control group ($P<0.01$), indicating that ice coating can improve the water holding capacity of shrimp meat in frozen storage. The total lipid content of the shrimp did not change substantially, but the lipid composition did. The concentrations of phospholipids and triglycerides decreased, free fatty acids increased, and cholesterol was relatively stable. The changes in the lipid oxidation indices of the two groups were similar. The AV and TBARS levels increased continuously. The POV first increased and then decreased until 60 d, and then slowly increased. However, the lipid oxidation indicators of the ice-coated group were lower than those of the control group, indicating that ice coating is helpful for maintaining the lipid stability of shrimp during frozen storage.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Frozen storage; Ice glazing; Lipid; Water retention; Stability

① Corresponding author: CAO Rong, E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》投稿须知

《渔业科学进展》主要刊载水产领域各学科的基础理论和应用研究成果，设研究论文、研究简报，也刊载反映水产学科发展方向的优秀综述文章，但不接收第一作者为硕士生的综述。对于创新性高的论文，本刊承诺在最短时间内予以优先发表。经本刊审定录用的稿件均可在知网版优先发表，并视同正式发表。

期刊使用在线稿件处理系统 <http://www.yykxjz.cn>。请至本刊主页“作者登录”注册、登录，根据提示提交 Word 稿件。投稿前，请进行以下确认：

1. 该论文为作者原创，享有自主知识产权，无抄袭问题，无学术伪造，不涉及泄密。
2. 该论文的相关内容无一稿多投，也未在其他任何刊物上发表。
3. 该论文作者的署名及顺序经每位作者确认，属实且准确，作者之间无署名及排序纠纷。
4. 该论文的研究符合道德准则及学术伦理，并遵守国家相应的法律法规；该论文用做实验的动物享受了其应有的福利及人道处理。

审稿及发表事项

1. 本刊实行同行专家双盲审，您可推荐相关专家若干名，并列明专家姓名、单位、研究方向及邮箱等。
2. 论文经 2 位以上专家审阅、编委会审定，编辑部在 2 个月内将审稿意见反馈给作者，期间作者不得将该论文投往他刊。
3. 论文出版后将收取版面费，300 元/版(≤10 版)，450 元/版(>10 版)，如印刷彩图，费用另计。稿件刊登后酌付稿酬，并赠送 2~3 本当期期刊。

论文写作要求

1. 在摘要里需明确该论文的创新点 1~2 个。英文摘要的字数应不少于 800 单词，需详细描述研究背景、目的、方法、结果、结论及研究的意义，即将英文摘要撰写为一篇小论文，比中文摘要更详细、更丰富，“拥有与论文同等量的主要信息”。
2. 作者单位的中英文需对应，需写明系或学院全称，请写明各层次的重点实验室名称，并核实其准确性。
3. 在文稿首页的脚注处注明资助项目及编号(请同时提供中文和英文)，并注明第一作者的 E-mail 和通讯作者的职称、E-mail。
4. 文章各部分的格式，请参考网站最新发表的文章，无需考虑文章的格式排版。
5. 物种在文中首次出现，应同时写出其拉丁文名。
6. 注意区分蛋白和基因的大小写、正斜体，蛋白用大写、正体，基因用小写、斜体。
7. 图的要求
 - (1) 图中不同图例之间要易于区分，如较难区分，可制作彩图。
 - (2) 图中所有内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中、英文双语。
 - (3) 横、纵坐标需符合规范，包括中英文标目、单位(如有)。如：磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/(mg/L)
 - (4) 图中的数据、方程等要与文中的描述一致。
 - (5) 图件请插入论文 Word 文档的相应位置，供审稿专家审阅。
 - (6) 投稿时，请将所有图的原始图打包，作为附件上传，方便排版时调整图中文字的字体和字号。线条图、柱状图等可提供原始软件制作的矢量图，如 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件。照片图可提供 ppt 文件，每张照片单独成张，图中的线、点、箭头、文字等可编辑。
8. 表格的要求
 - (1) 请制作成三线表(顶线、表头线、底线)。
 - (2) 表题、表注等需用中、英文双语标注。
 - (3) 表格中的数据精确度(小数点后的位数)保持一致，一般情况下，小数点后的数字不超过 3 位。
9. 参考文献的要求
 - (1) 对国内外发表的相关论文，特别是近期的研究成果应充分引用。所有文献按字母顺序排列。
 - (2) 中文参考文献需列出对应英文信息，请从数据库查阅其英文题目、期刊名称等。
 - (3) 文中提及的文献需和文后列出的文献相对应，请仔细核对：正文中引用的文献，是否在正文后的参考文献部分中列出；参考文献部分中列出的，是否已在正文中引用。
 - (4) 参考文献的卷、期(如有)、页码均需详细列出。参考文献的作者需列出前 3 位。英文参考文献，请注意区分外国作者的 Last name 和 First name，姓在前，名在后，名用缩写。英文的姓名所有字母均大写，名的两个字母之间空一格。英文刊名请使用全称。

《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
解绥启 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3期 2022年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.43 No.3 Jun. 2022

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 科学出版社
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.yyqxjz.cn>
E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主编 金显仕

印刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China
Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发行
定价: 40.00元



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869



9 772095 986224

06>